

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
CURSO DE QUÍMICA TECNOLÓGICA E INDUSTRIAL**

RODRIGO MARTINS LINS

**ANÁLISE COMPARATIVA DA AÇÃO DE DOIS ANTIMICROBIANOS NO
PROCESSO FERMENTATIVO: AVALIANDO RELAÇÃO CUSTO-BENEFÍCIO**

MACEIÓ - AL

2023

RODRIGO MARTINS LINS

**ANÁLISE COMPARATIVA DA AÇÃO DE DOIS ANTIMICROBIANOS NO
PROCESSO FERMENTATIVO: AVALIANDO RELAÇÃO CUSTO-BENEFÍCIO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Química Tecnológica e Industrial da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do Grau de Bacharel em Química Industrial.

Orientador: Prof.º Dr. José Edmundo Accioly de Souza

MACEIÓ - AL

2023

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale CRB-4/661

L759a Lins, Rodrigo Martins.
Análise comparativa da ação de dois antimicrobianos no processo fermentativo :
avaliando relação custo-benefício / Rodrigo Martins Lins. – 2023.
42 f. : il.

Orientador: José Edmundo Accioly de Souza.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Química Tecnológica e Industrial) –
Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 40-42.

1. Produção de etanol. 2. Contaminação microbológica. 3. Fermentação.
4. Rendimento. I. Título.

CDU: 544.03:661.722

Folha de Aprovação

RODRIGO MARTINS LINS

Análise comparativa da ação de dois antimicrobianos no processo fermentativo: avaliando relação custo-benefício

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Química Tecnológica e Industrial da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do Grau de Bacharel em Química Industrial apresentado em: 24 / 05 / 2023.

Banca Examinadora:

Orientador: Prof.º Dr. José Edmundo Accioly de Souza
(Universidade Federal de Alagoas)

Examinador(a): Prof.º Dr. Mário Roberto Meneghetti
(Universidade Federal de Alagoas)

Examinador(a): Prof.ª Drª Sônia Salgueiro Machado
(Universidade Federal de Alagoas)

Dedico este trabalho, aos meus familiares, amigos e colegas que fiz ao longo desse trajeto, sem deixar de mencionar a profunda admiração e carinho por todos aqueles que no decorrer da minha caminhada me estenderam a mão e/ou me aconselharam.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelo apoio e encorajamento durante todo o processo.

Agradeço aos colegas da graduação que tive a oportunidade e o prazer de conviver ao longo do curso.

Agradeço a minha amiga Janielle Paula que além de companheira durante as aulas, trabalhos e estágios sempre me aconselhou da forma que achou benéfico pra minha carreira e pra minha vida, tornou-se uma pessoa que vou levar para a vida.

Agradeço ao grande Marcos André, vulgo Marcolino, que mesmo sendo de outro curso e tendo conhecido por acaso durante uma viagem de ônibus, sempre me aconselhou e me incentivou a seguir em frente e que praticamente pegou na minha mão e me ajudou imensamente a ser aprovado nas disciplinas de cálculos.

Agradeço a todo o pessoal da Usina Cruangi (Coaf) e da Empresa Drul que me acolheram como parte da equipe e me demonstraram companheirismo, amizade e inúmeras lições que levarei para a vida.

Agradeço a Cristiane Oliveira, minha mentora na DRUL que me acolheu literalmente como um filho e me deixou ensinamentos bem mais valiosos que aqueles que aprendi durante as atividades no laboratório.

Agradeço ao distinto Ademir Burgos, responsável pelos meus ensinamentos em Fermentação e Destilaria na Usina Cruangi (Coaf), um mestre no assunto e que me ensinou tudo o que podia sobre fermentação e como uma série de aspectos distintos no geral contribuem para uma fermentação saudável e um processo de destilação eficazes.

E por fim, mas não menos importante, agradeço ao Prof.º Dr. José Edmundo Accioly pelos ensinamentos técnicos durante as aulas em sala e fora dela.

RESUMO

A indústria de produção de etanol e açúcar brasileiro tem como principal matéria-prima a cana-de-açúcar, rica em açúcares fermentáveis, no qual os açúcares fermentáveis contidos no caldo da cana-de-açúcar são convertidos, parcialmente, em etanol através do processo de fermentação alcoólica com a utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Com inúmeras aplicações no mercado, o etanol é um importante insumo para o desenvolvimento do país, no entanto, o seu processo de produção convencional sofre constantemente com interferências que podem provocar a perda da eficiência do processo, dentre elas, a contaminação bacteriana, as intempéries do maquinário, durante o armazenamento e, principalmente, devido a perda de células de leveduras no processo. Quando verificadas perdas no processo, a contaminação bacteriana é considerada um dos principais causadores, então, o acompanhamento e o tratamento adequados do processo são fundamentais para a manutenção de um processo fermentativo saudável. O controle das condições do processo com a utilização de produtos externos é importante para minimização das perdas na produção de etanol. A análise no desempenho baseou-se na utilização de dois produtos comerciais e de princípios ativos distintos, cujas quantificações foram elaboradas no Laboratório Industrial da unidade sucroalcooleira Cruangi. O produto 1, denominado de Ultranol, apresentava a função de biocida, onde sua função ativa era baseada em um Dialquil-metil-amina, o produto 2 por sua vez, denominado de Maxper apresentava a função de um antibiótico e na sua composição a Monoensina Micelial a 11%. Ambos os produtos tiveram suas performances em reduzir a contaminação avaliadas em um processo fermentativo controlado por meio de dados obtidos da análise de pH, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), viabilidade celular e valores de contaminação. Desta maneira, os resultados obtidos demonstram que ambos os produtos são capazes de diminuir satisfatoriamente os valores de contaminação do processo fermentativo. A Monoensina micelial apresentou também melhorias nos fatores de viabilidade celular, enquanto o Ultranol proporcionou um leve aumento no pH de trabalho do meio, sem afetar os valores de infecção. Apesar da redução do fator de infecção e o aumento no pH, a utilização do Ultranol como um biocida para a fermentação apresenta problemas relacionados com os subprodutos gerados posteriormente ao processo, uma vez que boa parte dos biocidas são agentes altamente poluentes. Logo, o emprego da Monoensina Micelial a 11% como agente antibacteriano é mais apropriado visando a relação custo-benefício e meio ambiente.

Palavras Chaves: Fermentação; Contaminação; Rendimento; Etanol.

ABSTRACT

The Brazilian ethanol and sugar production industry has sugarcane as its main raw material, rich in fermentable sugars, in which the fermentable sugars contained in the sugarcane juice are partially transformed into ethanol. through the process of alcoholic fermentation with the use of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. With countless applications in the market, ethanol is an important input for the development of the country, however, its conventional production process constantly suffers from interferences that can cause the loss of process efficiency, among them, bacterial infection, bad weather of the machinery, during storage and, mainly, due to the loss of yeast cells in the process. When losses in the process are verified, bacterial contamination is considered one of the main causes, therefore, monitoring and proper treatment of the process are essential for maintaining a healthy fermentation process. The control of process conditions with the use of external products is important to minimize losses in ethanol production. The performance analysis was based on the use of two commercial products and different active principles, whose quantifications were elaborated in the Industrial Laboratory of the Cruangi sugar and alcohol unit. Product 1, called Ultranol, had the function of a biocide, where its active function was based on a Dialkyl-methyl-amine, product 2, in turn, called Maxper, had the function of an antibiotic and in its composition Monoensin 11% mycelial. Both products had their performance in reducing contamination evaluated in a controlled fermentation process using data obtained from pH analysis, high performance liquid chromatography (HPLC), cell viability and contamination values. In this way, the results obtained demonstrate that both products are able to satisfactorily reduce the contamination values of the fermentation process. Mycelial monoensin also showed improvements in cell viability factors, while Ultranol provided a slight increase in the working pH of the medium, without affecting infection values. Despite the reduction of the infection factor and the increase in pH, the use of Ultranol as a biocide for fermentation presents problems related to the by-products generated after the process, since most of the biocides are highly polluting agents. Therefore, the use of 11% Mycelial Monoensin as an antibacterial agent is more appropriate in terms of cost-effectiveness and the environment.

