



Fundação Educacional do Município de Assis
Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis
Campus "José Santilli Sobrinho"

CELSO PEREIRA DE ALMEIDA

**A INFLUÊNCIA DOS CONTAMINANTES NA FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA**

**ASSIS
2015**

CELSO PEREIRA DE ALMEIDA

A INFLUÊNCIA DOS CONTAMINANTES NA FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA

Trabalho de conclusão de curso de Curso apresentado ao Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, como requisito do Curso de Graduação.

Orientador: Prof^a.Ms. Gilcelene Bruzon

Área de Concentração: Química

ASSIS
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

ALMEIDA, Celso Pereira de

A influência dos contaminantes na fermentação alcoólica / Celso Pereira de Almeida.

Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA, 2015

97p.

Orientadora: Gilcelene Bruzon

Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis - IMESA

1.Contaminantes.

2.Fermentação

CDD: 660

Biblioteca da FEMA

A INFLUÊNCIA DOS CONTAMINANTES NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

CELSO PEREIRA DE ALMEIDA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto Municipal
de Ensino Superior de Assis, como
requisito o Curso de Graduação
analisado pela seguinte comissão
examinadora:

Orientadora: Prof^a.Ms. Gilcelene Bruzon

Ánalisador: Prof^o. Ms. Alexandre V. G. Mazalli

ASSIS
2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus e aos meus pais Osiel e Waldeide, e minha esposa Keila e minha filha Isabelli que sempre me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

A professora: Gilcelene Bruzon pela orientação e pelo constante estímulo transmitido durante o trabalho

Aos amigos, Odair, Leonardo, Elizeu, Jorge Dornelles, Carlos, Robson, e a todos que colaboraram direto ou indiretamente, na execução deste trabalho.

Aos familiares, ao meu pai Osiel, onde me deu força nas horas mais difíceis, sempre me incentivando e me encorajando, a minha mãe Waldeide que nunca deixou de estar do meu lado.

A minha esposa Keila e minha filha Isabelli que sempre me apoiaram, e em especialmente a Deus porque ele me deu força e paciência nesta luta, sem Deus tudo seria impossível.

Quem vive e
crê em mim
jamais morrerá.
Jesus Cristo

RESUMO

A fermentação etanólica é um processo conduzido por leveduras destacando-se o gênero *Saccharomyces*. Devido a alteração de temperatura, da acidez, da concentração de açúcares e de nutrientes, entre outros fatores, pode ocorrer o desenvolvimento de microrganismos além da *Saccharomyce cerevisiae*, como bactérias e várias outras espécies de leveduras, que passam ser considerados contaminantes. Através das análises microbiológicas são gerados dados para medidas corretivas ou preventivas, colaborando para identificar pontos críticos e os níveis de contaminação. Este trabalho tem como objetivo proporcionar um conhecimento mais aprofundado sobre a contaminação bacteriana no processo de fermentação alcoólica e verificar os principais pontos de contaminação do processo. Em momentos diferentes durante a safra foram coletados separadamente em frascos limpos mel, mosto antes do trocador de calor, mosto depois do trocador de calor, mosto no anel de entrada de mosto na dorna, vinho levedado na saída da dorna para centrifuga, vinho de levedado saído das centrifugas para os aparelhos de destilação, creme de levedura saindo da centrifuga para os pré fermentadores e fermento tratado com H_2SO_4 antes de bombear para as dornas. Para estas amostras foram determinadas a contagem de bastonetes, a viabilidade e a contagem de micro-organismos em placas. Foi constatado que no creme de levedura houve um aumento significativo de bastonetes em relação aos outros pontos, isto ocorreu devido a tubulação neste ponto não sofrer nenhuma assepsia. No experimento da viabilidade notou-se que com aumento da infecção, ocorreu gradativamente a redução da viabilidade. Portanto é importante que a indústria mantenha uma assepsia de qualidade em todo o processo, ocasionando redução de gastos com insumos e antibióticos.

Palavras Chave: Fermentação alcoólica, contaminantes na fermentação, levedura *Saccharomyce cerevisiae*

ABSTRACT

Ethanol production is a process led by highlighting the yeast *Saccharomyces* genus. Due to change in temperature, acidity, the concentration sugars and nutrients, among other factors, there may be the development of microorganisms beyond *Saccharomyces cerevisiae*, such as bacteria and other species of yeast, passing be considered contaminants. Through microbiological analyzes are generated data for corrective or preventive measures, helping to identify critical points and levels of contamination. This paper aims to provide a more profound knowledge about bacterial contamination in the fermentation process and verify key process contamination of points. At different times during the harvest were collected separately into clean jars honey, wine before the heat exchanger, must after the heat exchanger, the wine must input ring in the vat, wine levurado off the vat for centrifuges, wine delevura- out of the centrifuges for the stills, yeast cream coming out of the centrifuge for pre-fermenting yeast and treated with H₂SO₄ before pumping to the vats. For these samples were determined rods count, viability and micro-organisms plate count. It was shown that the yeast-to cream a significant increase rods in relation to the other points, this occurred due to pipe this point not suffer ne-Gnuma aseptic. The viability of the experiment it was noted that with an increase in infection, occurred gradually reducing viability. Therefore it is important that the industry maintains a quality aseptic throughout the process, resulting in reduced spending on supplies and antibiotics.

Keywords: Alcoholic fermentation, contaminants in the fermentation, yeast *Saccharomyces cerevisiae*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Transformação da glicose em etanol e CO ₂	20
Figura 2 – Reação química para rendimento do álcool.....	22
Figura 3 – Reação da produção do etanol.....	23
Figura 4 – A molécula de sacarose sofre invertase gerando glicose e frutose.....	24
Figura 5 – Catalize feita pela zimase.....	24
Figura 6 – Etapas de transformação da glicose.....	25
Figura 7 – Fluxograma da produção de açúcar e álcool.....	28
Figura 8 – Ilustração de um misturador estático.....	29
Figura 9 – Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
Figura 10 – Microestruturas de uma levedura.....	31
Figura 11 – Reprodução da célula de levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
Figura 12 – Dornas utilizada na fermentação alcoólica.....	35
Figura 13 – Ilustra a fermentação batelada.....	36
Figura 14 – Esquema simplificado do processo Melle-Boinot de fermentação.....	37
Figura 15 – Esquema do processo de fermentação continua para produção de etanol.....	39
Figura 16 – Representa a ilustração de um processo semi-contínuo.....	40
Figura 17 – Filtro de centrifuga com imagem externa.....	41
Figura 18 – Filtro de centrifuga com imagem interna.....	41
Figura 19 – Demonstra a centrifuga de fermento.....	42
Figura 20 – Esquema de tratamento do levedo.....	43
Figura 21 – Fluxograma da produção de álcool hidratado.....	45
Figura 22 – Célula de bactéria com sua respectiva estrutura.....	50
Figura 23 – a e b – Leveduras isoladas e leveduras floculadas.....	56

Figura 24 – Trocador de calor aberto	57
Figura 25 – Trocador de calor fechado	58
Figura 26 – a e b – Placas incrustadas e placas limpas.....	58
Figura 27 – Spray ball utilizado na limpeza interior das dornas	65
Figura 28 – Pontos de coleta.....	70
Figura 29 – Gráfico da queda da % viabilidade em relação aumento da infecção	77
Figura 30 – Gráfico com a média do plaqueamento.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações de nutrientes minerais no mosto para se obter adequa da fermentação alcoólica	54
Tabela 2 – Indicadores e valores recomendados para a cana	60
Tabela 3 – Contagem de bastonetes em diversos pontos da fermentação.....	76
Tabela 4 – Análises de viabilidade do levedo em 3 pontos diferentes	76
Tabela 5 – Plaqueamento em diversas etapas do processo.....	79

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	19
2.1 DEFINIÇÃO	19
2.2 HISTÓRICO.....	20
2.3 PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DO ETANOL.....	21
2.4 A MICROBIOLOGIA NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DO ETANOL.....	25
3 ETAPAS DA PRODUÇÃO DE ETANOL.....	27
3.1 PROCESSAMENTO DA CANA DE AÇÚCAR	27
3.2 PRODUÇÃO DO ÁLCOOL.....	29
3.2.1 Preparo do mosto.....	29
3.2.2 A levedura	30
3.2.3 Características das linhagens de levedura usada nas destilarias brasileiras	32
3.2.4 Reprodução das leveduras.....	33
3.3 TIPOS DE FERMENTAÇÃO	34
3.3.1 Processo em batelada.....	35
3.3.2 Processo em batelada alimentada.....	36
3.3.3 Processo de fermentação contínua.....	38
3.3.4 Processo de fermentação semi-contínua.....	39
3.3.5 Filtros das centrifugas de fermento.....	40
3.3.6 Centrifugação	41
3.3.7 Tratamento do levedo	42
3.3.8 Destilação	43

3.3.9 Etapas finais	46
4 CONTAMINANTES BACTERIANO NA FERMENTAÇÃO	47
4.1 PRINCIPAIS ESPÉCIES DE BACTÉRIAS CONTAMINANTES.....	49
4.1.1 Bactéria	50
4.2 PONTOS POSSÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO	50
4.2.1 Solo.....	51
4.2.2 Cana.....	52
4.2.3 Armazenagem da cana.....	53
4.2.4 Lavagem da cana	53
4.2.5 Mosto.....	53
4.2.6 Temperatura.....	54
4.3 OUTRAS EVIDÊNCIAS DE CONTAMINAÇÃO	55
4.3.1 Cheiro	55
4.3.2 Espumas	55
4.3.3 Floculação.....	55
4.3.4 Trocadores de calor	56
5 CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	59
5.1 PRINCIPAIS PONTOS DE CONTROLE	59
5.1.1 Cana de açúcar	60
5.1.2 Lavagem da cana	60
5.1.3 Assepsia nas moendas.....	61
5.1.4 Tratamento do caldo	61
5.1.5 Água de boa qualidade	62
5.1.6 Sulfito	62

5.1.7	Uso do ácido sulfúrico.....	62
5.1.8	Antissépticos.....	63
5.1.9	Uso do dióxido de cloro.....	63
5.1.10	Mosto.....	64
5.1.11	Assepsia na fermentação	64
5.1.12	Spray ball	64
5.1.13	Antibióticos.....	65
6	AUTOMAÇÃO E CONTROLE NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO	67
7	MATERIAIS E MÉTODOS	69
7.1	CONTAGEM DE BASTONETES.....	69
7.1.1	Materiais.....	69
7.1.2	Métodos.....	69
7.1.3	Análises de Contagem de bastonetes	70
7.2	VIABILIDADE CELULAR DA LEVEDURA	71
7.2.1	Materiais.....	71
7.2.2	Métodos.....	72
7.2.3	Análises de viabilidade	72
7.3	PLAQUEAMENTO NAS ETAPAS DO PROCESSO	73
7.3.1	Materiais.....	73
7.3.2	Métodos.....	74
7.3.3	Análises de plaqueamento	74
8	RESULTADOS E DISCUSÃO	76
8.1	CONTAGEM DE BASTONETES.....	76
8.2	VIABILIDADE CELULAR DA LEVEDURA	76

8.3 PLAQUEAMNETO NAS ETAPAS DO PROCESSO	78
9 CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem investido em programas de combustível alternativo em substituição a gasolina, o que trouxe o título de primeiro país a desenvolver estes processos, como também o maior produtor de aguardente do mundo (ANDRIETTA, STECKELBERG, 2006).

Como toda a produção de álcool e de aguardente ocorre por via fermentativa, é fundamental, o conhecimento do processo que tem sido constantemente aprimorado, e os fatores que podem levar a sua contaminação. A fermentação etanólica é um processo conduzido por leveduras entre elas, o gênero *Saccharomyces*, representado por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, que tem se adaptado, muito bem, as condições industriais (NOBRE, HORII e ALCARDE, 2005).

Durante a fermentação alcoólica, etapa do processo de produção de álcool etílico, as leveduras convertem os açúcares presentes no substrato em etanol e gás carbônico. Nesta fase podem ocorrer vários problemas entre os principais merece destaque a contaminação bacteriana (CHERUBIN, 2003).

Devido a alteração de temperatura, acidez, concentração de açúcares e de nutrientes, entre outros fatores, há o desenvolvimento de microrganismos além da *Saccharomyce cerevisiae*, tais como bactérias e várias espécies de leveduras, que passam ser considerados contaminantes.

Os processos industriais de produção de álcool existentes no Brasil reutilizam o fermento em ciclos fermentativos consecutivos. Durante o processo de centrifugação os microrganismos contaminantes também são reciclados juntamente com o fermento e agravam os problemas associados com a contaminação bacteriana.

Dependendo do nível de contaminação, podem ser ocasionados problemas como: aumento da floculação, redução da viabilidade da levedura, redução de massa de fermento e a formação de produtos indesejáveis que ocasionam consumo de sacarose e de outros nutrientes presentes no mosto. Níveis elevados de contaminação também provocam muitos inconvenientes operacionais, como dificuldade de centrifugação, aumento do uso de ácido no tratamento de fermento, aumento do tempo de fermentação

e elevação de açúcares não fermentados que levam a reduções no rendimento da fermentação alcoólica.