Key Words: Fermentation; Contamination; Yield; Ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas do processo de produção do etanol a partir da cana-de-açúcar.....	16
Figura 2 - Entrada facilitada de ácido lático em decorrência do valor de pH externo mais baixo.....	18
Figura 3 - Fatores estressantes que afetam as células de levedura na produção de etanol e mecanismos comuns de defesa celular.....	22
Figura 4 - Béqueres contendo as amostras preparadas e devidamente identificadas.....	25
Figura 5 - Representação do cromatograma gerado após a separação dos componentes da amostra.....	27
Figura 6 - Fluxograma das etapas.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação entre a quantidade de bastonetes e a concentração de ácido láctico.....	18
Tabela 2 - Relação estimada entre o número de bactérias na fermentação etanólica e respectivas perdas equivalente em etanol.....	19
Tabela 3 - Valores de pH, viabilidade, brotamento, fator de infecção e glicerol obtidos para a amostra sem adição de produtos (Branco).....	29
Tabela 4 - Valores de pH, viabilidade, brotamento, fator de infecção e glicerol obtidos para a amostra com a adição de 50ppm de Ultranol.....	30
Tabela 5 - Valores de pH, viabilidade, brotamento, fator de infecção e glicerol obtidos para a amostra com a adição de 100ppm de Ultranol.....	31
Tabela 6 - Valores de pH, viabilidade, brotamento, fator de infecção e glicerol obtidos para a amostra com a adição de 200ppm de Ultranol.....	31
Tabela 7 - Valores de pH, viabilidade, brotamento, fator de infecção e glicerol obtidos para a amostra com a adição de 2ppm de Monoensina Micelial a 11%.....	33
Tabela 8 - Valores de pH, viabilidade, brotamento, fator de infecção e glicerol obtidos para a amostra com a adição de 5ppm de Monoensina Micelial a 11%.....	33
Tabela 9 - Valores de pH, viabilidade, brotamento, fator de infecção e glicerol obtidos para a amostra com a adição de 10ppm de Monoensina Micelial a 11%.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
UFC	Unidades Formadoras de Colônia.
PPM	Partes por Milhão.
COAF	Cooperativa do Agronegócio dos Associados da Associação dos Fornecedores de Cana de Açúcar.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3. REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 Fermentação.....	15
3.2 Processo de Produção	15
3.3 Etanol.....	17
3.4 Contaminação Bacteriana.....	19
3.5 Fatores de Contaminação e Estresse.....	21
3.5.1 Ambiente.....	21
3.5.2 Temperatura	22
3.5.3 pH	23
3.5.4 Estresse	23
4. MATERIAIS E METODOS	26
4.1 Materiais e Reagentes.....	26
4.2 Obtenção e Preparo das Amostras	26
4.3 Determinação de Viabilidade, Brotamento, Número de Células e Razão de Infecção	27
4.4 Análise do HPLC	28
4.5 Fluxograma.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
5.1 Amostra sem adição – Branco	31
5.2 Amostra com adição de 50ppm (Ultranol)	32
5.3 Amostra com adição de 100ppm (Ultranol)	32
5.4 Amostra com adição de 200ppm (Ultranol)	34

5.5 Amostra com adição de 2ppm (Monoensina Micelial a 11%).....	34
5.6 Amostra com adição de 5ppm (Monoensina Micelial a 11%)	35
5.7 Amostra com adição de 10ppm (Monoensina Micelial a 11%)	35
6. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

A indústria do etanol e do açúcar brasileiro tem como matéria-prima a cana-de-açúcar, o que apesar de serem produtos distintos, se conectam de alguma maneira. Nesse sentido, os processos de inovação que acontecem na produção de etanol reverberam na produção de açúcar, e vice-versa, visto que uma parte das cargas microbianas encontradas durante o processo fermentativo é proveniente da fase agrícola da produção. (DUNHAM; BOMTEMPO; FLECK, 2011).

É durante o processo fermentativo em uma indústria sucroalcooleira que ocorre a transformação do açúcar em etanol, em condições de anaerobiose. Sendo, portanto, a fermentação alcoólica um processo de biotransformação de um substrato em etanol por meio de um microrganismo (PASCHOALINI; ALCARDE, 2009).

Geralmente é utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a realização dessa fermentação.

A levedura é o principal constituinte da fermentação alcoólica, sendo responsável pela transformação do açúcar em etanol. Para um bom desempenho na indústria, ela deve apresentar algumas características, tais como: elevada velocidade de fermentação, tolerância ao etanol, bom rendimento, resistência e estabilidade (PASCHOALINI; ALCARDE, 2009, p. 60).

Dentro do processo fermentativo há interferências que fazem com que haja uma perda de eficiência, dentre elas a contaminação bacteriana, as intempéries do maquinário, no armazenamento e principalmente a perda de células ativas no processo. Pode-se citar como fatores que influenciam na fermentação, a concentração de etanol, que acaba inibindo a atividade da levedura, o pH, pois a levedura tem uma faixa ideal para a sua atividade plena, além da temperatura e da contaminação bacteriana, que resulta numa redução da produtividade, consumo do açúcar, formação de goma e aumentando a viscosidade, podendo danificar equipamentos (GOES-FAVONI et al., 2018). Assim, para monitorar e otimizar o processo, é importante a implementação de parâmetros e análises sobre o produto final e os seus intermediários do processo (PASCHOALINI; ALCARDE, 2009).

Sendo assim, o presente estudo visa desenvolver, de forma comparativa, uma análise envolvendo dois produtos com funções orgânicas distintas para avaliar suas performances

baseadas nas análises de acidez, pH, viabilidade, brotamento e quantidade de glicerol ao final de um processo fermentativo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar comparativamente a utilização de dois produtos de princípios ativos distintos com o intuito de avaliar suas performances no que diz respeito a otimizar a produção de etanol, minimizando o teor de contaminação microbiológica.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a acidez final, pH e quantidade de microrganismos do processo para os dois produtos;
- Mensurar a quantidade de glicerol produzido a partir do uso dos dois produtos;
- Descrever a importância da utilização dos produtos para o processo fermentativo, avaliar a performance de cada um e ganhos da sua utilização para a indústria.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Fermentação

O Brasil, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), registrou na safra de 2019/20 um total de 34 bilhões de litros de etanol provenientes da cana-de-açúcar, a maior produção da história do país (GOVERNO DO BRASIL, 2020).

Sabe-se que os produtos de fermentação são usados desde a antiguidade, pois existem registros que comprovam o uso de alimentos fermentados por civilizações antigas, além disso, a produção de bebidas provenientes do processo de fermentação possui registros desde o período de 6.000 a.C. (VILLEN, 2009).

Foi na Europa que as técnicas de fermentação alcoólica se desenvolveram em larga escala, principalmente para fins farmacêuticos, de produção de etanol e para bebidas (COSTA, 2019a). Em 1929, com a crise internacional, o mercado de açúcar foi amplamente afetado, levando a intensificação da produção de etanol a partir da cana-de-açúcar. Vale ressaltar que, se comparada com o trigo e o milho para produção de etanol, a cana-de-açúcar é mais eficiente, pois além de produzir o etanol, o seu bagaço pode ser utilizado para gerar energia com a queima, e as cinzas utilizada como fertilizantes (COSTA, 2019a).

Demonstrando a importância desse processo e dessa matéria-prima para a produção de etanol, é importante salientar que o processo de produção de etanol através da fermentação, como traz Costa (2019b) no Brasil ainda tem muito o que evoluir em termos de otimização e sofisticação dos equipamentos e do processo em si.

Apesar deste processo ser bastante conhecido e estudado há décadas, a aplicação de tecnologias mais avançadas vem se tornando importantes nos últimos 20 anos, devido ao aumento da produção e consumo de etanol. As tecnologias utilizadas por grande parte das usinas e, sobretudo, na região nordeste é bastante rudimentar e assemelham-se às utilizadas no século XX. As tecnologias de ponta, que necessitam de elevado grau de controle e automação, ainda são pouco utilizadas levando a operações empíricas e consequentes descontroles e despadronização dos produtos. (COSTA, 2019b, p. 12).

3.2 Processo de Produção

Os processos de fermentação em uma indústria atualmente, podem ser conduzidos de três maneiras, descontínua (batelada), semi-contínua (batelada alimentada) e contínuas, sendo

estas definidas através do meio de inserção do substrato e da retirada do produto final. A maneira de processamento da produção influencia meramente na velocidade de obtenção dos produtos, em como a indústria pode realizar as etapas do processo e nas adequações necessárias para manter a qualidade do procedimento. (COSTA, 2019a).

O processo por batelada alimentada, mais utilizado nas indústrias sucroalcooleiras do Brasil, em que o processo é alimentado por células em reciclo, há um menor risco de inativação das leveduras, pois a presença da glicose assegura a metabolização preferencial a outras fontes de energia e inibe a indução de operons envolvidos no catabolismo dos carboidratos, fenômeno caracterizado como repressão catabólica. As células são então separadas do vinho logo após o fim da fermentação e encaminhadas para o tratamento, as células são tratadas com ácido sulfúrico, para reduzir a contaminação bacteriana, caso ocorra, e a adição de água para diminuir o teor alcoólico que leva a redução da atividade da levedura. Por fim, nutrientes são adicionados ao processo para suprir as necessidades dos organismos. (SNUSTAD, 2008)

É importante acrescentar que o processo por batelada alimentada acarreta um maior rendimento em etanol com fermentações mais rápidas, também necessita de um menor volume de dornas, isto é, um menor custo em instalação e garante grande pureza das fermentações diminuindo os riscos de contaminações (REBELATO et al., 2012). Segundo Moura e Silva (2019), o processo chave para o beneficiamento da cana-de-açúcar, sem dúvida, é atribuído à fermentação. Alguns parâmetros são importantes para avaliar o rendimento da produção de etanol a partir da fermentação da cana-de-açúcar, como o pH, temperatura, grau Brix e teor alcoólico.

O percentual em massa de sólidos solúveis presentes em solução de sacarose, conhecido comumente como grau de brix denota a concentração de açúcar na amostra, sendo que, no caso da fermentação da cana-de-açúcar, quanto maior o valor do Brix, mais açúcar haverá para ser consumido pelas leveduras e mais etanol será produzido, contudo há uma faixa de valores considerada ideal para o processo, compreendida entre 18° e 22° Brix. Já o parâmetro pH do meio influencia tanto na formação do produto, o etanol, quanto no crescimento das leveduras durante o processo fermentativo (MOURA; SILVA, 2019).