É importante o conhecimento de fatores que possibilitem a redução dos problemas causados pela contaminação bacteriana, além das práticas usuais de tratamento ácido do creme de levedura e a aplicação de antibióticos (CHERUBIN, 2003).

Com o passar do tempo, houve mudanças no controle da contaminação devido a um rigoroso controle das etapas do processo industrial, que tem início desde a colheita, passando pelo armazenamento da matéria prima, extração do caldo, eficiência do tratamento térmico do caldo, assepsia das dornas, controle de temperatura da fermentação, tratamento do levedo, qualidade microbiológica da água de diluição do levedo e do mosto em tanques, tubulações, curvas e trocadores de calor (LUCIO, FRANCISCO, 2010).

Este trabalho tem como objetivo proporcionar um conhecimento mais aprofundado sobre a contaminação bacteriana no processo de fermentação alcoólica e verificar os principais pontos de contaminação do processo.

2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

2.1 DEFINIÇÃO

A fermentação alcoólica é um processo catabólico anaeróbico em que há a degradação de moléculas de açúcar, no interior das células de micro-organismo, até a formação de etanol e CO₂, havendo liberação de energia química e térmica. As leveduras são os microrganismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa (VOLPE, 1996).

O termo fermentação vem do latim “fervere” (ferver) onde entende-se um conjunto de reações bioquímicas provocadas por microrganismos que atacam os açúcares (glicose e frutose) do mosto transformando em álcool etílico e gás carbônico (FEDERICO, 2006).

Para uma melhor fermentação, o mosto (líquido açucarado) deve ser adicionado de modo contínuo nas dornas, sendo que sua quantidade deve ser controlada através da concentração do fermento (EMBRAPA, 2015). Após a adição do mosto ao fermento, a fermentação divide em 3 fases: a intermediária, onde as leveduras degradam os monossacarídeos eliminando o CO₂ favorecendo a multiplicação, a tumultuosa onde ocorre intensa liberação de CO₂ e a final, onde a quantidade de álcool atinge 10% do volume total, há intoxicação da levedura, finalizando a produção (CARRER, 2013).

As leveduras fermentam na ausência de oxigênio (anaerobiose), degradando parcialmente a glicose em etanol e dióxido de carbono (LIMA, 2001).

A levedura e outros microrganismos fermentam a glicose em etanol e CO₂. A glicose é convertida em piruvato pela glicólise e o piruvato é convertido em etanol e CO₂ em um processo de dois passos. Conforme representa a figura 1:

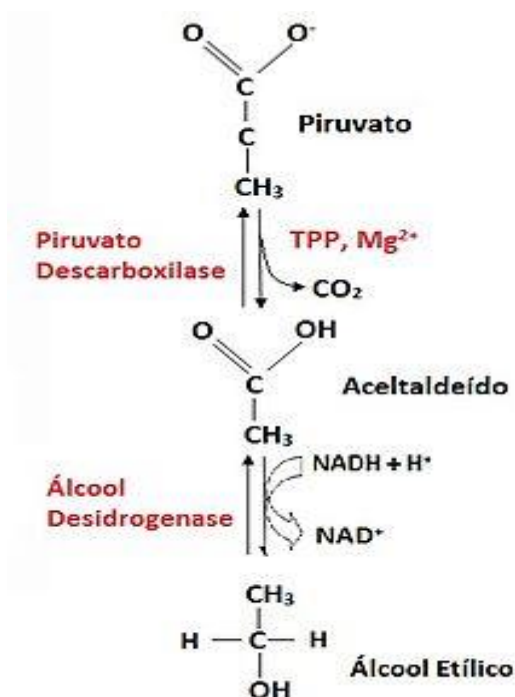


Figura 1: Transformação da glicose em etanol e CO₂ (In: MAIA, 2012).

No primeiro passo, o piruvato sofre uma reação de descarboxilação catalisada pela piruvato descarboxilase. A piruvato descarboxilase necessita de Mg²⁺ e tem uma coenzima firmemente ligada, a tiamina pirofosfato. No segundo passo, através da ação do álcool desidrogenase, há a redução do acetaldeído a etanol, com a NADH, derivado da atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (FASOLIN, 2005).

2.2 HISTÓRICO

Antes mesmo do ano 6.000 a.C., a produção de bebidas alcoólicas pela fermentação de grãos de cereais já era conhecida (VILLEN, 2009). Desde aproximadamente 9.000 a.C, os produtos de fermentação já eram usados. Os sumérios, egípcios antigos, assírios e babilônios, faziam uso nos alimentos como o vinagre e o pão (JÚNIOR, 2012).

Os primeiros estudos que abordavam sobre o mecanismo da fermentação alcoólica, observavam apenas à formação dos produtos inicial e final. No século XVIII, Black

realizou um estudo utilizando o álcool etílico e gás carbônico, sendo estes considerados os únicos produtos formados durante a fermentação alcoólica. Em 1789, Lavoisier realizou o primeiro estudo quantitativo da fermentação alcoólica, porém somente após 1857, Pasteur ofereceu uma explicação clara sobre a natureza da fermentação alcoólica, atribuindo-a, as leveduras. (PACHECO, 2010).

Em 1897, Eduard Buchner químico alemão demonstrou, pela utilização de leveduras, que a fermentação seria apenas uma sequência de reações químicas, sem a necessidade de oxigênio (ALMEIDA, 2009).

Durante as primeiras décadas de 1900, as pesquisas mostram que as reações enzimáticas eram responsáveis pela transformação química do açúcar em etanol e gás carbônico no interior da levedura (BORZANI, SCHMIDELL, LIMA e AQUARONE, 2001). A fermentação como processo industrial apresenta hoje uma importância crescente em diversos setores da economia, mais de 300 empresas de ramos diferentes por todo o mundo produzem e comercializam produtos obtidos através de processos fermentativos (VILLEN, 2009).

Atualmente, existe a possibilidade de captura de CO₂ gerado na fermentação alcoólica, onde o CO₂ passa ser comercializado pelas usinas para diversas aplicações industriais (SANTOS, REBELATO, RODRIGUES, 2012).

Centenas de produtos viáveis, podem ser obtidos através da via fermentativa como por exemplo os solventes, bebidas alcoólicas, alimentos, vitaminas, aminoácidos (VILLEN, 2009).

2.3 PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DO ETANOL

O processo de fermentação é realizado em dornas abertas ou fechadas construídas de aço carbono conforme cada destilaria (BASSETO, 2006). A figura 2 mostra o rendimento de etanol e a energia envolvida na fermentação de 100g de açúcar.

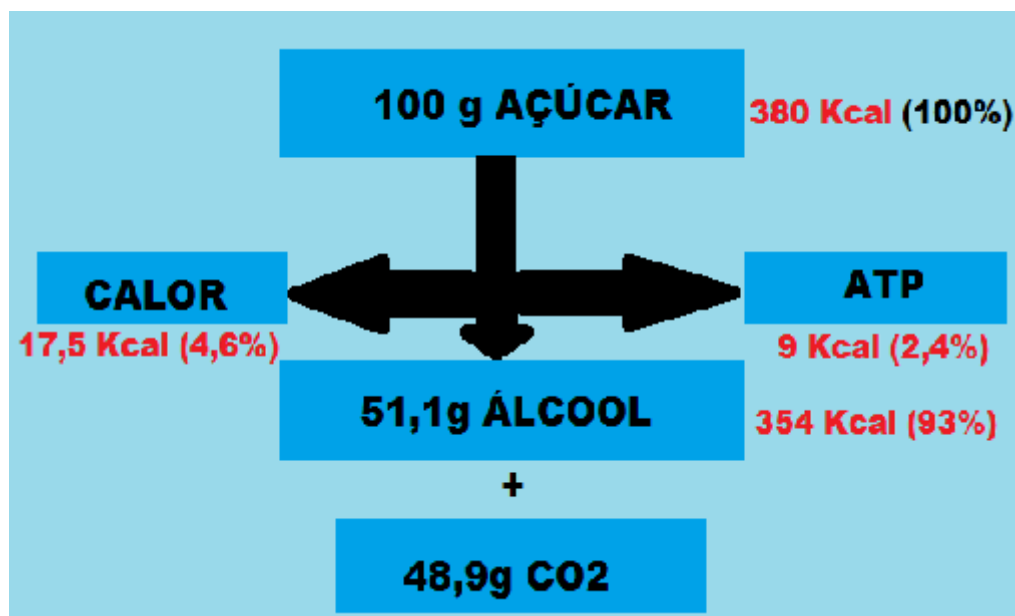


Figura 2: Reação química para rendimento do álcool (In: Basso, 2004).

Durante a fermentação é necessário manter a temperatura das dornas na faixa de 33°C, pois a reação de produção de álcool é exotérmica e temperaturas elevadas prejudicam o rendimento das leveduras e podem até matá-las. Para isso usa-se dentro das dornas um sistema de resfriamento composto por serpentinas ou trocadores de calor por onde passa água, mantendo-se assim o mosto em fermentação na temperatura ideal (PEREIRA, 2009).

Durante a reação, ocorre intensa liberação de gás carbônico, a solução aquece-se, e além do álcool, alguns subprodutos são formados tais como: glicerol, ácidos orgânicos, ácidos succínico, ésteres, aminas, etc. Além de espumas e também a floculação da levedura. Tais ocorrências provocam perdas no processo, por isso elas devem ser combatidas (VIEIRA, 2011).

Nas dornas, são adicionados alguns adjuntos para auxiliar a fermentação, como antibióticos, antiespumante, dispersante, nutrientes e uréia (BITANT, 2008).

Após o término da fermentação alcoólica em um processo industrial, as leveduras devem ser separadas do produto ou resíduo produzido. Estas são novamente utilizadas no processo, garantindo menor custo para reposição do fermento e melhores condições de operação, pois os microrganismos reciclados não necessitam de consumir

substrato para fase de crescimento e já estão adaptados ao meio. As células devem ser separadas do produto produzido também afim de evitar contaminação (LIMA, 2004).

As leveduras mais utilizadas na fabricação de bebidas alcoólicas e combustível geralmente são linhagens da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (CAETANO e MADALENO, 2011). A célula levedura possui no citoplasma celular um aparato enzimático no qual ocorre a transformação do açúcar em álcool e CO₂ (LIMA, 2001). A figura 3 mostra a reação da produção de etanol.

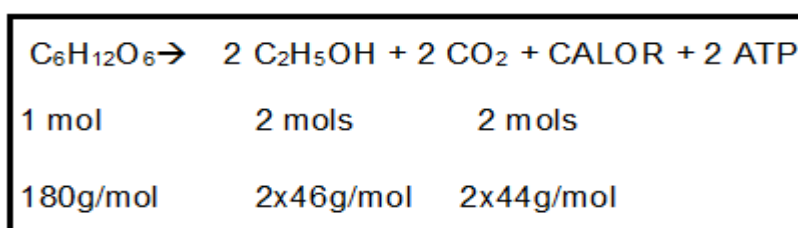


Figura 3: Reação da produção do etanol (In:docentes.esalq.usp.br)

Assim tem-se:

Rendimento em álcool = $(2 \times 46) / 180 = 0,5111g$ etanol / g de açúcar. Considerando a densidade do álcool a 20°C de 0,7893, temos:

Rendimento do álcool = $0,5111 / 0,7893$ etanol / g de açúcar = 0,6475g etanol

Portanto a fermentação alcoólica é um processo biológico conduzido pela levedura, cuja fisiologia e bioquímica tem sido negligenciada em favor de uma visão físico química e mecânica do processo. Porém trata-se de um organismo vivo, com múltiplas habilidades metabólicas, podendo alterar a estequiometria da fermentação em resposta a alterações no meio com grande impacto no rendimento do processo (BASSO, 2004).

Distingue-se as matérias açucaradas em diretamente e não diretamente fermentescíveis. As diretamente fermentescíveis: são as que contem monossacarídeos, como os sucos de frutas, sua importância reside na produção de álcool em bebidas alcoólicas como o vinho e a sidra. As não diretamente fermentescíveis: são as que contêm os dissacarídeos, que fermentam após hidrólise, a qual se dá o nome de inversão e que

se realiza naturalmente por ação da invertase, enzima produzida pela própria levedura (BORZANI, SCHMIDELL, LIMA e AQUARONE, 2001).

No caso da cana de açúcar, que apresenta alto conteúdo do açúcar sacarose, este é hidrolisado produzindo glicose e frutose pela enzima invertase (também chamada de sacarase) sintetizada pela *S. cerevisiae* (MARQUES, 2007). Como mostrado na figura 4:

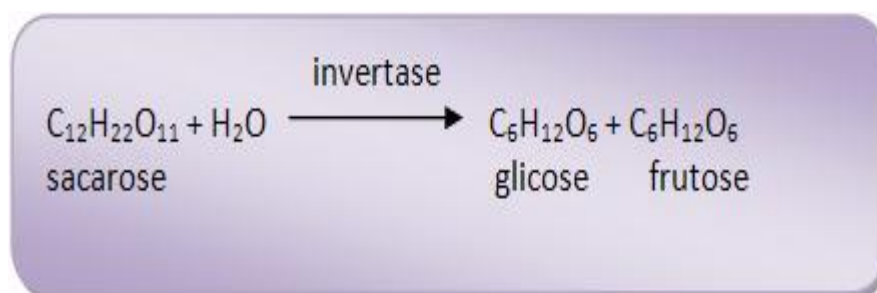


Figura 4: A molécula de sacarose sofre invertase gerando glicose e frutose (In: www.campusvirtual.ufsj.edu.br).

Em uma etapa seguinte, a zimase, outra enzima sintetizada pela *S. cerevisiae*, catalisa a reação de transformação da glicose e frutose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) em etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) e gás carbônico (CO_2) (PORTAL DO PROFESSOR, 2015). Como representada na figura 5.

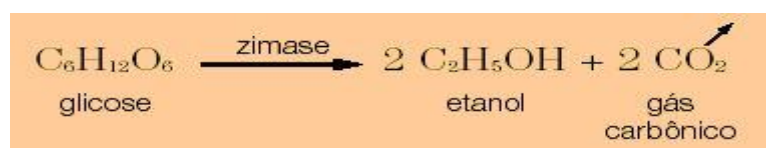


Figura 5: Catalize feita pela zimase (In: www.infoescola.com).

A fermentação é um processo que não utiliza oxigênio ocorre no citoplasma da célula (local onde existem as enzimas que intervêm neste processo), cujo objetivo é a obtenção de energia (GOMES, 2014). Consiste na degradação da molécula de glicose, como matéria inicial e numa sequência de reações que se agrupam em duas etapas.

Na primeira etapa: dá-se a degradação da molécula de glicose, por glicólise, que se transforma em ácido pirúvico ou piruvato, na segunda etapa: O piruvato é reduzido e transformado em outro produto, como álcool etílico ou etanol (fermentação alcoólica), ácido láctico (fermentação láctica) e ácido acético (fermentação acética), (VASCONCELOS, 2011).

Durante a glicólise a NAD (+) converte-se em NADH + H (+) e esta transporta elétrons e prótons que vão ser utilizados nesta segunda fase para reduzir o piruvato. O produto final desta redução vai depender do ser onde ocorre a fermentação. Há seres em que a redução do piruvato leva à libertação de dióxido de carbono (descarboxilação), como por levedura na fermentação alcoólica em que o produto resultante é o álcool etílico. Outros seres não há esta descarboxilação, como por exemplo nas bactérias do iogurte e nas células musculares do homem, trata-se da fermentação láctica e o produto é o ácido láctico (VASCO DA GAMA, 2012) (figura 6).

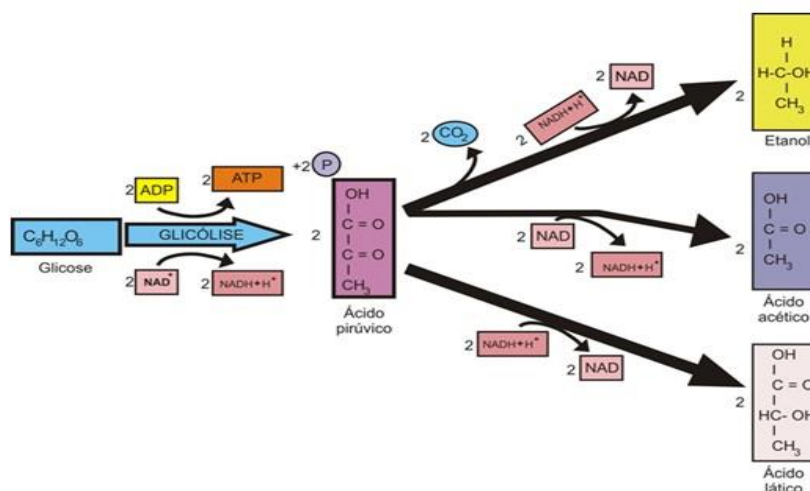


Figura 6: Etapas de transformação da glicose
(In:www.colegiovascodagama.com)

2.4 A MICROBIOLOGIA NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DO ETANOL

A microbiologia dentro da usina de açúcar e álcool, tem, portanto, um papel fundamental no controle de qualidade, desde a matéria-prima até o produto final (VIEIRA,

2012). As etapas do processo são monitoradas por pessoas capacitadas através de análises laboratoriais de modo a assegurar o padrão da qualidade desejada (USINA SÃO FERNANDO, 2015).

Através das análises microbiológicas obtem-se dados para medidas corretivas ou preventivas, no qual precisamos conhecer a microbiota e sua quantificação para identificar pontos críticos e níveis de contaminação (JORNAL DA CANA, 2014).

3 ETAPAS DA PRODUÇÃO DE ETANOL

3.1 PROCESSAMENTO DA CANA DE AÇÚCAR

A tecnologia de produção de etanol e açúcar é muito semelhante, porém em todas as usinas brasileiras há variações nos tipos e qualidades dos equipamentos, controles operacionais e, principalmente, nos níveis gerenciais. Há a preocupação com a otimização de toda a cadeia produtiva, assim nas unidades mais bem gerenciadas existe uma boa integração entre a parte agrícola e a industrial. O sistema de pagamento de cana em uso estimula o produtor a entregar a matéria-prima em boas condições, pois há penalidades ou prêmios dependendo da qualidade da cana, levando-se em conta o teor de sacarose e deságios pela matéria estranha mineral e os açúcares redutores presentes (NOVA CANA, 2015).

Na indústria, a cana pode ter dois destinos: produção de açúcar ou de álcool. Para a produção de açúcar, as etapas industriais são: Lavagem da cana; preparo para moagem ou difusão; extração do caldo, purificação do caldo (Peneiramento e clarificação); Evaporação do caldo; cozimento, cristalização da sacarose; centrifugação (separação entre cristais e massa cozida), secagem e estocagem do açúcar (ARAUJO, 2013).

Já a produção de álcool envolve as seguintes etapas: lavagem da cana, preparo para moagem ou difusão, tratamento do caldo para produção de álcool, fermentação do caldo, centrifugação, destilação do vinho, retificação (Desidratação: álcool anidro ou hidratado), (UDOP, 2015).

A figura 7 apresenta um fluxograma da produção de açúcar e álcool.

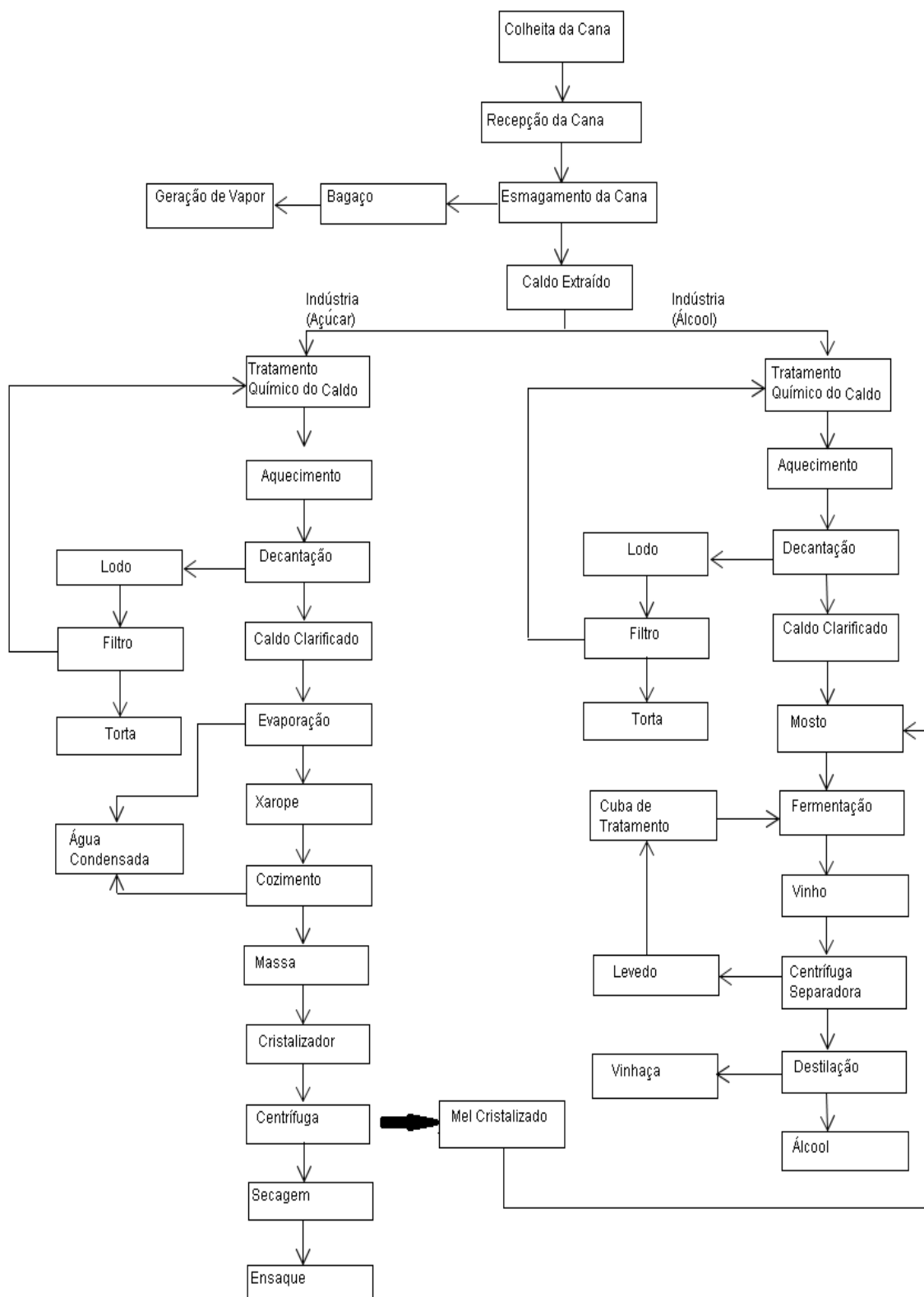


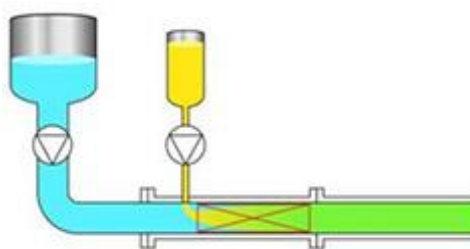
Figura 7: Fluxograma da produção de açúcar e álcool
(In: www.mecatronica.eesc.usp.br)

3.2 PRODUÇÃO DO ÁLCOOL

3.2.1 Preparo do mosto

O mosto é uma solução de açúcar cuja concentração foi ajustada de maneira a tornar a fermentação mais eficiente. O mosto é preparado a partir de méis, caldo e água com uma concentração final por volta de 16 a 23ºBrix (USINA MORENO, 2015).

Para o preparo são utilizados misturadores estáticos que usam a energia da corrente de fluxo para criar uma mistura entre dois ou mais líquidos ou gases, atingindo qualidade de mistura com baixa pressão (REVISTA GEINTEC, 2012) (figura 8).



**Figura 8: Ilustração de um misturador estático
(In:www.semcoequipamentos.com).**

Estes dispositivos são instalados diretamente na tubulação, passando o fluido pelas partes imóveis do misturador. Estes produtos são misturados somente pela energia presente no fluxo que, em contato com os elementos de mistura fixos, promovem continuamente redistribuição e separação dos mesmos. Para que seja obtida a mistura são utilizadas bombas para criar a energia presente no fluxo (SULZER, 2015).

Os misturadores estáticos são utilizados com eficiência em processos contínuos, reduzindo de forma acentuada os custos operacionais (REVISTA OSWALDO CRUZ, 2015), tendo como vantagem em relação aos equipamentos convencionais a economia, podendo os custos de investimento e de produção alcançar de 30% a 40% menos, levando-se em conta a economia de espaço da instalação, pois não necessita da

utilização de tanques. O processo de automatização reduz a necessidade de operadores, pois requer uma quantidade menor de sensores de temperatura e vazão (SULZER, 2015).

3.2.2 A levedura

A célula de levedura (figura 9) pode possuir diversas formas como globosas, esféricas, ovoides e alongadas, sendo as últimas as mais comuns. Sua morfologia pode ser alterada dependendo das condições em que estas são cultivadas, da reprodução vegetativa e a idade da cultura. Uma mesma espécie pode apresentar mais de um tipo de morfologia, dependendo do estágio de vida em que se encontra. Pode haver variação do tamanho das células de leveduras de acordo com a idade da cultura, sendo uniformes em culturas jovens de algumas espécies ou heterogêneas em outras (PELCZAR; et al; 1997).