Vale ressaltar que a fermentação é o termo geral para o processo realizado por uma variedade de microrganismos, que consiste na extração de energia metabolizando os açúcares fermentescíveis. O processo se desenvolve em três etapas: a preliminar ou de crescimento, em que o substrato é adicionado as células, havendo a metabolização da glicose e da frutose até piruvato através da via glicolítica, nessa etapa há o crescimento e reprodução celular; a fase

tumultuosa, é caracterizada pela descarboxilação do piruvato, formado na etapa anterior, a acetaldeído e uma intensa liberação de CO₂, fazendo com que o mosto se agite, formando espuma; e, por fim, a etapa complementar, em que há uma redução do acetaldeído a etanol, o líquido assenta na dorna de fermentação e, nas próximas horas, o processo finaliza (GOES-FAVONI, 2018). Tendo em vista essas etapas, é possível perceber quais são mais prováveis de apresentar falhas, reduzindo a produtividade.

3.3 Etanol

Para a produção de etanol a partir da cana de açúcar, a matéria prima passa por diversas etapas, de maneira geral, as etapas são: cultivo, colheita, transporte, recepção e moagem da cana-de-açúcar (preparo da cana para aumentar sua densidade e romper células para extração mais eficiente do caldo), extração, podendo ser por meio de difusão ou moagem, e preparação do mosto (caldo da cana-de-açúcar), inoculação (adição da levedura *Saccharomyces cerevisiae*), fermentação, separação e reutilização da levedura, destilação do mosto fermentado (destilação fracionada e azeotrópica), estocagem do etanol hidratado e anidro, distribuição e venda ao consumidor final (VANZELLA, 2014; GIMENEZ et al., 2018).

Então, o caldo bruto passa por tratamentos químicos para clarificá-lo, retirar corantes de origem vegetal e mineral, corrigir o pH, decantação e filtração de coloides, gomas e materiais nitrogenados, finalizado essa etapa o caldo é aquecido e também resfriado e direcionado para a fermentação (VANZELLA, 2014; COSTA, 2019b).

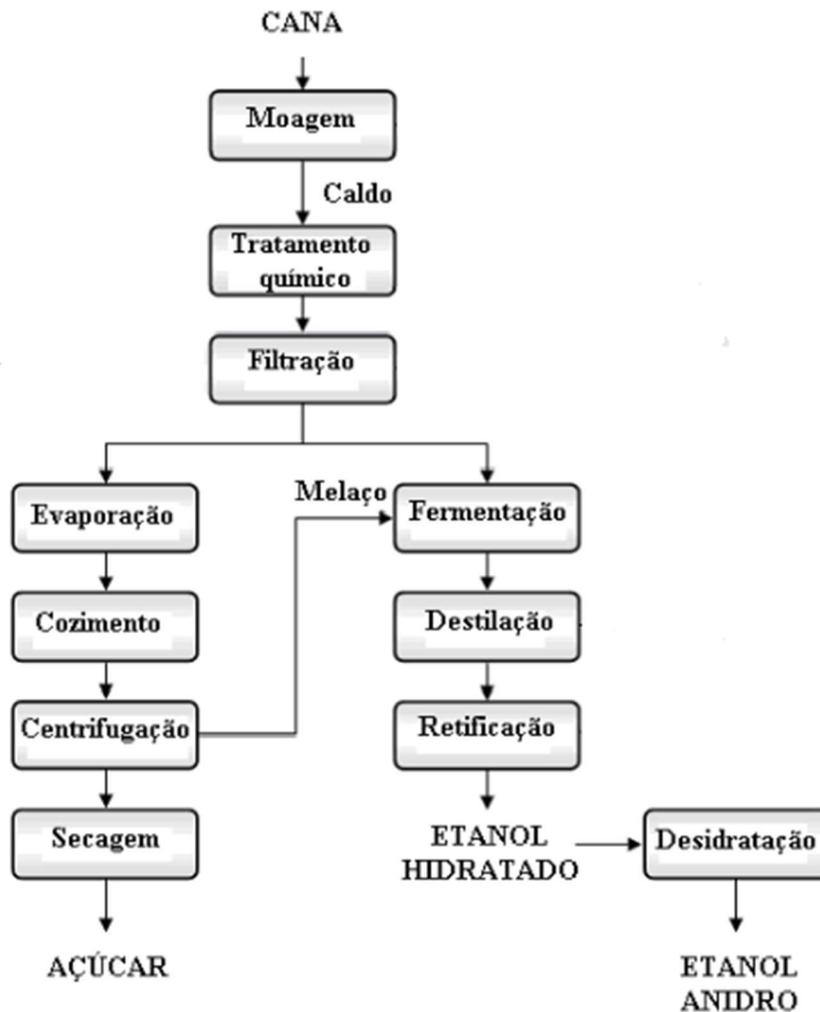
O aquecimento é realizado para auxiliar, também na remoção de microrganismos contaminantes e completar as reações químicas das impurezas para serem eliminadas (COSTA, 2019b). Já na fermentação, que tem como componentes o mosto (caldo, melaço e água), levedura em um meio anaeróbico (VANZELLA, 2014).

O mosto é uma solução de açúcar cuja concentração foi ajustada de forma a facilitar a sua fermentação, geralmente a sua concentração de sólidos fica em torno de 19-22° Brix (COSTA, 2019b), no preparo do mosto, pode haver a adição de melaço, um dos produtos da indústria sucroalcooleira e, é rico em açúcares. O mosto então é acrescido da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, geralmente por batelada alimentada, gerando o vinho levedurado após a fermentação (REBELATO et al., 2012).

Na etapa de centrifugação, a levedura é separada do vinho que é encaminhado para a destilação, processo que dá origem ao etanol, enquanto a levedura é direcionada para uma dorna e tratada para retornar ao processo (REBELATO et al., 2012; VANZELLA, 2014).

Como visto, os processos de fermentação industrial brasileiros possuem características incomuns que permitem a entrada e crescimento de linhagens de leveduras selvagens que resultam em falhas no processo, como por exemplo no transporte da cana-de-açúcar colhida até a chegada na indústria, no tratamento da levedura para o retorno ao processo, entre outras, restando o aprimoramento do processo para evitar tais feitos (CUNHA et al., 2019; REBELATO et al., 2012). O esquema do processo pode ser ilustrado na Figura 1.

Figura 1- Etapas do processo de produção do etanol a partir da cana-de-açúcar



Fonte: Adaptado de VANZELLA, 2014.

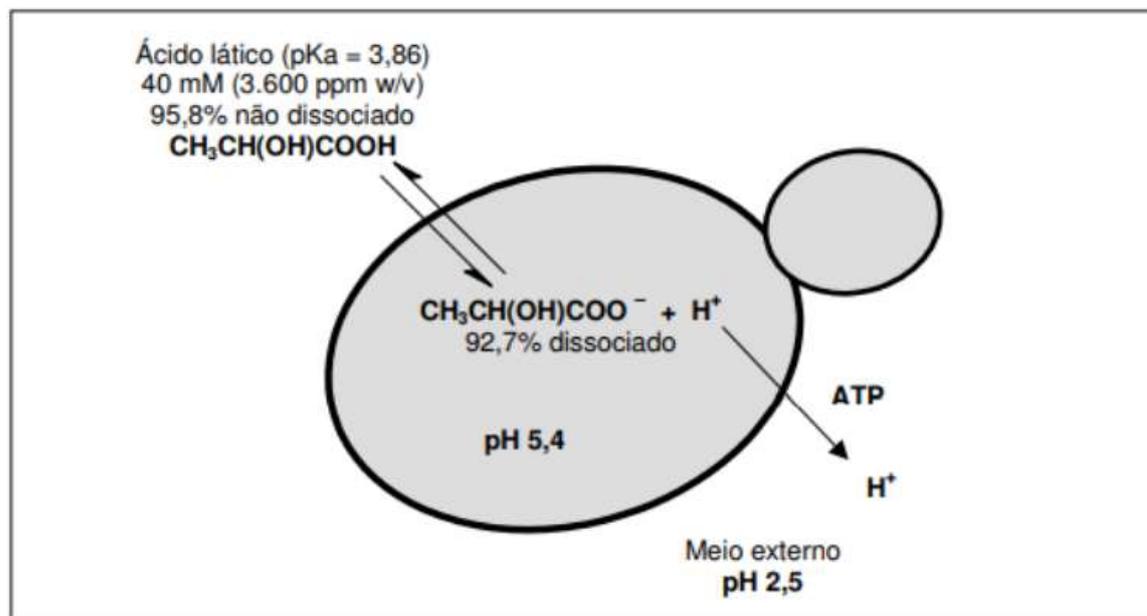
3.4 Contaminação bacteriana

A contaminação bacteriana surge como um dos principais fatores limitantes para otimização do processo de fermentação alcoólica, pois interfere diretamente em diversos parâmetros que influenciam no rendimento do processo (FREITAS; ROMANO, 2013).

Sabe-se que a presença de microrganismos no processo de fermentação da cana-de-açúcar vem sendo carregada desde a lavoura até o início da fermentação em si, uma vez que o mosto e o caldo são substratos ótimos para a proliferação desses microrganismos, pois possuem nutrientes, pH numa faixa adequada e temperaturas ideais (VANZELLA, 2014). Bactérias Lácticas, do gênero *Lactobacillus* são as mais frequentes causadoras de perdas no processo de fermentação na indústria. Ao se multiplicarem elas degradam a glicose a ácido pirúvico que posteriormente é reduzido a ácido láctico. A presença de aproximadamente 10^7 a 10^9 células/mL de bactérias é responsável por uma perda teórica na faixa de 10 a 90% de eficiência produtiva em uma população de leveduras. A reação do ácido láctico, assim como os demais ácidos orgânicos, está diretamente relacionada aos valores de pH do meio e a forma ao qual o ácido se encontra (associado ou dissociado). (OLIVEIRA; SILVA; NETO, 2020).