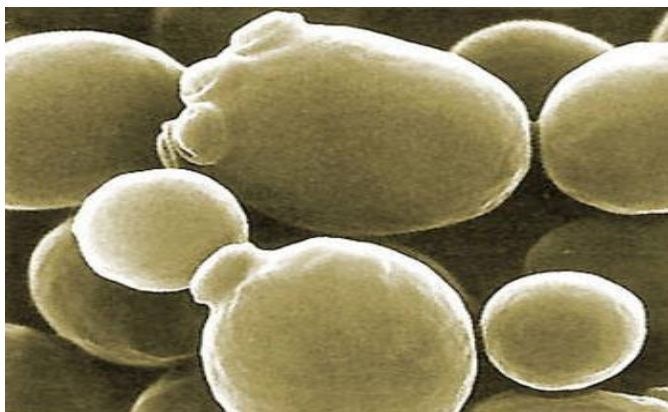


Figura 9: Levedura *Saccharomyces cerevisiae* (In:<http://lqes.iqm.unicamp.br>).

Geralmente as células das leveduras podem variar de tamanho entre 3 a 7 μm de largura e 5 a 16 μm de comprimento (SOUSA, SCABORA, SILVA e PRETONI, 2011).

Quanto a reprodução das leveduras, podemos citar: reprodução vegetativa (formação de brotos) ou reprodução por esporos (formação de esporos sexuais), (PELCZAR; et al, 1997).

As microestruturas (figura 10) que compõem a célula de leveduras são: parede celular, membrana citoplasmática ou plasmalema, núcleo, um ou mais vacúolos e a mitocôndria (SOUSA, SCABORA, SILVA e PRETONI, 2011).

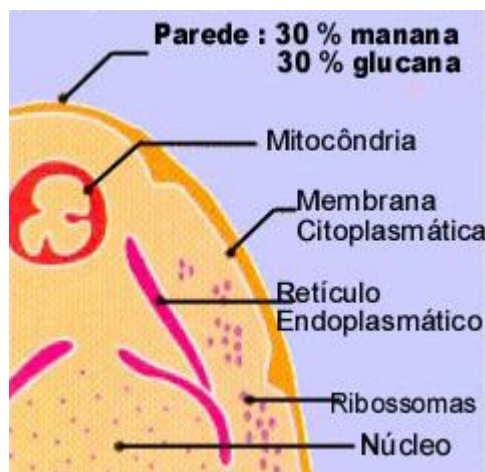


Figura 10: Microestruturas de uma levedura (In:www.districtcamp.com).

O objetivo da levedura é transformar anaerobicamente o carboidrato, para gerar ATP (adenosina trifosfato) que é uma forma de energia para sua multiplicação e sobrevivência (ANTÔNIO, 2010).

Como ocorre crescimento durante a fermentação, parte do açúcar consumido acaba sendo desviado para a produção de células, bem como para a formação dos chamados produtos secundários da fermentação (glicerol, ácidos orgânicos, álcoois superiores, etc (AMORIN, ZAGO, BASSO e GALLO, 1989).

As principais leveduras empregadas na obtenção do etanol via fermentativa são linhagens *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Kluyveromyces* (SÁ, 2012).

Durante a fermentação, as leveduras podem sofrer estresse em razão do meio, devido a deficiência nutricional, elevação de temperatura e contaminação ou pelo próprio metabolismo devido ao acúmulo de etanol e consequente inibição do crescimento celular

e produção de etanol. Alguns desses estresses afetam mais severamente as leveduras provocando a redução da viabilidade celular e diminuição da produção do etanol (NOBRE, 2007).

Hoje se tem conhecimento que a levedura propagada no início da safra é rapidamente substituída por levedura nativa, a qual habita o ambiente da cana-de-açúcar e é introduzida no processo. Essa substituição não é perceptível, apenas depois do advento da biologia molecular é que essa substituição foi registrada. Algumas espécies são benéficas para a produção; outras atuam prejudicialmente como microrganismos deteriorantes. A contribuição individual e coletiva destas leveduras selvagens varia de acordo com o número e diversidade de espécies presentes no mosto de fermentação (ANDRIETTA e STECKELBERG, 2006).

3.2.3 Características das linhagens de levedura usada nas destilarias brasileiras

Os processos fermentativos das destilarias brasileiras não possuem unidades de esterilização de mosto e equipamentos, ficando assim sujeitos às contaminações. No Brasil, trabalha-se com leveduras selecionadas, nativas ou selvagens (HENRIQUE, 2013).

As linhagens selecionadas são aquelas de forma pura, utilizadas como inóculo nas partidas das plantas. O fermento de panificação não pode ser considerado fermento selecionado, como linhagens selecionadas, utilizadas comercialmente, temos: SA1 (Santa Adélia-1), BG1 (Barra Grande-1), CAT(Catanduva) e PE-2 (Pedra-2), (PAPIN, 2009).

As linhagens nativas são aquelas encontradas no processo, que apresentam características fermentativas satisfatórias, sendo diferentes das selecionadas, (HENRIQUE, 2013).

As linhagens selvagens podem estar presentes nos processos que apresentam características fermentativas não adequadas aos processos industriais tais como: operação com baixa concentração de etanol, paradas prolongadas, paradas curtas ou

longas sequenciais, etc, e normalmente não são *Saccharomyces*, sendo consideradas oportunistas (ANDRIETTA, 2007).

Contudo, alguns contaminantes podem apresentar bom desempenho fermentativo, podendo ser selecionadas para atuarem como as leveduras do processo (CAMOLEZ e MUTTON, 2005).

3.2.4 Reprodução das leveduras

As leveduras do gênero *Saccharomyces* reproduzem-se de forma sexuada e assexuada. Quando se trabalha com meio de cultura relativamente rico em nutrientes, como nas fermentações industriais, a reprodução é realizada por processo assexuado, isto é, a multiplicação das leveduras ocorre por brotamento ou gemulação, do qual resultam células filhas, inicialmente menores que a célula-mãe. Já o processo sexuada pode ocorrer quando as condições do meio de cultivo se tornam extremamente desfavoráveis ao seu desenvolvimento. A reprodução sexuada se faz pela formação de ascósporos, isto é, esporos contidos no interior de uma asca (FILHO, NOGUEIRA, 2013).

Nos mostos em fermentação pode ocorrer a gemação de novas células. Neste processo ocorre a formação de pequenas protuberâncias na superfície da célula que, depois de se desenvolverem, se desprendem, passando a ter vida própria. Na esporulação de novas células, que consiste na formação de esporos no interior das células, as mesmas se tornam livres pela ruptura das células, (URBANO, 2012).

Durante a multiplicação de uma cultura, as células se dividem por mitose formando células idênticas a célula mãe por processo de brotamento. Pode haver cicatrizes de brotos, que são protuberâncias convexas, em forma de anel, ricas em quitina, que permanecem na superfície da célula-mãe após o brotamento da célula-filha (URBANO, 2012).

Em geral, a reprodução celular da levedura é assexuada e sua multiplicação é feita a partir de brotamentos, um processo ao qual a parede celular da célula mãe abre uma

minúscula saliência e da origem a uma pequena célula, denominadas célula filha (CORREA, 1992).

Na figura 11, é demonstrado um exemplo de reprodução de leveduras.

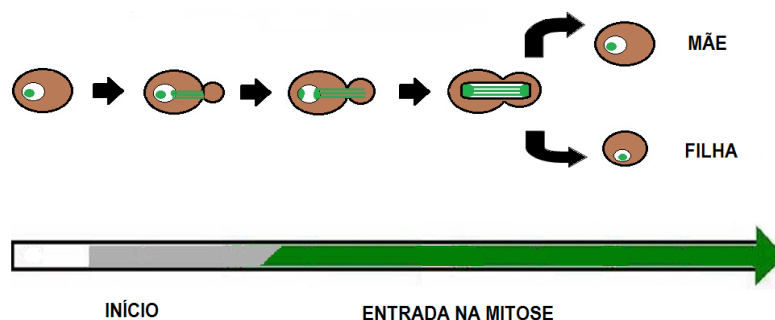


Figura 11: Reprodução da célula de levedura *Saccharomyces cerevisiae*
(In: Adaptado de CORREA, 1992, p.16).

3.3 TIPOS DE FERMENTAÇÃO

A fermentação pode ser conduzida de forma descontínua, semi-contínua, descontínua alimentada (ou batelada alimentada) ou contínua, todos podendo trabalhar com ou sem recirculação do fermento. Atualmente no Brasil, a maior parte da produção industrial de álcool em grande escala ocorre em processos fermentativos em batelada alimentada e contínuos (PACHECO, 2010).

O processo fermentativo é realizado em biorreatores (dornas) que são reatores de aço do tipo agitado, normalmente fechadas e mantidas a uma temperatura entre 33 e 35°C até o final do processo, quando a concentração de etanol se situa entre 7 e 12° GL (CORAÇA, 2012)

Nas dornas fechadas (figura 12) é usual a presença de um sistema de lavagem do gás de saída para recuperação de etanol evaporado (perdas por evaporação corres-

pondem a 1,5% de todo etanol gerado). No início da fermentação é utilizada alta concentração celular que atinge valores 10 a 100 vezes maiores que o inicial (concentração final de 10^8 células/ml) (DUARTE, LOURENÇO, e RIVEIRO, 2006).



Figura 12: Dornas utilizadas na fermentação alcoólica
(In: www.sermatec.com.br)

3.3.1 Processo em batelada

Esse processo também é conhecido como processo descontínuo onde prepara - se um meio de cultura adequado á nutrição e ao desenvolvimento do micro-organismo e também ao acúmulo do produto desejado; coloca-se este meio de cultura em um biorreator, adiciona-se o micro-organismo responsável pelo processo biológico. Após um determinado tempo de fermentação retira-se o caldo fermentado do reator e executam-se as operações unitárias necessárias para a recuperação do produto (SCHIMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

Terminada a fermentação, descarrega-se a dorna e o meio fermentado segue para os tratamentos finais. A dorna deve ser lavada e esterilizada para que seja recarregada com mosto e inóculo (BORZANI, SCHIMIDEEL, LIMA e AQUARONE, 2001).

O processo descontínuo é considerado o mais seguro no que se refere a manutenção e assepsia, pois, ao final de cada batelada, o reator (dorna) pode ser esterilizado jun-

tamente com um novo meio de cultura, recebendo um novo inóculo que deve ser submetido a todos controles necessários assegurando a presença apenas do micro-organismo responsável pelo processo (SCHIMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

Além do menor risco de contaminação, este processo apresenta grande flexibilidade de operação pela possibilidade de utilização dos fermentadores para fabricação de diferentes produtos, permitindo melhor condição de controle em relação a estabilidade genética do micro-organismo (CARVALHO e SATO, 2001).

A condução da fermentação alcoólica por processo batelada (figura 13) praticamente só ocorre em escala de laboratório e em pequenas destilarias de aguardente (PACHECO, 2010).

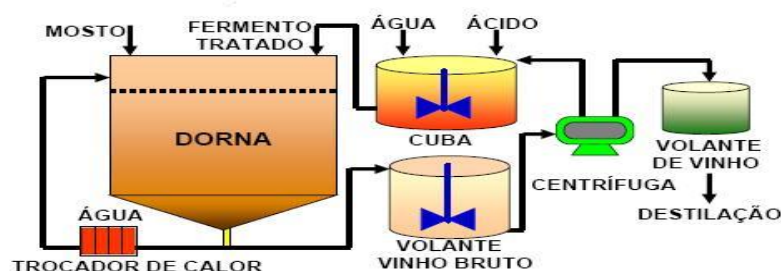


Figura 13: Ilustra a fermentação batelada (In:www.datamaq.com).

3.3.2 Processo em batelada alimentada

O processo de batelada alimentada tem importância tanto em escala industrial como em nível de pesquisa, também conhecido como processo por batelada alimentada ou, simplesmente, fermentação descontínua alimentada (BORZANI, SCHIMIDELL, LIMA e AQUARONE, 2001).

Os processos em batelada alimentada são eficientes na grande maioria dos processos fermentativos, inclusive na fermentação alcoólica. A produtividade é alta devido ao grande número de células viáveis no meio em fermentação. Na batelada alimentada

há a adição do substrato em momentos propícios, o que permite o controle da concentração de açúcar, minimizando os efeitos de inibição pelo substrato. (AMARAL, 2009).

Na batelada alimentada, os tanques precisam ser esvaziados ao término de cada fermentação sendo que alimentação da dorna e a retirada do produto ocorrem na mesma vazão (ALCOOLBRAS, 2006).

Não há estatísticas exatas, mas os pesquisadores acreditam que hoje o processo contínuo seja responsável pela produção de 25% a 30% do etanol fabricado no Brasil, o sistema batelada domina o mercado das operações fermentativas (ALCOOLBRAS, 2006).

Basicamente, o processo descontínuo alimentado é definido como uma técnica em processos microbianos, onde um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo e em que os produtos aí permanecem até o final da fermentação (BORZANI, SCHIMIDEEL, LIMA e AQUARONE, 2001).

O processo batelada alimentada (figura 14), também conhecida como “Melle-Boinot”, é um processo em que o substrato é alimentado sob condições controladas até atingir o volume do biorreator (dorna). Este processo, apesar de antigo, é muito satisfatório tanto na operação quanto na eficiência de conversão de açúcares e álcool (CARVALHO e SATO, 2001).