No processo fermentativo, no entanto, fatores como o pH do meio, o tipo de levedura e a pressão osmótica estão diretamente relacionados a ação inibitória dos ácidos orgânicos, o que se enquadra para o ácido láctico que quando presente acumula-se no interior da célula de levedura provocando uma diminuição do pH interno e impedindo que a célula cresça (DORTA, 2006). Assim como os demais ácidos orgânicos, o ácido láctico em valores de pHs mais baixo apresenta uma ação ainda mais intensificada, uma vez que, na sua forma protonada sua passagem para o interior da célula é facilitada e ocorre a liberação de H^+ , como pode ser visto na Figura 2.

Figura 2 – Entrada facilitada de ácido láctico em decorrência do valor de pH externo mais baixo



Fonte: Adaptado de Dorta, 2016

Sendo as contaminações bacterianas nos processos fermentativos em sua maioria causadas por bactérias lácticas, é possível relacionar a quantidade de bastonetes com a concentração de ácido láctico, como expresso na Tabela 1.

Tabela 1 – Relação entre a quantidade de bastonetes e a concentração de ácido láctico.

Contagem de Bastonetes	Concentração de ácido Láctico (ppm)
$1,00 \text{ E}^{+08}$	<3000
$1,00 \text{ E}^{+07}$	<2000
$1,00 \text{ E}^{+06}$	<1000
$1,00 \text{ E}^{+05}$	<800

Fonte: Adaptado de NARENDRANATH, 2003.

Tal relação é bastante usual, uma vez que a infecção presente no mosto de alimentação está controlada, ou seja, ter um bom sistema de assepsia é essencial para se ter uma fermentação livre de problemas. Como observado na Tabela 2, ao se obter a quantidade estimada de bastonetes presentes no processo é possível mensurar, de acordo com a literatura, as perdas na produção de etanol (KELSALL E LYONS, 2003).

Tabela 2 – Relação estimada entre o número de bactérias na fermentação etanólica e respectivas perdas equivalente em etanol

Bactérias viáveis (UFC/mL)	Perda de etanol ¹ (% v/v)	Perda equivalente de etanol ² (litros)
10 ⁵	0,1 – 0,2	303.000
10 ⁶	0,2 – 0,4	848.000
10 ⁷	0,6 – 1,0	2.120.000
10 ⁸	0,9 – 1,2	2.544.000
10 ⁹	1,0 – 1,5	3.180.000

Fonte: Adaptado de Kelsall e Lyons, 2003

¹ Depende da linhagem da bactéria láctica.

² Perda máxima calculada com base em uma produção de 151.000 m³/ano.

Além disso a presença de ácido acético em altas concentrações e com valores de pH do meio baixos pode também interferir na regulação do pH interno da célula, da mesma forma que acontece com o ácido láctico. No entanto o acúmulo de ácido acético dentro da célula tende a ser mais prejudicial para a levedura, pois ao se dissociar, este não consegue passar pela membrana plasmática de volta para o meio, e no interior da célula o ácido acético dissociado afeta a absorção de fósforo e a atividade enzimática ocasionando na inutilização do metabolismo celular e levando a levedura a morte. Deste modo recomenda-se trabalhar com níveis de pH do meio um pouco mais altos a fim de proteger as células de levedura do estresse ácido (PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 1989).

3.5 Fatores de Contaminação e Estresse

Durante o processo de fermentação, diversos fatores podem influenciar diretamente o desempenho, fatores como o pH, aditivos químicos (ácidos, por exemplo), temperatura, biocidas, antibióticos, nutrientes, sais minerais e contaminações microbianas são algumas das possíveis causas que podem afetar direta ou indiretamente as propriedades das leveduras e por consequência influenciar na produção de etanol.

3.5.1 Ambiente

As leveduras são compostas principalmente de um conjunto de macromoléculas (proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e lipídios) assim como uma série de íons inorgânicos (Mg²⁺, K⁺ e outros) que apresentam papel estrutural e fundamental no funcionamento metabólico. A manipulação desses componentes fundamentais (vitaminas,

aminoácidos, ácidos e outros) no meio produtivo afeta diretamente o crescimento e produtividade das leveduras. A utilização da espécie *S. cerevisiae* em processos industriais muitas vezes implicam na utilização de fontes externas de carbono, nitrogênio, sais minerais e vitaminas, uma vez que, tais componentes estão diretamente ligados e estabelecem condições importantes para regulação do desenvolvimento celular. (LIMA et al. apud MEDEIROS, 2019).

Condições nutricionais favoráveis proporcionam o desenvolvimento saudável da levedura e altos índices de produção de etanol, visto que, a presença de elementos como o zinco (Zn), manganês (Mn), magnésio (Mg) e nitrogênio assimilável são fundamentais para a conversão de açúcar e aumentar a tolerância ao etanol no meio. Outros elementos como, o ferro (Fe), cálcio (Ca) e cobre (Cu) estão diretamente ligados ao crescimento e metabolismo celular, assim como também são essenciais para a tolerância da levedura as grandes variações do ambiente, tais como a pressão osmótica, pH, desidratação e hidratação excessivas. (LIMA et al. apud MEDEIROS, 2019).

3.5.2 Temperatura

O controle rigoroso da temperatura durante o processo fermentativo é um dos parâmetros cruciais que influenciam diretamente na saúde das leveduras e na conversão dos açúcares em etanol. Aplicar temperaturas entre 25 a 35 °C é fundamental quando se trabalha com organismos da espécie *S. Cerevisiae*, já que em condições de operação adequadas, fica evidente uma significativa melhora na produção de etanol, um aumento na taxa de crescimento específico das leveduras e eficiência do processo, assim como uma menor possibilidade de contaminação. No entanto, em temperaturas prolongadas acima dos 37°C, a taxa de crescimento específico máximo das células começa a diminuir à medida que as concentrações máximas de etanol também diminuem, isto é, estão inversamente relacionadas com a temperatura de fermentação (RIVIERA et al., 2006).

De acordo com Barbosa (2013), mostos a base de cana de açúcar com concentrações de 30% de sacarose (m/v) ajustados para trabalhar a 30°C demonstraram melhores resultados em comparação aqueles que foram ajustados para 37°C, indicando que a temperatura apresenta um papel significativo no processo fermentativo, uma vez que ao aumentar as concentrações de açúcar deve-se diminuir a temperatura para evitar a queda na viabilidade celular em consequência da maior produção de etanol pelas células de leveduras.

3.5.3 pH

A permeabilidade de alguns nutrientes essenciais nas células é influenciada pela concentração de H^+ no caldo de fermentação (ZABED et al., 2014). Mudanças no pH operacional no processo de produção de etanol podem induzir uma mudança na principal via de fermentação, além do pH do caldo influenciar na contaminação bacteriana, no crescimento das leveduras, na taxa de fermentação e na formação de subprodutos. Assim, é importante controlar o valor do pH na faixa de 4,0 e 5,0. Além dessa faixa, pode ocorrer desvio de parte do substrato para a formação de subprodutos, como ácido acético e ácido butírico, reduzindo a eficiência da fermentação alcoólica (LIMA et al., 2001).

Os valores de pH dos mostos industriais, geralmente, encontram-se na faixa de 4,5 a 5,5; mas, as leveduras mantêm uma homeostase de forma quase independente dos valores de pH do meio, por isso toleram o tratamento ácido. O tratamento ácido também provoca lixiviação de nutrientes tais como, N, P e K da levedura o que acaba ocasionando na elevação do pH. Embora o tratamento ácido se mostre estressante à levedura, ainda apresenta efeito benéfico de controlar a contaminação bacteriana, pois ocorre a redução significativa no número de bactérias (LIMA et al., 2001).

O ácido sulfúrico é um ácido mineral forte utilizado para o controle de pH nas cubas, além de ser um bactericida. Um pH baixo (ácido) restringe o crescimento da levedura e mantém sua viabilidade em torno de 90%, além de restringir a proliferação de bactérias. Um pH alto (alcalino) acelera o brotamento da levedura e proliferação de bactérias. O valor de pH utilizado industrialmente no inóculo da fermentação alcoólica utilizando caldo-de-cana é de 2,5 (CANDIDO, 2012).