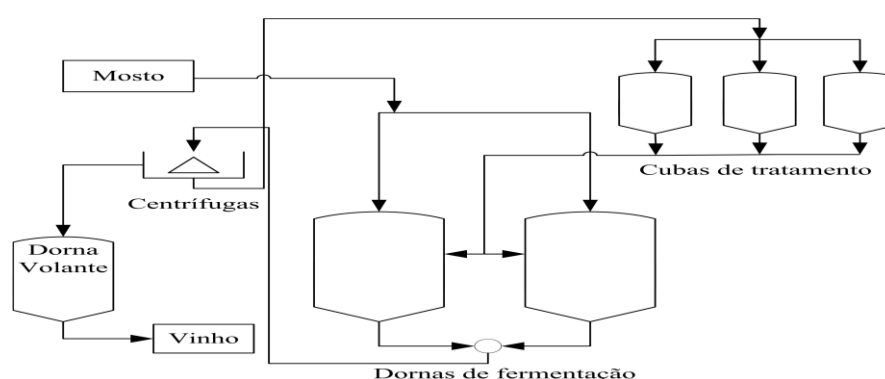


FIGURA 14 - Esquema simplificado do processo Melle-Boinot de fermentação (In: Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia; Vol.6; N11; 2010).

3.3.3 Processo de fermentação continua

O processo de fermentação continua possui uma alimentação continua e uma vazão constante, mantendo o volume constante através da retirada continua de caldo fermentado, afim de que o sistema atinja a condição de estado estacionário (BORZANI, SHIMIDELL, LIMA e AQUARONE, 2001).

O processo continuo de fermentação alcoólica pode ser dividido em três partes: Unidade de tratamento ácido, fermentadores, e unidade de separação de células (centrifugas) (VIEGAS, 2003).

Como não há possibilidade de haver vazão e alimentação idênticas, utilizam-se em geral sistemas de retirada de liquido por transbordamento (“ladrão”), de forma a manter o nível de liquido constante ou, empregar bombas de alta vazão na saída, acionadas intermitentemente, de forma a manter uma massa constante no reator (BORZANI, SCHIMIDELL, LIMA e AQUARONE, 2001).

Tal processo pode ser mais vantajoso que o de batelada ou batelada alimentada, pois inclui otimização das condições de processo para uma maior produtividade, período longo de produtividade contínua, maior produtividade volumétrica, maior uniformidade do produto, redução de custos laboratoriais, redução do tempo de limpeza e sanitização das dornas e maior facilidade de controle automático. A desvantagem é que as fermentações contínuas são mais suscetíveis a contaminação bacteriana por longos prazos de exposição (FACCIOTTI, 2001).

Os custos iniciais e de operação muito maiores exigem sistemas de controles mais sofisticados além de querer maior conhecimento do comportamento do micro-organismo em relação ao pH, temperatura, concentração de sacarose e álcool, concentração de biomassa, viabilidade celular dentre outros. (ATALA, COSTA e FILHO, 2000).

Na figura 15 segue um exemplo de fermentação continua.

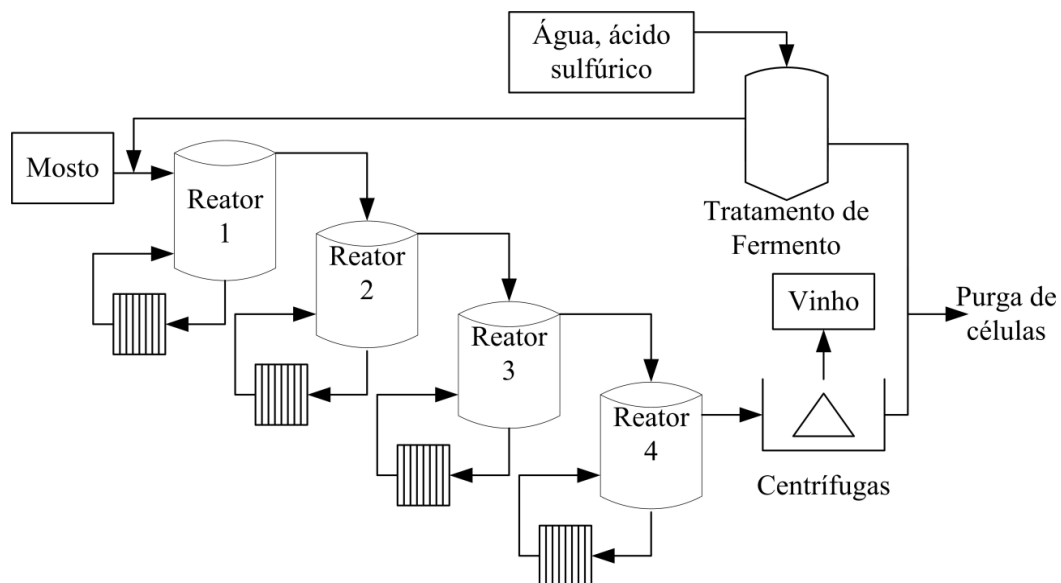


Figura 15: Esquema do processo de fermentação contínua para produção de álcool (In: Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia, Vol.6; N11; 2010).

3.3.4 Processo de fermentação semi-contínua

O processo fermentativo recebe a denominação de semi-contínuo (figura 16) quando, são colocados no reator o meio de fermentação e o inóculo, guarda-se o término da fermentação, retira-se a parte do meio fermentado, mantendo-se, no reator o restante do mosto fermentado, adiciona-se ao reator um volume de meio de fermentação igual ao volume do meio fermentado retirado anteriormente. (BORZANI, SCHIMIDELL, LIMA e AQUARONE, 2001).

Diferencia-se do processo descontínuo alimentado por ter uma recarga no fermentador de modo instantâneo (CAMARGO, 2015).

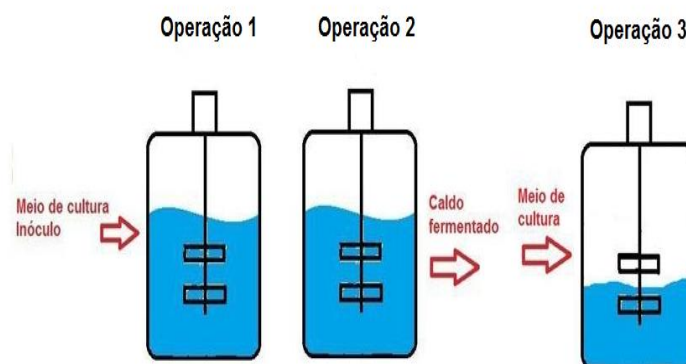


Figura 16: Representa a ilustração de um processo semi-contínuo (In:www.ufpel.edu.br).

O meio de fermentação adicionado na operação nº 3 encontra, no reator as células microbianas existentes no meio fermentado que nele foi mantido. O meio fermentado não retirado do fermentador na operação nº 2 serve de inóculo ao meio de fermentação alcoólica na operação nº 3. Reinicia-se, desse modo, a sequência de operações acima descrita, que será repetida enquanto não houver queda da produtividade do processo (BORZANI, SCHIMIDELL, LIMA e AQUARONE, 2001).

Tem como vantagens possibilidade de operar o reator por longos períodos de tempo (Meses), sem que seja necessário preparar um novo inóculo, e as vezes ter uma produtividade maior que a descontínua (CAMARGO, 2015). E sua maior desvantagem é o alto risco de contaminação devido aos longos períodos de cultivos (CENTRO CONHECER, 2010)

3.3.5 Filtros das centrifugas de fermento

Utilizados normalmente entre a dorna de fermentação e as centrifugas, os filtros atuam como elemento de segurança contra sólidos e materiais indesejáveis podendo causar entupimento das centrifugas e desgastes desnecessários, no qual comprometeria sua eficiência e rendimento (BITANT, 2008). A figura 17 mostra o filtro externamente.



Figura 17: Filtro de centrifuga com imagem externa
(In:www.prominasbrasil.com.br).

Já a figura 18 mostra o filtro internamente.

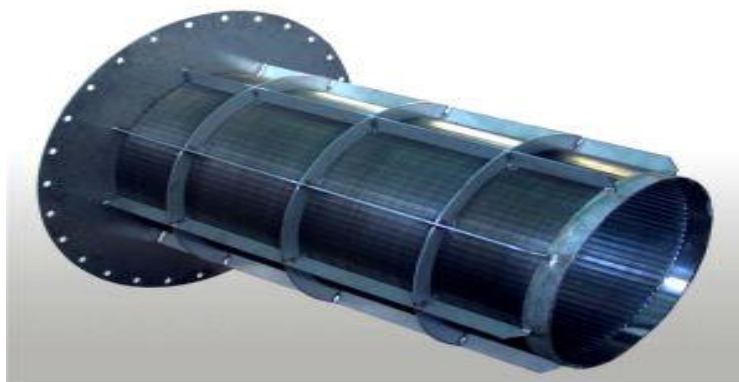


Figura 18: Filtro de centrifuga com imagem interna
(In:www.prominasbrasil.com.br).

3.3.6 Centrifugação

No processo de separação das células, usam-se centrifugas (FILHO, 2007). Nos processos convencionais usados por praticamente todas as cerca de 400 usinas brasileiras, o processo de separação do mosto do fermentado utilizado é a centrifuga onde ocorre a separação das leveduras e do vinho (FURTADO e SCANDIFFIO, 2006).

O principal objetivo desta etapa do processo é separar o levedo do vinho e retorna-lo a fermentação nas melhores condições possíveis. A separação é realizada por um rotor com boquilhas de descarga de sólidos (MAUSA, 2015).

O líquido em processo é alimentado continuamente no centro do rotor e é distribuído para a periferia deste, por meio do cone de distribuição. A alta rotação força este líquido a passar através de discos cônicos, onde é separado pela força centrífuga em fase sólida e uma líquida (CENTRIPAR, 2009).

Devido a força centrífuga das separadoras os fluidos com maior densidade se juntam na parede do corpo do rotor da separadora, logo em seguida as duas partes do fluido são descarregadas através de saídas separadas (ALFALAVAL, 2015). Como mostrado na figura 19



Figura 19: Demonstra a centrífuga de fermento
(In:www.alvoradabebedouro.com.br).

3.3.7 Tratamento do levedo

Após a centrifugação, o fermento passa por um tratamento, com agitação constante, para sua purificação e posterior reaproveitamento no processo. O volume de fermento é diluído com o mesmo volume de água e adicionado ácido sulfúrico para fazer a correção do pH (LIMA, 2001). As vantagens de se utilizar a centrifugação são devido ao fato de não gerar grandes volumes de torta seca, dificultando a assepsia do local e requerendo alta demanda de mão de obra, e por não causarem severos problemas de entupimentos (JÚNIOR e KILIKIAN, 2005). Esse processo de reciclagem de células

por centrifugação é conhecido como processo de Melle-Boinot (RIBEIRO, BLUMER e HORRI, 1999). A partir deste processo pode-se obter fermentações mais puras, devido ao pré-tratamento ácido do levedo; elevado rendimento alcoólico; maior rapidez da fermentação pelo maior teor de levedo recuperado; álcool de melhor qualidade; diminuição da contaminação bacteriana; menos incrustações nos aparelhos de destilação pela retenção do material orgânico pelas centrifugações. A figura 20 apresenta esquema geral do processo Melle-Boinot que consiste em fazer a reciclagem de células para as próximas bateladas de fermentações e pré-tratamento do fermento com ácido, conferindo um meio menos contaminado (BASSETO, 2006).

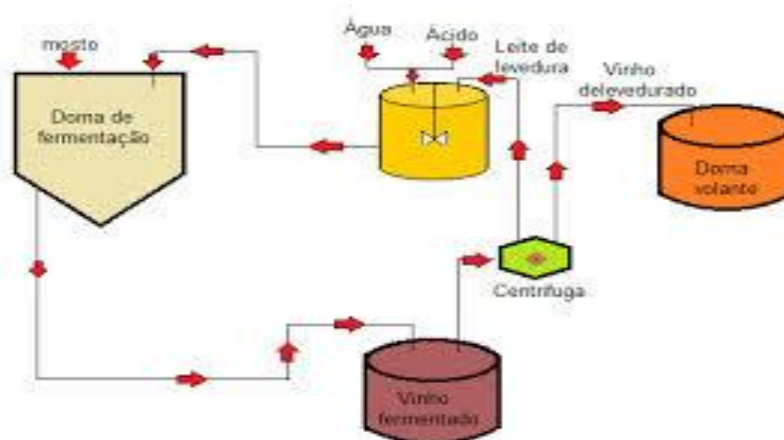


Figura 20: Esquema de tratamento do levedo (In:www.dspace.c3sl.ufpr.br)

3.3.8 Destilação

A destilação é utilizada na indústria química para separar componentes químicos em produtos purificados, a separação é obtida através das diferenças na volatilidade (tendência a se vaporizar) entre os vários componentes químicos da mistura. Por exemplo, uma mistura de etanol e água pode ser separada por destilação por que o etanol é mais volátil do que a água (JUNIOR, 2010).