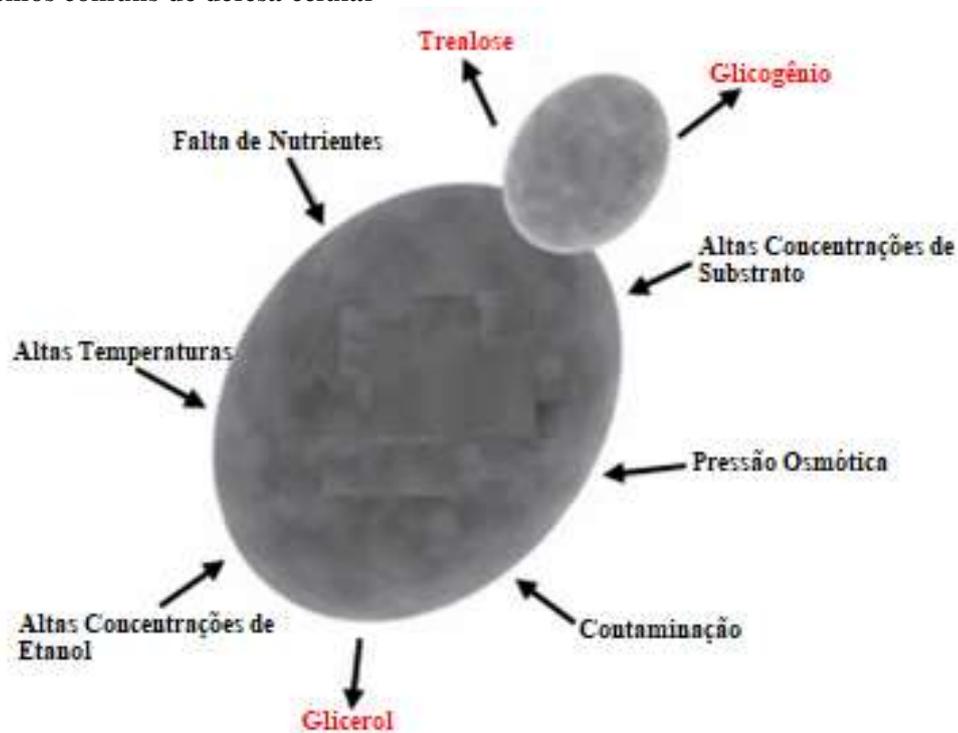
Cruz (2019), comparou o efeito do pH do inóculo no desempenho da fermentação, utilizando caldo-de-cana e pH de 2,5 e 4,5. Os resultados obtidos com o pH 4,5 foram inferiores a aqueles obtidos na fermentação realizada ajustando-se o pH do inóculo para 2,5. Este fato provavelmente justifica-se devido ao baixo pH do inóculo contribuir para a inversão da sacarose, disponibilizando os açúcares na forma de hexoses, glicose e frutose, prontamente assimiláveis pela levedura.

3.5.4 Estresse

Segundo Patrascu et al., (2009), as células de *S. Cerevisiae* quando em condições de estresse, sendo estes térmico, por exposições a altas concentrações de etanol ou outros

compostos, tendem a diminuir a taxa de crescimento e eficiência no processo de produção de etanol, tais respostas são um reflexo das leveduras as mudanças do meio onde se encontram, uma vez que a célula luta para sobreviver. Em condições adversas a levedura tenta reparar os danos e proteger suas estruturas internas, muitas vezes recorrendo a outras vias metabólicas, gerando então outros produtos, tais como o glicerol e trealose, como também optam por modificar a composição da parede lipídica da membrana plasmática, tais modificações na célula assim como a produção de outros produtos (glicerol e trealose) diferentes do habitual são um mecanismo de defesa aos efeitos das condições de estresse, tais produtos podem ser observados na Figura 3.

Figura 3 – Fatores estressantes que afetam as células de levedura na produção de etanol e mecanismos comuns de defesa celular



Fonte: Adaptada de Lopes et al., 2016.

O glicerol é produzido pela levedura como resposta a diferentes tipos de estresse, para reparar danos causados. Esse estresse pode advir de temperatura, pH, alta concentração salina, escassez de nutrientes ou, ainda, pela presença de metais pesados no meio (SNTA'ANA, 2009).

Condições de estresse osmótico também é responsável pela liberação de trealose, componente este responsável por auxiliar a célula a suportar o estresse osmótico provocado na presença de NaCl ou sorbitol. Segundo Alves (1994), na condição de limitação de açúcar a célula utiliza glicogênio como fonte de energia, enquanto a trealose está mais associada a proteção de enzimas glicolíticas em meio a desnaturação em situações de estresse, como também em manter a integridade e permeabilidade da membrana plasmática (RODRIGUES, 2014).

Na ausência de carboidratos convencionais, as leveduras utilizam-se da presença da Trealose e do Glicogênio para fornecer energia adicional para as suas funções (Ferreira et al., 1999). A trealose também desempenha papel importante como composto protetor da membrana plasmática, ajudando a célula a tolerar com mais facilidade a desidratação e altas concentrações de etanol, que são alguns dos fatores estressantes no processo industrial (RODRIGUES, 2014)

O glicerol assim como o etanol são fortes indicativos de que as leveduras presentes no processo estão em operação durante a fermentação, contudo a presença destes compostos fora do processo ou em concentrações muito altas podem ser um indício da presença de outros microrganismos, tais como as leveduras selvagens provenientes da própria cana, água não tratada e entre outras fontes, uma vez no processo, tais organismos invasores podem atrapalhar o rendimento da fermentação. A presença desses compostos em caldos e no mosto em concentrações elevadas é forte sinal de que medidas sanitizantes precisam ser tomadas, pelo risco de se perder a predominância das leveduras próprias do processo fermentativo da indústria.

4 MATERIAIS E METODOS

Nesta seção está demonstrado a metodologia aplicada para a análise do desempenho dos produtos durante o processo fermentativo. Os experimentos foram feitos no Laboratório Industrial da Unidade Açucareira Cruangi (Coaf) – localizada próxima ao município de Timbaúba no Estado de Pernambuco, e seguiram em sua maioria os métodos e processos já utilizados costumeiramente pelos analistas do próprio laboratório industrial.

4.1 Materiais e Reagentes

Para a realização dos experimentos foram utilizados os equipamentos e materiais citados abaixo:

- HPLC;
- Microscópio Eletrônico;
- pHmetro;
- Ultrapurificador (Água Milli-Q);
- Estufa;
- Dialquil-Metil-Amina (Ultranol – Biocida para Fermentação);
- Monoensina Micelial 11% (Maxper - Antibiótico);
- Azul de Metileno;
- Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*);
- Caldo de Cana.

4.2 Obtenção e Preparo das Amostras

As amostras de caldo-de-cana e de leveduras foram coletadas diretamente nos locais do processo da indústria, com o intuito de simular as condições da fábrica, o fermento foi obtido diretamente da dorna de pré-fermentação, isto é, diretamente após a saída da centrifuga e o caldo de cana foi obtido diretamente no tubo de alimentação da dorna. Após a coleta, ambos os materiais foram acondicionados juntos em béqueres com uma relação de 80% de caldo e 20% de fermento (Figura 4), os mesmos parâmetros utilizados no processo da indústria; os béqueres foram então identificados e receberam as respectivas dosagens dos produtos, sendo elas: 50ppm,

100ppm, 200ppm de Ultranol e 2ppm, 5ppm, 10ppm de Monoensina Micelial a 11% (Maxper). Para efeito de comparação, um béquer permaneceu sem adoção de nenhum dos dois produtos e foi identificado com amostra “Branco”. A Figura 4 ilustra as amostras preparadas e identificadas.

Figura 4 - Béqueres contendo as amostras preparadas e devidamente identificadas



Fonte: Autor, 2022.

Com todas as amostras devidamente preparadas, todas tiveram seus valores de acidez medidos e então levadas para uma estufa onde permaneceram sob a temperatura de 30°C e inalteradas pelo período de 8 horas (período normalmente adotado para o tempo de retenção adequado de um ciclo fermentativo).

4.3 Determinação de viabilidade, brotamento, número de células e razão de infecção

Decorrido o período na estufa, as amostras de vinho levedurado de cada teste, tiveram uma alíquota removida para a análise por parte do(a) microbiologista. O preparo da amostra seguiu conforme padrões do próprio laboratório industrial, com a utilização da técnica de coloração de azul de metileno (JONES et al., 1981). Na sua forma oxidada, o corante adquire a coloração azul e tornando-se incolor na sua forma reduzida. Neste método as células viáveis permanecem sem coloração, isto é, incolor, enquanto as células não viáveis apresentam coloração azul, facilitando a contagem através do microscópio. Dilui-se então o vinho levedurado dos testes em aproximadamente 10 mL de água destilada em um tubo de ensaio, junto com a adição de algumas gotas do corante e promoveu-se a homogeneização. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, uma parcela da mistura fora adicionada entre a câmara de

Neubauer e a lamínula previamente limpas com o auxílio de etanol a 70%. Preparado o sistema foi feita a contagem de células de leveduras vivas (incolores), leveduras e bastonetes mortos (coradas com azul). Através da contagem do microbiologista foram utilizadas as seguintes fórmulas para determinar os parâmetros desejados, para o número de bastonetes seguiu-se:

$$\text{Total de Bastonetes} / \text{Campos Contados} \times \text{Fator da Área} \times \text{Fator de Diluição} \times 10^5$$

Para determinar a viabilidade usou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Total de células vivas} / (\text{Total de Células Vivas} + \text{Total de Células Mortas}) \times 100$$

Para determinar o brotamento, utilizou-se a fórmula:

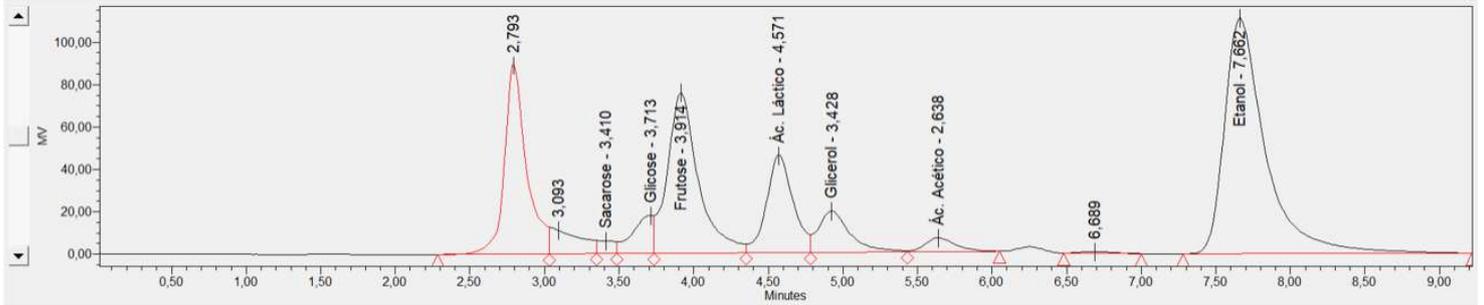
$$\text{Broto} / \text{Células Vivas} \times 100$$