A destilação é processada em três colunas superpostas: A, A1 e D. Nestas, o etanol é separado do vinho (inicialmente com 7 a 10°GL) e sai com a flegma vapores com 40 a 50°GL, (JUNIOR, 2012).

A destilação elimina ainda impurezas (ésteres e aldeídos). O vinho é alimentado no topo da coluna A1, descendo pelas bandejas e sofrendo a epuração, sendo a flegma retirada no fundo desta (bandeja A16) e enviada à coluna B, (REVISTA JATAI, 2012).

Os voláteis principalmente ésteres e aldeídos, são concentrados na coluna D e retirados no seu topo, sendo condensados em dois condensadores R e R1, onde uma fração deste líquido (90 a 95%) retorna ao topo D e outra é retirada como álcool de 2ª, com graduação de aproximadamente 92°GL (MECATRÔNICAATUAL, 2013).

A coluna A tem por finalidade esgotar a maior quantidade possível de álcool do seu produto de fundo, que é denominado vinhaça. Na retificação composto pelas colunas B1 e B, é concentrar a flegma a uma graduação de aproximadamente 96°GL e proceder a sua purificação com a retirada das impurezas que a acompanham, como álcoois homólogos superiores, aldeídos, ésteres, aminas, (MENEGUETTI, MAZERObA, 2010).

A flegma é alimentada na coluna B onde é concentrada e purificada, sendo retirada, sob a forma de álcool hidratado, duas bandejas abaixo do topo da coluna. Os voláteis retirados no topo de B passam por uma seqüência de condensadores E, E1 e E2, onde parte do calor é recuperada pelo vinho, uma fração do condensado é reciclada e outra retirada como álcool de 2ª (REVISTA JATAI, 2012).

Do fundo da B, é retirada uma solução aquosa chamada flegmaça, solução que é reciclada no processo ou eliminada. Os álcoois homólogos superiores, denominados óleos e alto, são retirados de bandejas próximas à entrada da flegma. O óleo alto retorna à dorna volante e o óleo fúsel é resfriado, lavado, decantado e armazenado para posterior comercialização (USINA ALCOESTE). A figura 21 mostra o fluxograma da destilação.

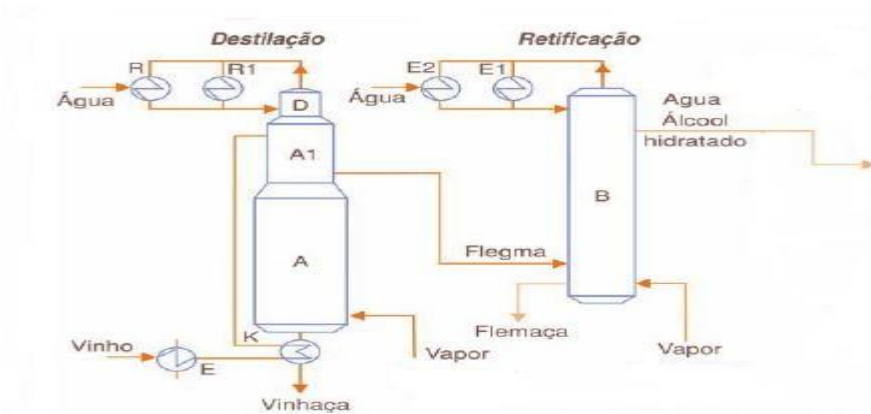


Figura 21: Fluxograma da produção de álcool hidratado (In:www.mecatronicaatual.com.br).

Finalmente, após a destilação, obtém-se o álcool hidratado, produzido dentro das normas do "CNP-IAA", isto é, com grau alcoólico entre 92,6° e 93,8° INPM, para ser utilizado como combustível. A destilação gera a vinhaça, de alta importância para a lavoura, pois é rico em sais minerais, mas que também é um agente poluidor de meio ambiente. Se não for tratada e usada de forma racional, pode poluir os rios, ameaçando a fauna e as populações que se abastecem dessa água. A produção de 01 litro de álcool acarreta a produção de 13 litros de vinhaça, que após depositadas em tanques naturais é enviada para a lavoura através de canais (UDOP, 2015).

O álcool a ser desidratado é inicialmente vaporizado e superaquecido antes de ser enviado para as colunas de desidratação, que contêm em seu interior um material constituído basicamente por hidrossilicato de alumínio contendo micróporos, denominado zeólita, mais popularmente conhecido como peneira molecular. Esta rede de micróporos absorve a água e deixa passar os vapores de álcool que são posteriormente condensados na forma de álcool anidro. Periodicamente é realizada a regeneração da zeólita pela passagem sob vácuo de vapores alcóolicos que são posteriormente destilados para recuperação do álcool neles contidos (JÚNIOR, 2012).

Neste caso são utilizados zeólitos denominados tipo 3A, significando que o diâmetro nominal dos microporos tem 3 angstroms (angstrom é uma unidade de medida que equivale a 10^{-10} centímetros) (DEDINI, 2015).

Visto que a molécula de etanol tem uma dimensão maior que 3 angstrons enquanto que a molécula de água tem dimensão menor que os 3 angstrons, a mistura alcoólica passando pela peneira molecular, deixa a água adsorvida por esta peneira e “presa” no interior dos poros e a do etanol, por ser maior passa pela peneira (SERMATEC, 2015).

3.3.9 Etapas finais

Os álcoois produzidos, hidratado e anidro, são quantificados através de medidores de vazão ou tanques calibrados e enviados para armazenagem em tanques de grande volume, onde aguardam sua comercialização e posterior remoção por caminhões (JÚNIOR, 2012).

4. CONTAMINANTES BACTERIANO NA FERMENTAÇÃO

No Brasil não é usual esterilizarem-se os mostos nas destilarias de álcool e de aguardente. Há uma redução dos microrganismos apenas quando se faz a clarificação do caldo por aquecimento, mas não é uma esterilização, pois após a clarificação, o meio é resfriado e colocado em dornas sem todos os cuidados necessários para manter um ambiente livre de microrganismos (BORZANI, SCHIMIDELL, LIMA e AQUARONE, 2001).

Um dos prejuízos causados pelas bactérias contaminantes no processo de produção de etanol é o consumo da sacarose que resulta na formação dos ácidos lácticos e acéticos como os principais ácidos orgânicos formados. Há também a influência dos metabolitos produzidos pelas bactérias contaminantes e a floculação de leveduras que são responsáveis por uma queda no rendimento alcoólico (NOBRE, 2007).

A indústria sucroalcooleira sofre o efeito do crescimento de contaminantes que causam perdas de açúcar ou desviam para outros compostos em lugar do etanol, o que representa prejuízos no rendimento industrial, podendo também causar problemas de ordem operacional ou inibir a levedura produtora de etanol (OLIVA-NETO, 1995).

Um dos grandes problemas durante o processo de produção de álcool é a sobrevivência de micro-organismos contaminantes após o tratamento térmico. Estes micro-organismos são responsáveis pela recontaminação do mosto desde a saída do decantador, passando pelos trocadores de calor, até a chegada às dornas de fermentação, onde há um aumento da população bacteriana (ALCARDE, 1995).

As fermentações conduzidas em presença de $5,0 \times 10^6$ bactérias, sendo que $5,0 \times 10^3$ eram produtoras de ácido, apresentaram rendimento 11,4% menor que quando estas não estavam presentes (ALCARDE e WALDER, 1997).

A formação de goma, que é um metabólito produzido pelas bactérias contaminantes, causa problemas operacionais na indústria por aumentar a viscosidade do caldo, causando entupimento nas tubulações, centrífugas, peneiras e trocadores de calor. Dentre os principais microrganismos produtores de goma estão espécies de *Bacillus*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus confusus* (ALCARDE, 2000).

TILBURY et al. (1977), avaliando perdas de açúcar com a formação de gomas em unidades industriais, relataram que estas podem alcançar até 3 kg por tonelada de cana-de-açúcar e citaram que 62% destas perdas estão associadas aos microrganismos contaminantes. SERRA et al. (1979) as bactérias que produzem gomas podem acarretar queda do rendimento da fermentação da ordem de 15%.

A flocculação do fermento (formação de flocos compostos de células de leveduras e bactérias) diminui a velocidade de fermentação, diminuindo a área de contato entre a levedura e substrato, causando problemas operacionais, tais como aumento de fundo de dorna e dificuldades na operação das centrífugas (NOBRE, 2005)

Apesar das bactérias do gênero *Lactobacillus* também serem citadas como possíveis flocculantes, no estudo realizado por Yokoya & Oliva-Neto (1991), utilizando diversas espécies e linhagens de *Lactobacillus*, verificaram que apenas algumas linhagens de *L. fermentum* foram causadoras da flocculação de leveduras ligada à presença da célula da bactéria.

O mecanismo de flocculação de leveduras por bactérias parece ser de natureza protéica, pois tratamentos com peptidohidrolases, tais como papaína, bromelina e ficina causaram reversão total ou parcial da flocculação. A atividade destas enzimas não causou alteração na viabilidade celular de *S. cerevisiae*, bem como não afetou o crescimento da bactéria flocculante *L. fermentum* (FREGUGLIA, 1997).

AMORIM et al. (1981) citaram que, quando a contaminação bacteriana atinge níveis superiores a $1,0 \times 10^7$ células/mL de mosto, pode ocorrer uma significativa queda no rendimento alcoólico. Assim o não controle da contaminação bacteriana pode ocasionar indiretamente um abaixamento no rendimento da fermentação pelo aumento da viscosidade do vinho, ocasionando uma maior perda do fermento no vinho centrifugado e pelo maior consumo de açúcar, desviando-o da produção de álcool (AMORIM & OLIVEIRA, 1982).

Desde que a fermentação industrial, pela dimensão do processo não é conduzida em condições de completa assepsia, a contaminação bacteriana, principalmente de *Lactobacillus* e *Bacillus*, está sempre presente e, dependendo de sua intensidade, com-

promete o rendimento do processo fermentativo. As altas temperaturas na fermentação favorecem a contaminação bacteriana, o aumento do tempo de fermentação e o estresse da levedura (BORZANI, SCHIMIDELL, LIMA e AQUARONE, 2001).

4.1 PRINCIPAIS ESPÉCIES DE BACTÉRIAS CONTAMINANTES

Durante o processo industrial de produção de etanol ocorre a sobrevivência de microorganismos após o tratamento térmico do caldo, fato que proporciona a contaminação do mosto desde a saída do decantador, passando pelos trocadores de calor, até a chegada as dornas de fermentação, onde há um expressivo aumento na população bacteriana (ALCARDE, 1995).

O pH relativamente baixo dos caldos das moendas favorece o crescimento de espécies consideradas acidófilas de gêneros como *Leuconostoc* e *Lactobacillus*. Por outro lado, em outras etapas, as altas temperaturas associadas ao pH favorecem alguns microrganismos termófilos esporulados (CHERUBIN, 2003).

Bactérias dos gêneros *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Leuconostoc*, e *Streptococcus*, São os contaminantes mais atuantes e geralmente associados aos fracassos da fermentação alcoólica devido a formação de ácido láctico e outros ácidos orgânicos, além de estarem associados a floculação (AMORIM & OLIVEIRA, 1982).

Foram feitas pesquisas em amostras de vinho de dornas em final de fermentação e identificou como as principais bactérias contaminantes presentes: *B. subtilis*; *B. megaterium*, *B. brevis*, *Acinetobacter*, *Calcoaceticus*, *Lactobacillus. SP*; *Micrococcus lylae*, *Leuconostoc mesenteroides*, e *Planococcus SP* (RONDINI, 1985).

Isolou-se e cultivou microrganismos de amostras de fermento centrifugado, fermento tratado com ácido sulfúrico, mosto, vinho inicial e vinho final proveniente das destilarias e identificou as principais bactérias contaminantes do processo: *Lactobacillus sp* (45%), *Leuconostoc mesenteroides* (14,4%), *Bacillus sp* (9,5%), *Acetobacter sp* (7,4%), *Enterobacter sp* (6,7%) e *Sporolactobacillus. sp* (3,6%), (ROSALES, 1989).

4.1.1 Bactéria

A bactéria (figura 22) é um microrganismo procarionte que pode apresentar 3 formas celulares que são: elipsóida / esférica, bastonetes e espiraladas / helicoidal. As formas esféricas variam de tamanho de 0,5 μm a 1,0 μm de diâmetro sendo que os bastonetes variam de 1,0 μm a 5,0 μm de comprimento e de 0,3 μm a 1,0 μm de largura. Estas características podem ser usadas para a caracterização das espécies bacterianas (PELCZAR et al; 1997). A célula bacteriana é composta por: parede celular, membrana celular, citoplasma, material nuclear e flagelo (em alguns casos), (ALMEIDA, 2014).