4.4 Análise do HPLC

A análise utilizando o aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) serviu para quantificar a quantidade de glicerol presente em cada teste. Para cada uma das amostras foi coletada uma alíquota e pesado aproximadamente 1g com o auxílio de uma balança analítica. A amostra foi então diluída em água ultrapura (Milli-Q) com proporção de 1/10 (uma parte de amostra para 10 partes de água), a mistura foi filtrada com o auxílio de uma membrana de filtração Millex Millepore de 0,45µm para evitar interferências e/ou danificar a coluna de polímero (Shodex SH-1011) do aparelho HPLC; uma vez no aparelho as amostras foram submetidas a uma análise de 9.2 minutos, tempo este, onde a coluna do aparelho separa individualmente os diversos constituintes da mistura para identificação, quantificação ou obtenção da substância pura para outras finalidades. Tal separação dá-se por meio da passagem da amostra através de uma fase estacionária por intermédio de um fluido (fase móvel) (SARGAÇO, 2013).

Decorrido o tempo determinado para a análise, o próprio aparelho de HPLC conectado a um detector e a um software de leitura gera uma representação gráfica (cromatograma) em resposta a concentração do analito no efluente, podendo tal representação ser expressa de diversas formas, tais como, uma medida de concentração no efluente em função do volume de efluente ou do tempo. (Figura 5).

Figura 5 - Representação do cromatograma gerado após a separação dos componentes da amostra.

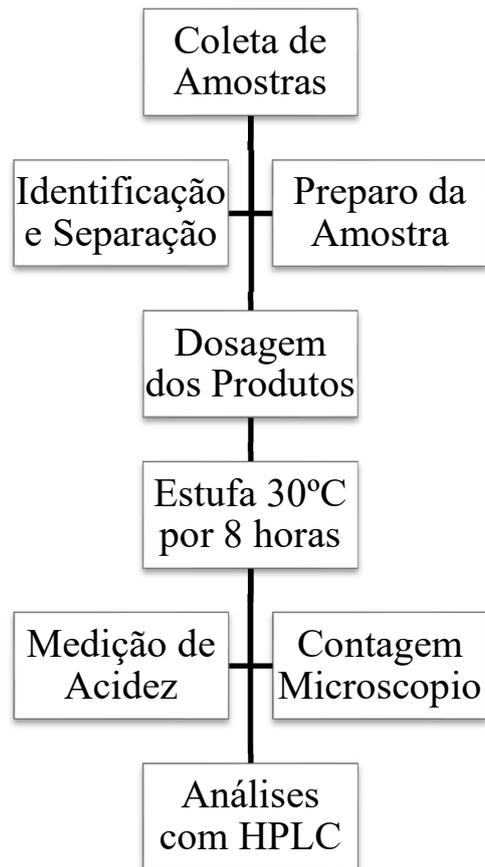


Fonte: Autor, 2022.

4.5 Fluxograma

Assim de maneira mais simplificada, a metodologia aplicada durante os testes é demonstrada nas etapas da figura 5.

Figura 6 - Fluxograma das etapas



Fonte: Autor, 2022.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisar os resultados das amostras de cada um dos padrões de vinho levedurado para cada concentração dos produtos foi apresentado os valores de pH, viabilidade, brotamento, fator de infecção e glicerol, tais valores foram dispostos em tabelas abaixo.

5.1 Amostra sem adição – Branco

A tabela 2 resume os valores obtidos para cada um dos testes propostos de pH, viabilidade, brotamento, fator de infecção e glicerol sem a adição dos produtos de teste para controle da infecção. O pH ácido observado é em decorrência da adição de ácido sulfúrico no meio como método de pré-tratamento contra contaminação bacteriana, a adição ocorre durante a saída da centrifuga e chegada na dorna de pré-fermentação. Os valores aparentemente baixos obtidos estão adequados segundo normatizações e testes da própria indústria, pois segundo Lima et al. (1986) o processo deve ter uma faixa de pH ótima entre 4 e 5.

Tabela 3 – Valores de pH, viabilidade, brotamento, fator de infecção e glicerol obtidos para a amostra sem adição de produtos (Branco)

	pH (2-3)	Viabilidade (>80%)	Brotamento (>12%)	Fator de Infecção	Glicerol (ppm)
1ª Amostra	2,45	56%	27%	$1,6 \times 10^8$	3197,897
2ª Amostra	2,19	75%	19%	$8,5 \times 10^7$	3149,522
3ª Amostra	2,24	61%	26%	$3,8 \times 10^7$	3428,248
4ª Amostra	2,26	71%	24%	$1,0 \times 10^8$	3666,784
5ª Amostra	2,48	77%	28%	$2,0 \times 10^7$	3651,657

Fonte: Autor, 2022.

A utilização de valores de pH ácidos é de extrema importância para minimizar o crescimento de agentes externos ao mesmo tempo que facilita a proliferação e crescimento da levedura. Souza (2009) explica que o uso de pH na faixa de 7,0 acarreta a diminuição significativa na produção de etanol e no aumento da formação de ácido acético e lático o que prejudica diretamente o rendimento do processo.

Os valores de viabilidade, brotamento e glicerol obtidos são reflexo de um processo fermentativo desfavorável para as leveduras, uma vez que, segundo Alves (1994) as células quando expostas a ambientes de estresse tendem a apresentar diminuição da viabilidade celular

e aumento na formação de glicerol e conseqüente aumento da etapa de brotamento como forma de proteção.

5.2 Amostra com adição de 50ppm (Ultranol)

Observando-se a Tabela 3, com a adição de 50ppm, é possível avaliar que as cadeias alqui hidrofóbicas presentes no Ultranol interagem com a bicamada fosfolipídica da célula e aumentando a permeabilidade da membrana, induzindo a destruição da célula pela ação de suas próprias enzimas. A ação do produto ocasiona a redução nos valores do fator de infecção e glicerol, ao comparar com as amostras da Tabela 2 onde não houve a adição de produto, resultado da ação inibitória do Ultranol.

Tabela 4 – Valores de pH, viabilidade, brotamento, fator de infecção e glicerol obtidos para a amostra com a adição de 50ppm de Ultranol.

	pH (2-3)	Viabilidade (>80%)	Brotamento (>12%)	Fator de Infecção	Glicerol (ppm)
1ª Amostra	2,57	76%	33%	$6,0 \times 10^7$	2597,543
2ª Amostra	2,36	68%	37%	$8,5 \times 10^7$	2610,628
3ª Amostra	2,39	73%	31%	$7,8 \times 10^7$	2968,445
4ª Amostra	2,43	81%	43%	$8,8 \times 10^7$	2932,356
5ª Amostra	2,38	89%	27%	$9,1 \times 10^7$	3069,674

Fonte: Autor, 2022.

5.3 Amostra com adição de 100ppm (Ultranol)

A Tabela 4 expressa os valores obtidos pela ação de uma concentração de 100ppm do Ultranol. Em comparação com os valores obtidos nas Tabelas 2 e 3 é significativa a redução nos valores do fator de infecção e glicerol assim como também o aumento no pH do meio.

Tabela 5 – Valores de pH, viabilidade, brotamento, fator de infecção e glicerol obtidos para a amostra com a adição de 100ppm de Ultranol.

	pH (2-3)	Viabilidade (>80%)	Brotamento (>12%)	Fator de Infecção	Glicerol (ppm)
1ª Amostra	3,18	80%	38%	7,2x10 ⁶	1237,738
2ª Amostra	2,93	79%	40%	6,5x10 ⁶	1159,423
3ª Amostra	2,86	83%	32%	7,0x10 ⁶	1143,841
4ª Amostra	3,23	73%	35%	8,6x10 ⁶	1372,293
5ª Amostra	2,98	85%	37%	7,7x10 ⁶	1296,314

Fonte: Autor, 2022.

5.4 Amostra com adição de 200ppm (Ultranol)

A Tabela 5 demonstra os resultados da utilização de 200ppm do Ultranol, que não demonstrou significativa melhora nos resultados quando comparados aos valores obtidos para 100ppm (Tabela 4). Tal como nos valores obtidos para 100ppm, houve um aumento no pH do meio e uma leve diminuição no fator de infecção e glicerol, contudo ocorreu o aumento dos valores de brotamento em decorrência do estresse do ambiente provocado pela alta concentração do produto.

Tabela 6 – Valores de pH, viabilidade, brotamento, fator de infecção e glicerol obtidos para a amostra com a adição de 200ppm de Ultranol.

	pH (2-3)	Viabilidade (>80%)	Brotamento (>12%)	Fator de Infecção	Glicerol (ppm)
1ª Amostra	3,28	88%	43%	2,6x10 ⁶	1012,243
2ª Amostra	3,17	86%	39%	3,5x10 ⁶	1094,162
3ª Amostra	3,11	77%	32%	2,8x10 ⁶	1063,172
4ª Amostra	2,97	79%	41%	4,6x10 ⁶	1136,918
5ª Amostra	3,26	91%	40%	3,7x10 ⁶	1084,367

Fonte: Autor, 2022.

Ao comparar os valores das Tabelas 4 e 5 ficou evidente que a utilização de dosagens maiores do Ultranol não refletira em maiores reduções da infecção e de glicerol.

5.5 Amostra com adição de 2ppm (Monoensina Micelial a 11%)

Para a Tabela 6 que demonstra os valores de 2ppm da Monoensina Micelial e comparando-a com a tabela 2, a amostra sem adição, é possível notar uma leve diminuição no fator de infecção e um aumento estável na viabilidade e no brotamento celular, contudo, as reduções de glicerol demonstraram-se inexpressíveis.

Tabela 7 – Valores de pH, viabilidade, brotamento, fator de infecção e glicerol obtidos para a amostra com a adição de 2ppm de Monoensina Micelial a 11%.

	pH (2-3)	Viabilidade (>80%)	Brotamento (>12%)	Fator de Infecção	Glicerol (ppm)
1ª Amostra	2,16	74%	29%	$7,2 \times 10^7$	2694,954
2ª Amostra	2,21	83%	33%	$6,4 \times 10^7$	2699,742
3ª Amostra	2,22	79%	30%	$7,7 \times 10^7$	2760,091
4ª Amostra	2,18	81%	34%	$8,3 \times 10^7$	2874,543
5ª Amostra	2,26	84%	32%	$6,9 \times 10^7$	2597,624

Fonte: Autor, 2022.

5.6 Amostra com adição de 5 ppm (Monoensina Micelial a 11%)

Comparando os resultados das tabelas 2 e 6 com os dados da tabela 7, que simboliza os resultados obtidos com a adição de 5ppm da Monoensina Micelial, é significativo o aumento no quesito de viabilidade e as diminuições do fator de infecção e glicerol, reflexo do aumento da concentração do produto.

Tabela 8 – Valores de pH, viabilidade, brotamento, fator de infecção e glicerol obtidos para a amostra com a adição de 5ppm de Monoensina Micelial a 11%.

	pH (2-3)	Viabilidade (>80%)	Brotamento (>12%)	Fator de Infecção	Glicerol (ppm)
1ª Amostra	2,31	76%	36%	4,6x10 ⁷	2261,997
2ª Amostra	2,25	82%	29%	3,7x10 ⁷	2178,676
3ª Amostra	2,19	80%	27%	4,4x10 ⁷	2240,522
4ª Amostra	2,36	88%	33%	4,1x10 ⁷	2227,669
5ª Amostra	2,19	74%	31%	3,5x10 ⁷	2189,673

Fonte: Autor, 2022.

5.7 Amostra com adição de 10 ppm (Monoensina Micelial a 11%)

Os valores demonstrados na tabela 8 foram obtidos com a utilização de 10ppm da Monoensina Micelial, em comparação com os resultados das concentrações anteriores, a utilização de 10ppm apresentou uma significativa melhora nos valores de viabilidade e uma expressiva diminuição dos fatores de infecção e glicerol, condições bem próximas do ideal para uma fermentação saudável.

Tabela 9 – Valores de pH, viabilidade, brotamento, fator de infecção e glicerol obtidos para a amostra com a adição de 10ppm de Monoensina Micelial a 11%.

	pH (2-3)	Viabilidade (>80%)	Brotamento (>12%)	Fator de Infecção	Glicerol
1ª Amostra	2,24	84%	26%	2,8x10 ⁶	1060,472
2ª Amostra	2,29	81%	30%	4,7x10 ⁶	1063,172
3ª Amostra	2,32	76%	34%	5,9x10 ⁶	1094,162
4ª Amostra	2,28	88%	29%	6,7x10 ⁶	1131,509
5ª Amostra	2,36	79%	32%	4,3x10 ⁶	1012,243

Fonte: Autor, 2022.

A viabilidade e o brotamento são índices importantes de serem quantificados, uma vez que, refletem diretamente a efetividade do processo fermentativo, em algumas situações a viabilidade apresentou valores abaixo da faixa de trabalho ideal da indústria (80%), no entanto

apesar da diferença dos valores não apresentarem uma diferença tão significativa, ficou evidente que as amostras com dosagens da Monoensina Micelial a 11% apresentaram melhores resultados neste aspecto.

O Fator de Infecção ou contaminação juntamente com o glicerol são neste caso, os fatores de maior representatividade, visto que estão diretamente ligados com a eficiência dos produtos. No setor sucroalcooleiro, mais especificamente em processos de fermentação a obtenção de níveis de infecção com valores entre 10^5 (células/mL) são considerados ótimos, contudo, a observação de níveis entre 10^6 (células/mL) são limites aceitáveis para o processo considerando que a contaminação sempre estará presente, podendo apenas controlar a sua intensidade (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006). Nas tabelas de amostras é possível observar a relação entre o aumento na concentração dos produtos e a redução no fator de infecção.

Os valores de glicerol obtidos por meio das análises do HPLC servem para demonstram o teor de estresse sofridos pelas leveduras, estresse esse sofrido por modificações no meio decorridos da competição por açúcares, presença de ácidos orgânicos (lático e/ou acético), pH e entre outros. Tais modificações estão muitas vezes relacionadas com a presença em excesso de organismos contaminantes, logo de modo análogo ao fator de infecção, os valores de glicerol observados demonstram significativa diminuição à medida que as concentrações dos produtos aumentam.

O controle das bactérias é fundamental para minimizar as perdas durante o processo de produção de etanol. Durante todo o processo de fermentação, as principais perdas estão diretamente relacionadas a presença de microrganismos contaminantes, o que muitas vezes afeta diretamente o rendimento na produção de etanol (PASCHOALINI; ALCARDE, 2009). A presença de contaminantes durante a etapa de fermentação pode ser controlada de forma eficiente com a utilização de produtos apropriados e com a acidificação do meio.

6 CONCLUSÃO

O emprego de ambos os produtos de ação antibacteriana estudados quando comparados entre si mostraram uma redução significativa do fator de infecção para as concentrações de 100 ppm do Ultranol e 10 ppm da Monoensina Micelial respectivamente, valores de concentrações abaixo das citadas (50 ppm e 5 ppm) obtiveram resultados satisfatórios nos quesitos estudados, mas inferiores aos resultados das concentrações intermediárias e mais altas. Por outro lado, a utilização de 200 ppm para o produto Ultranol, não demonstrou uma grande melhora na eficiência em relação a dosagem de 100ppm, logo a utilização de valores maiores do produto, para este caso, serviria apenas como gasto excessivo do Ultranol.

A redução nos níveis de ácido láctico obtidos em comparação a amostra de controle é reflexo da efetividade de ambos os produtos e suas determinadas concentrações assertivas. Um ponto importante e que não foi aplicado nos testes seria a utilização de um blender de ambos os produtos em concentrações menores e que poderiam por se só reduzir os custos da aplicação, como também proporcionar um espectro maior de alcance.

Para efeitos teóricos e tomando-se os valores médios de etanol recuperado após o tratamento em relação ao potencialmente perdido como ácido láctico, é possível estimar o balanço financeiro do tratamento. Ao se considerar um volume fermentativo de 260 m³ e um fator médio de recuperação, desprezando demais perdas (vazamentos, evaporação etc.) há a possibilidade de se obter aproximadamente 905 L de etanol para o volume estimado anteriormente. Com o valor do etanol recuperado de: R\$ 2920,43 (baseado na cotação de venda do produtor em março/2022 para etanol hidratado: US\$ 0,5684/L (R\$ 3,227/L)) e o custo do tratamento por dorna nas piores condições possíveis, teria uma variação entre Monoensina Micelial: R\$ 181,16 reais e Ultranol: R\$ 371,52 reais (Considerando-se para ambos o preço médio de US\$ 100/kg, convertidos em moeda local a taxa cambial de R\$ 4,787); O saldo de recuperação o etanol após o tratamento por dorna seria estimado em: R\$ 2.739,28 reais para a Monoensina Micelial e de R\$ 2.548,92 reais para o Ultranol.

Considerando um conjunto de 4 (quatro) dornas, como era o caso da unidade industrial de teste, é estimado um valor de recuperação de etanol diário de R\$ 10.957,10 para a Monoensina Micelial e de R\$ 10.195,66 em etanol para o Ultranol.

Com uma produção de 792 mil litros de etanol/safra e um coeficiente de infecção de 10⁵ geraria uma perda aproximada de 75 mil litros de etanol/safra. No entanto, com o coeficiente de 10⁷ essa perda seria estimada em 105 mil litros de etanol/safra, o tratamento utilizando o

Monoensina Micelial a 11% ao longo de 219 dias resultaria em um custo total de R\$ 39.674,04 de reais, por sua vez o tratamento com o Ultranol resultaria em um custo total de R\$ 81.362,88.

Ambos os valores dos produtos do tratamento são irrelevantes ao se considerar a recuperação possível de etanol ao se diminuir o efeito da perda por parte da infecção, neste sentido 30mil litros de etanol poderiam em teoria ser recuperados pela diminuição do fator de infecção de 10^7 para 10^5 no decorrer da safra, tal recuperação baseada na cotação do etanol, resultaria em uma diferença de R\$ 97.210,14 reais “perdidos” pela presença das bactérias lácticas no meio. Visto que ao descontar os custos dos produtos utilizados durante o período de safra ainda geraria um saldo positivo para a indústria entre aproximadamente R\$ 15.847,26 reais a R\$ 57.536,10 reais.