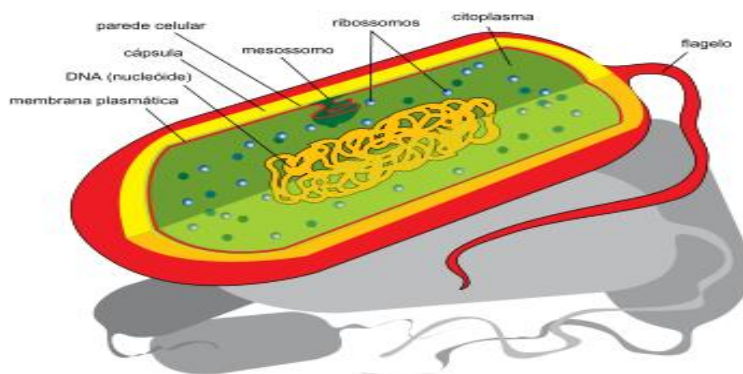


Figura 22: Célula de bactéria com sua respectiva estrutura
(In: www.portaldoprofessor.mec.gov.br).

Durante o crescimento bacteriano o processo mais comum de divisão celular (multiplicação) é a fissão binária (ALMEIDA, 2014).

4.2 PONTOS POSSÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO

Diversos fatores, físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração da levedura), afetam o rendimento da fermentação, ou seja, a eficiência da conversão de açúcar em etanol. Geralmente as quedas na eficiência fermentativa decorrem de uma alteração na estequiometria do processo, levando à maior formação de produtos secundários, especialmente glicerol e ácidos orgânicos, e biomassa (BORZANI, SCHIMIDELL, LIMA e AQUARONE, 2001).

No entanto, no decorrer de todas as etapas do processamento da cana o número de bactérias no caldo pode aumentar significativamente. Onde podem influenciar nesse processo como: a qualidade da matéria-prima (cana), o tempo prolongado entre o corte e a moagem, o tempo de queima, a forma de colheita, que pode ser manual ou mecanizada, determinando a quantidade de terra agregada, o armazenamento, as condições e variações climáticas, e até mesmo a falta de higienização nos equipamentos que ficam em contato com o caldo. Durante essas etapas, a cana pode sofrer lesões que favorecem a penetração de microrganismos nos colmos, agravando o problema (FERNANDES e VIEIRA, 2012).

Estes critérios devem ser compartilhado entre os produtores de cana que deve fornecer uma matéria prima de qualidade e a indústria que visa um bom rendimento e produto de qualidade.

4.2.1 Solo

Uma vez que o solo é o grande reservatório biológico de microrganismos, a contaminação que atinge a indústria, em sua maior parte, tem nele sua origem. A contaminação chega até a indústria mediante a terra aderida às raízes, caule, folhas, água, partículas carregadas pelas correntes aéreas, onde no corte os colmos ficam expostos facilitando a contaminação (CONHECER, 2010).

Foi constatado que as espécies de microrganismos (leveduras e bactérias) encontradas na indústria são as mesmas daquelas presentes no solo da lavoura de cana (ANDRIETTA, 2011).

4.2.2 Cana

A cana de açúcar é uma das maiores e mais antigas culturas agrícolas exploradas no Brasil, assumindo grande importância sócio econômica, e permanecendo em expansão com surgimento de várias usinas segundo levantamento da CONAB (2010).

A qualidade da cana é muito importante, pois ela é a principal entrada de contaminantes, além de outros fatores que podem influenciar no nível de contaminantes como: o tempo de queima, pragas (brocas, cupins, e etc.), tipo de colheita (manual ou mecanizada), influenciando na quantidade de terra que vem junto, armazenamento e o clima. Uma temperatura alta (800 a 1000°C) na queima durante a colheita poderá causar danos casca da cana possibilitando a entrada de microrganismos e sua contaminação (VALSECHI, 2006).

As impurezas da cana de açúcar podem causar, perda de capacidade de moagem e de extração, aumento do consumo energia no preparo da cana, desgaste de equipamentos, dificuldade para tratamento do caldo, dificuldade para fabricação de açúcar de qualidade, redução do rendimento da fermentação, problemas operacionais com a caldeira, redução na densidade da carga /aumento do custo de transporte (CETEC, 2011).

Há fatores intrínsecos e extrínsecos que influenciam na qualidade do caldo, os intrínsecos estão relacionados à composição da cana (teores de sacarose, açúcares redutores, fibras, compostos fenólicos, amido, ácido aconítico e minerais), sendo estes afetados de acordo com a variedade da cana, variações de clima (temperatura, umidade relativa do ar, chuva), solo e tratamentos culturais. Os fatores extrínsecos estão relacionados a materiais estranhos ao colmo (terra, pedra, restos de cultura, plantas invasoras) ou compostos produzidos por microrganismos devido à sua ação sobre os açúcares do colmo (EMBRAPA, 2015).

4.2.3 Armazenagem da cana

Normalmente, encontra-se nas unidades industriais o “pátio de cana”, que funciona como um estoque para atender as flutuações de entrega da matéria prima. A armazenagem pode ser feita até 24 horas, pois além desse tempo há uma deterioração acentuada da cana e conseqüentemente, um aumento do nível de contaminantes (MUTTON, 2003). A cana de açúcar é uma matéria prima altamente perecível, sujeita a decomposição bioquímica e microbiológica após sua colheita. As alterações estão relacionadas com variedade da cana, estado de maturação, geadas, estado de sanidade dos colmos, perdas por inversão e desenvolvimento de microrganismos onde a cana fica azeda causando grandes problemas a fermentação (FILHO e NOGUEIRA, 2013).

4.2.4 Lavagem da cana

A cana colhida inteira (corte manual) é normalmente lavada para diminuir as impurezas (que afetam negativamente o processamento da cana) na própria mesa de recepção da cana; no caso de cana picada (corte mecanizado), a cana não pode ser lavada, pois esta lavagem provoca perdas de sacarose, por isso algumas usinas estão começando a utilizar o sistema de limpeza a seco, baseado em jatos de ar sobre a cana (NOVA CANA, 2015).

4.2.5 Mosto

O principal problema do contaminante, em um mosto em fermentação, são a água para diluição, a transformação das matérias primas fermentescíveis para outras substâncias que não o produto desejado, reduzindo a produção, rendimento, produtividade do processo e ainda fazendo aparecer substâncias nem sempre desejáveis no final,

as temperaturas elevadas do mosto que ocasionam aumento da proliferação bacteriana; redução da viabilidade celular; queda no rendimento fermentativo, probabilidade maior de floculação (TELEKEN, 2014).

Para uma fermentação eficiente, é necessário que os nutrientes estejam em concentrações adequadas. A tabela 1 mostra valores recomendados para cada nutriente.

Mineral	Varição do mosto (mg/L)	Recomendação (mg/L)
N – assimilável (NH ⁴⁺ R – NH ₂)	7 - 350	100 – 300
Fósforo (P)	20 - 200	50 – 25
Potássio (K)	300 - 1200	700 – 1300
Magnésio (Mg)	80 - 3900	100 – 200
Enxofre (S)	80 - 3900	Abaixo de 100 - 20
Cálcio (Ca)	150 - 2000	Abaixo de 100 - 20
Zinco (Zn)	0,45 - 9	1 – 5
Cobre (Cu)	0,20 - 8	1 – 5
Manganês (Mn)	2 - 8	1 – 5
Alumínio (Al)	5 - 240	< 300 (mosto de caldo)

Tabela 1 – Concentrações de nutrientes minerais no mosto para se obter adequada fermentação alcoólica (In: AMORIM, 2005).

4.2.6 Temperatura

As leveduras são mesófilas. As temperaturas ótimas para a produção industrial de etanol situam na faixa de 33°C, mas, não raramente, a temperatura alcança 38°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 a toxidez do etanol. Por outro lado, temperaturas elevadas permitem maior perda de etanol por evaporação em dornas abertas. Tais aspectos justificam o controle da temperatura no processo industrial (BORZANI, SCHIMIDEEL, LIMA e AQUARONE, 2001).

A temperatura é uma das condições ambientais que mais afetam a atividade de microrganismos, influenciando no crescimento, metabolismo, capacidade fermentativa e viabilidade celular em leveduras (BATISTA, 2001).

Aumentos da temperatura de fermentação produzem uma forte diminuição da viabilidade celular, devido ao aumento das taxas de produção e acúmulo de álcool no meio e nas células (STECKELBERG, 2001).

4.3 OUTRAS EVIDÊNCIAS DE CONTAMINAÇÃO.

4.3.1 Cheiro

Quando a fermentação alcoólica se apresenta normal, o cheiro é penetrante, agradável, e característico, em função da matéria prima utilizada na preparação do mosto. Se fora deste padrão indica possíveis contaminações (FILHO e NOGUEIRA, 2013).

4.3.2 Espumas

Quando há contaminações as bolhas tornam-se maiores pela coalescência de bolhas menores e, quando se rompem, com dificuldade, já são grandes e irregulares em tamanho e forma, com certa opacidade, não mantendo o mesmo padrão, como no caso de uma fermentação normal. Adição de antiespumantes é prática generalizada na fermentação alcoólica industrial, como forma de controlar a quantidade de espuma durante a fermentação (FILHO e NOGUEIRA, 2013).

4.3.3 Flocculação

A flocculação é um fenômeno apresentado por leveduras, as quais se unem em agregados denominados flocos constituídos por várias células. A ocorrência da flocculação na fermentação alcoólica pode ser causada pela presença de linhagens flocculentas

do gênero *Saccharomyces* e por bactérias contaminantes. Nas usinas de álcool a contaminação bacteriana é considerada a principal responsável pela floculação do fermento (FURTADO e ALCARDE, 2010).

A contaminação bacteriana é o mais frequente agente estressante presente na fermentação. O maior efeito das bactérias na levedura e no rendimento da fermentação é físico, pois os flocos decantam no fundo da dorna ocasionando na centrifugação entupimento de bicos e canalizações, ocorrendo muita perda de levedura, diminuindo o rendimento (AMORIM, 2005).

A diversidade dos microrganismos e dos agentes envolvidos na floculação do fermento nas dornas de fermentação, e o grande volume de mosto manuseado durante a fermentação alcoólica industrial, tornam o controle do processo um desafio de grande importância e dificuldade (FURTADO e ALCARDE, 2010).

A Figura 23 mostra as leveduras isoladas (A) e a leveduras floculadas (B)

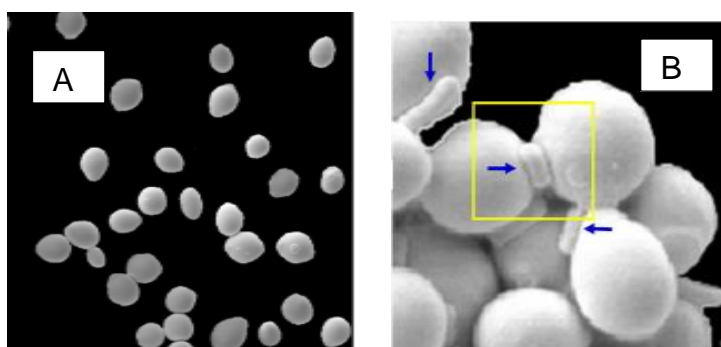


Figura 23: leveduras isoladas(A) e leveduras floculadas(B)
(In:www.unicentro.br).

4.3.4 Trocadores de calor

Os trocadores de calor consistem em uma série de finas placas corrugadas com gaxetas. Estas placas são comprimidas em uma estrutura, criando canais de passagem paralelos. Os canais são especialmente desenvolvidos para induzir a máxima turbulência em ambos os fluxos, para garantir a máxima eficiência na transferência de calor.

O fluxo é contra-corrente no qual um dos fluidos entra no trocador pela conexão superior, enquanto que o outro entra pela conexão inferior, garantindo melhores resultados nos sistemas de aquecimento ou resfriamento. Basicamente, a transferência de calor ocorre ao aproximar dois fluidos a temperaturas diferentes, desta forma um fluido aquece ou resfria o outro (ALFA LAVAL, 2014).

Os trocadores de calor apresentam inconvenientes como baixa velocidade do mosto, incrustações nas placas, focos de contaminação, principalmente bactérias e dificuldade de assepsia. Assim é de extrema importância a assepsia com flegmaça a 95°C (PINTO, 2014).

No trocador de calor pode ocorrer formação de biofilme, quando existe população bacteriana suficiente e podem ser secretados polímeros, que incrustam nas placas (ANDRIETTA, 2005).

A figura 24 apresenta trocador de calor aberto

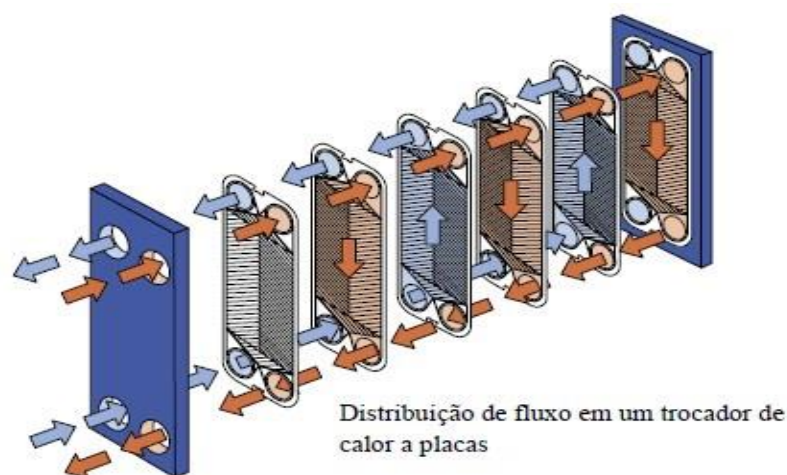


Figura 24: Trocador de calor aberto (In: www.alfalaval.com.br).