No entanto além do retorno financeiro, há que se contabilizar os ganhos indiretos provenientes de uma fermentação saudável, como menores taxas de floculação e consequentemente menores perdas de biomassa durante o processo de centrifugação do levedo, a possibilidade de se trabalhar com teores alcoólicos mais elevados, a viabilidade da levedura e fermentações mais rápidas.

De todo modo a utilização e o acompanhamento durante o processo fermentativo tende a minimizar as perdas de etanol por infecções, sendo a Monoensina Micelial um antibiótico indicado para usos alternados devido ao seu alto valor de comercialização e o Ultranol para utilização de forma contínua no processo, uma vez que além de um controle constante de agentes externos que afetam a produção de etanol por parte das leveduras, este também possibilita, em alguns casos, a elevação nos valores dos parâmetros de pH e que pode vir a possibilitar a diminuição parcial ou remoção total na utilização do ácido sulfúrico como meio de tratamento prévio, o que por si só, gera um excelente custo-benefício para a indústria, visto que o ácido sulfúrico é um dos insumos mais utilizados no processo fermentativo.

Apesar da redução do fator de infecção e o aumento no pH, a utilização do Ultranol como um biocida para a fermentação apresenta problemas relacionados com os subprodutos gerados posteriormente ao processo, uma vez que boa parte dos biocidas são agentes altamente poluentes. Logo, o emprego da Monoensina Micelial a 11% como agente antibacteriano é mais apropriado visando a relação custo-benefício e meio ambiente.

Outro ponto apresentado anteriormente, a relação estimada entre a quantidade de bactérias presentes na fermentação etanólica e as respectivas perdas equivalentes em etanol, isto implica na afirmação de que a diminuição de 2 a 3 graus de potência na quantidade de

bactérias lácticas presentes no sistema amenizaria as perdas do processo e resultaria em valores bastante expressivos em etanol final produzido.

REFERÊNCIAS

- ANDRIETTA, M. G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. Bioetanol–Brasil 30 anos na vanguarda. **Multi-Ciência: Revista interdisciplinar dos centros e núcleos da UNICAMP**, v. 7, p. 1-16, out. 2006. Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/art02_7.htm>.
- BRAUNBECK, M. D. W. de. **Efeito de biocidas sobre o comportamento de leveduras e o rendimento da fermentação**. 1988. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988. Disponível em: <<https://doi.org/10.11606/D.11.2019.tde-20191218-144955>>
- COSTA, E. R. (a). **Modelagem e simulação do processo de fermentação alcoólica na indústria sucroalcooleira**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, 2019. Disponível em <<http://hdl.handle.net/123456789/1391>> .
- COSTA, E. R. (b). **Acompanhamento e monitoramento da etapa de fermentação alcoólica na indústria sucroalcooleira Companhia Alcoolquímica Nacional – Grupo JB**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, 2019. Disponível em:
- COPERSUCAR. **Fermentação**. 1.ed. São Paulo: CTDI, 1987. 434p.
- COPERSUCAR. **Destilação**. 1.ed. São Paulo: CTDI, 1987. 507p.
- CRUZ, M. L. **Avaliação de condições operacionais na fermentação alcoólica VHG empregando diferentes cepas de Saccharomyces cerevisiae**. 2019. 119 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.321>>
- CHERUBIN, R. A. **Efeito da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP, Brasil, 2003, p.33. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde10092003144216/publico/rudimar.pdf>>
- DUNHAM, F. B.; BOMTEMPO, J. V.; FLECK, D. L. **A estruturação do sistema de produção e inovação sucroalcooleiro como base para o Proálcool**. Revista Brasileira de Inovação, v. 10, n. 1, p. 35-72, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.20396/rbi.v10i1.8649009>>.
- FREITAS, M. D.; ROMANO, F. P. **Tipos de contaminações bacterianas presentes no processo de fermentação alcoólica**. Bioenergia em Revista: Diálogos (ISSN: 2236-9171), v. 3, n. 2, p. 29-37, 2013. Disponível em: <<http://www.fatecpiracicaba.edu.br/revista/index.php/bioenergiaemrevista/article/view/103>>

FREITAS, M. D.; ROMANO, F. P. **Avaliação do controle bacteriano na fermentação alcoólica com antibióticos naturais**. 2012.70f. TCC (Graduação) - Faculdade de Tecnologia de Piracicaba “FATEC”, Piracicaba, 2012. Disponível em: <www.fatecpiracicaba.edu.br/revista/index.php/bioenergiaemrevista/article/.../pdf>

GIMENEZ, A. R.; ALTOPIEDI, L. G.; CARBALLO, N. V.; SILVA, L. C. M.; LIRIA, C. W. **O aumento da produtividade e a busca pela excelência na produção do etanol brasileiro: uma história de sucesso**. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 7, n. 2, p. e1472195, 2018. DOI: 10.17648/rsd-v7i2.270. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/270>.

GÓES-FAVONI, SILVANA PEDROSO; MONTEIRO, ANNE C. CARDOSO; DORTA, CLÁUDIA. **Fermentação alcoólica na produção de etanol e os fatores determinantes do rendimento**. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, Mai 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2018.004.0023>>

JONES, IA; JOSHI, LT. **Biocide Use in the Antimicrobial Era: A Review**. *Molecules*. 2021 Apr 14;26(8):2276. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules26082276>>

LANA, Rogério de Paula; RUSSEL, James B.; **Efeitos da Monoensina sobre a fermentação e sensibilidade de bactérias ruminais de bovinos sob dietas ricas em volumoso ou concentrado**. *R Bras Zootec*. Jan 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1516-35982001000100036>>

MEDEIROS, Suellen. **Fermentação Alcoólica Empregando Altas Concentrações de Açúcares**. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2019. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/24267/3/Fermenta%C3%A7%C3%B5esAlco%C3%B3licasEmpregando.pdf>>

MOURA, A. A. de O.; SILVA, B. V. **Estudo da influência de teor alcoólico de dornas, pH e brix em um processo fermentativo**. *GTS-Gestão, Tecnologia e Sustentabilidade*, v. 2, n. 2, 2019. Disponível em: <<http://www.faengrv.com.br/gts/index.php/revistagts/index>>

NELSON, David L.; COX, Michal M. **Princípios de Bioquímica de Lehniger**. Artmed, 2018. Disponível em: <<https://www.livrebooks.com.br/livros/principios-de-bioquimica-de-lehninger-7ed-david-l-nelson-michael-m-cox-nyr-dwaaqbaj>>

OLIVEIRA, G. M. de; SILVA, T. F.; NETO, J. I. H. T. (2020). Estudo dos impactos provocados por microrganismos no rendimento da fermentação alcoólica. *Brazilian Journal of Development*, 6(5), 30434–30448. Disponível em: <<https://doi.org/10.34117/bjdv6n5-484>>

PASCHOALINI, G.; ALCARDE, V. E. Estudo do processo fermentativo de usina sucroalcooleira e proposta para sua otimização. *Revista de Ciência & Tecnologia*, v. 16, n. 32, p. 59-68, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.15600/2238-1252/rct.v16n32p59-68>>

RODRIGUES, Leandro Nascimento da Silva. **Análise proteômica de paracoccidioides sp. em condições de estresse osmótico**. 2014. 74 f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014. Disponível em: <<http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/5934>>

SANTOS, E. Rebe. et al. **Gestão da qualidade e controle microbiológico na fermentação etanólica: estudo de caso em uma usina sucroenergética**. Anais do XI SIMPROD, 2019. Disponível em: <<https://ri.ufs.br/handle/riufs/12583>>

SANTOS, David Ferreira Lopes; REBELATO, Marcelo Giroto; RODRIGUES, Andréia Marize. **Análise da Viabilidade Econômica de uma Planta para Captura de CO₂ na Indústria Alcooleira**. *Revista Gestão & Tecnologia*, [S.l.], v. 12, n. 2, p. 64-88, dez. 2012. ISSN 2177-6652. Disponível em: <<http://revistagt.fpl.emnuvens.com.br/get/article/view/387>>.

SARGAÇO, Bruno Ruela - **Otimização e validação de um método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) para determinação do edulcorante ciclamato: ocorrência em adoçantes de mesa**. Lisboa: Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2013. Dissertação de mestrado. Disponível em: <<https://repositorio.ipl.pt/handle/10400.21/3305>>

SOUZA, S. C. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae***. 2004. 136 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto Butantã/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-05082009-171501/>>

SNUSTAD, D. P. – **Fundamentos de Genética** - Editora Guanabara Koogan, 7a edição, Rio de Janeiro, RJ, 2017. Disponível em: <<https://www.meulivro.biz/citologia-genetica/1815/snustad-e-simmons-fundamentos-de-genetica-7-ed-pdf/>>

VANZELLA, E. **Processo fermentativo na indústria sucroalcooleira**. Acta Iguazu. Cascável, v.3, n.1, p.50-58, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.48075/actaiguaz.v3i1.9627>>

VILLEN, R. A. **Mauá: Biotecnologia – Histórico e Tendências**. Escola de Engenharia de Mauá. Apostila. 2009. Disponível em: <<https://www.scribd.com/document/266646279/Biotecnologia-Historico-e-Tendencias>>

ZARPELON, F. **Destilação do etanol**. 1.ed. Piracicaba. STAB – Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil (Regional Sul), 2020. 65-80p.