A figura 25 mostra o trocador de calor fechado



Figura 25: Trocador de calor fechado (In: www.alfalaval.com.br).

A figura 26 (A), mostra placa de trocador de calor com gomas e bactérias e a (B) mostra a placa do trocador após a limpeza.

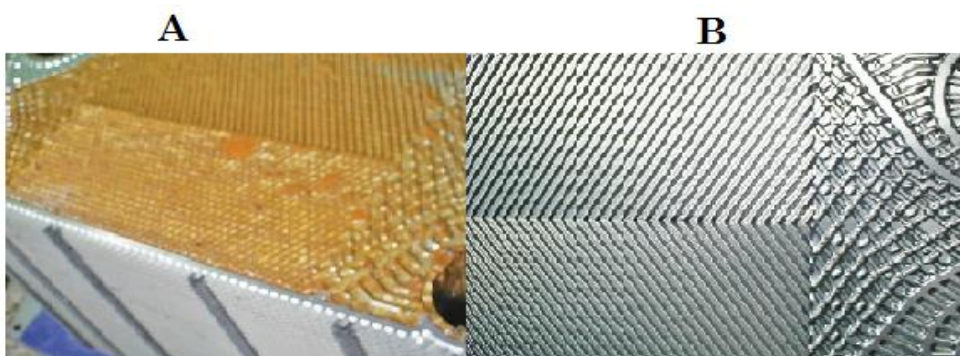


Figura 26: (A) Placas incrustadas (B) Placas limpas (In:www.oxiclina.com.br).

5. CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.

5.1 PRINCIPAIS PONTOS DE CONTROLE

Uma série de medidas podem ser adotadas para minimizar os problemas de contaminação. O primeiro cuidado é com a qualidade da matéria prima. Há a necessidade da utilização de água de boa qualidade para diluição do fermento e do mosto. O tratamento térmico do caldo deve ser realizado com regularidade, a temperatura de 110°C – 112°C ou superiores, que permite a redução de bactérias para níveis de 10^1 bactérias/ml. Recomenda-se detectar e eliminar os chamados pontos mortos, principalmente nas operações de resfriamento e distribuição do mosto (GALLO & CANHOS, 1991)

As dornas devem possuir preferencialmente fundo cônico (45°) e receber cuidadosa limpeza, fundamental para a assepsia do processo. Neste aspecto, mostra-se eficiente sua lavagem com o uso de bicos de alta pressão (MELLO, 2012).

Deve ser evitada temperaturas elevadas (acima de 35°C) pois favorecem a multiplicação de bactérias, reduzem a viabilidade do fermento e aumentam a acidez produzida durante o processo (PINTO, 2014).

A correta aplicação de insumos deve ser observada. No caso dos antibióticos, deve-se realizar previamente o teste de sensibilidade para determinar o produto mais adequado e o modo de aplicação, sendo recomendado só quando os níveis de contaminação ultrapassam 8×10^6 bastonetes/mL. O emprego de ácido sulfúrico também precisa ser bem estudado, pode afetar a viabilidade do fermento (GALLO & CANHOS, 1991).

A luta contra a contaminação bacteriana, no entanto, prossegue incansavelmente, apesar de todos os cuidados, novos focos sempre surgem e se espalham rapidamente no processo industrial. Para resolver em definitivo esse problema, o prof. Amorim considera que a tendência, no futuro, é a indústria trabalhar com mosto esterilizado. Este

procedimento já é viável tecnicamente, mas os empresários relutam em adotá-lo, por causa do seu alto custo (INOVATRONIC, 2008).

5.1.1 Cana de açúcar

Quanto menor o tempo entre a queima/corte da cana e a moagem, menor será o efeito de atividades microbianas nos colmos que ocorrem e melhor será a qualidade da matéria-prima entregue a indústria (VIAN, 2015).

A tabela 2 mostra indicadores e valores recomendados.

Indicadores	Valores recomendados
POL	>14
Pureza (POL/Brix)	>85%
ATR (sacarose, glicose, frutose)	>15% maior possível
AR (glicose, frutose)	<0,8 %
Fibra	11 a 13 %
Tempo de queima/corte	< que 35 horas para cana com corte manual
Terra na cana (minerais)	<5 kg/t cana
Contaminação da cana	<5,0 x 10 ⁵ bastonetes/ ml no caldo
Teor de álcool no caldo da cana	<0,6 % ou <0,4% Brix
Acidez sulfúrica	<0,80
Dextrana	<500 ppm/Brix
Amido da cana	<500 ppm/Brix
Broca da cana	< 1,0%
Índice de Honig-Bogstra	>0,25
Palhiço na cana	< 5,0%
Ácido aconítico	<1.500 ppm/Brix

Tabela 2: Indicadores da qualidade e valores recomendados para a cana (In: RIPOLI & RIPOLI, 2004).

5.1.2 Lavagem da cana

As canas colhidas manualmente normalmente são lavadas para diminuir suas impurezas que prejudicam o processo, já a cana colhida por máquinas é utilizado a lavagem a seco para não ocorrer grandes perdas de sacarose (NOVACANA, 2015).

Na saída das caixas de tratamento de água, é feita a coleta para quantificar a população bacteriana na água de retorno do decantado. A água de lavagem da cana deve manter pH entre 10 e 11 (FERNANDES e VIEIRA, 2012).

5.1.3 Assepsia nas moendas

A assepsia nas moendas com bactericidas é considerada fundamental para o processo, porque quanto melhor esse caldo chegar para a etapa de tratamento, melhores são os resultados obtidos no processo de produção (JORNAL DA CANA, 2015).

5.1.4 Tratamento do caldo

O caldo extraído pela moenda passa por diversas etapas de tratamento, antes de ser encaminhado à produção de açúcar e álcool. Este caldo é peneirado para remoção de impurezas mais grosseiras; impurezas menores (solúveis, insolúveis ou coloidais) não são removidas apenas com a utilização de peneiras, no caso deste tipo de impurezas, é adotada uma seqüência de procedimentos na intenção de eliminá-las. Estas impurezas podem entopir o bico das centrifugas impedindo uma separação eficiente do fermento (RIBEIRO, 2008).

A calagem, consiste na adição de leite de cal, a fim de coagular materiais coloidais, auxiliar na precipitação e correção do pH para valores neutros. O aquecimento nesta etapa visa principalmente o aumento a eficácia do processo de decantação, por sua vez a decantação visa separar o caldo das impurezas sólidas. O caldo é aquecido a 120°C, concentrando a 20°brix. Este aquecimento favorece a fermentação por fazer uma esterilização das bactérias e leveduras selvagens que concorreriam com a levedura do processo de fermentação. Em seguida o caldo vai para o evaporador e o lodo para o filtro. No filtro por vácuo, é retirada uma parcela de sacarose do lodo e o resíduo denomina-se torta. A torta de filtro é utilizada na cultura da cana-de-açúcar. No evaporador é retirada a água presente no caldo (contida na cana e adicionada nas fases anteriores do processo), adequando a concentração do caldo para a fermentação (USINA SÃO FERNANDO, 2015).

5.1.5 Água de boa qualidade

Água é considerada de boa qualidade para o processo quando apresenta temperatura em torno de 25°C, está livre de resíduos infiltrados pelo lençol freático, com baixa dureza (Cálcio) e boas características microbiológicas contendo contagem menor que 10² bact/mL (VALSECHI, 2006).

5.1.6 Sulfito

Um dos componentes do melaço que pode afetar a fermentação é o sulfito. Ele é normalmente utilizado no processo de clarificação do caldo enviado à fabricação de açúcar, estando presente em grandes concentrações no melaço da cana-de-açúcar, interferindo na queda do rendimento fermentativo na viabilidade celular das leveduras (CORÇA, 2012). Identificou-se que a presença do sulfito em baixas concentrações (em até 100ppm), traz mais benefícios do que efeitos tóxicos à levedura, como redução da contaminação bacteriana. Acima do nível ideal, o enxofre, na forma de sulfito, aumenta a produção de glicerol e inibe o desenvolvimento das leveduras, que com o passar do tempo, se adaptam a essa situação (AMORIM, 2005).

5.1.7 Uso do ácido sulfúrico

Após a centrifugação, o creme de levedura é enviado para as cubas, onde será diluído e tratado severamente, com adição de ácido sulfúrico, antes de retornar para o processo. O pH do meio é acidificado em torno de 2,5 ou menos, dependendo do nível da contaminação bacteriana. Esta suspensão de fermento diluído e acidificado é conhecida na prática como pé-de-cuba, permanecendo em agitação de uma a três horas, esperando o retorno para a dorna de fermentação (FURTADO; SCANDIFFIO, 2006).

O pH é um fator importante para as fermentações pois auxilia no controle da contaminação bacteriana quanto ao seu efeito sobre o crescimento da levedura, taxa de fermentação e formação de subprodutos (SOUZA, 2009).

Tratamento com ácido sulfúrico, é prática comum para o controle da infecção contida no fermento. Observa-se redução de 44,3% da contaminação microbiana em função do tempo e do vigor desse tratamento. Porém, quando a levedura está floculada por indução bacteriana, esse tratamento apenas induz a separação do fermento e das bactérias, mas não elimina totalmente. O tratamento com ácido sulfúrico é realizado após cada ciclo fermentativo para evitar o aumento da contaminação bacteriana e diminuir a floculação (CORAÇA, 2012).

5.1.8 Antissépticos

Para controlar o problema das contaminações, aconselha-se o uso de antissépticos capazes de criar ambiente favorável ao desenvolvimento das leveduras e desfavorável a outros microrganismos (CAETANO e MADALENO, 2011).

Cada antisséptico atua de uma forma diferente, agindo sobre um ou mais grupos de microrganismos. Alguns agem favoravelmente as leveduras, ao mesmo tempo que inibem bactérias e fungos. O ácido sulfúrico que se adiciona no tratamento do levedo, os antibióticos através de suas características bacteriostáticas (LIMA, 2001).

5.1.9 Uso do dióxido de cloro

Produto utilizado na fermentação alcoólica com a finalidade de controlar o aumento de bactérias e aumentar a performance do processo fermentativo. A utilização do Dióxido de Cloro tem a vantagem de eliminar o uso de antibióticos, devido sua elevada

eficiência no controle bacteriológico, evitando a geração de populações resistentes de microrganismos (ALCOOLINA, 2015).

5.1.10 Mosto

O mosto deve apresentar isenção de sólidos (bagacilho, areia, terra), temperatura de 32°C, contaminação $< 10^2$ e nutrientes necessário para o bom desempenho das leveduras (TELEKEN, 2014).

Visando assegurar uma menor quantidade de bagacilhos ou resíduos sólidos no açúcar e no mosto, o caldo clarificado passa por uma filtração adicional. Essa filtração pode acontecer tanto na peneira rotativa que se encontra após os decantadores quanto nas peneiras abertas (RIBEIRO, 2008).

5.1.11 Assepsia na fermentação

Para que a fermentação transcorra de forma adequada é necessário que haja a competente limpeza das dornas, evitando assim a proliferação de microrganismos infectantes. Os parâmetros a serem considerados são a vazão e a cobertura, além do impacto, distância e padrão do jato. Com o objetivo de reduzir custos com energia e soluções de limpeza deve-se usar a menor vazão possível (JORNAL DA CANA, 2013).

Para a remoção das bactérias é recomendado o uso do flegmaça, proveniente da coluna B devido sua grande eficiência, alta temperatura em torno de 90°C, baixo custo de instalação que além da limpeza nas dornas, são utilizados na remoção de bactérias nos trocadores de calor (MELLO, 2012).

5.1.12 Spray ball

O Spray Ball é um equipamento rápido que gira 360°, e eficiente para a limpeza de tanques entre um processo e outro, sendo responsáveis pela aspersão de solução nas superfícies sujas e contaminadas, evitando a contaminação cruzada de seus produtos, ligado através de e uma tubulação a uma bomba centrífuga o Spray Ball lança jatos de água em todas as direções dentro do tanque removendo os resíduos. Tem como vantagem; a melhoria da eficiência da limpeza, maior qualidade, e uma padronização da limpeza (FORNI, 2007).

Ocorre a diminuição dos custos com energia (vapor), decorrentes do aquecimento das dornas, além de manter a melhora da qualidade da fermentação ajudando a eliminar as bactérias contaminantes presentes no processo, onde o spray ball atinge alta velocidade de rotação (PRONEX, 2015). A figura 27 mostra o spray ball.



Figura 27: Spray ball utilizado na limpeza interior das dornas (In:www.alfalaval.com.br).

5.1.13 Antibióticos

Denominam-se antibióticos, compostos orgânicos, podendo ser naturais ou sintéticos, e que inibem o crescimento ou possam causar a morte de microrganismos específi-

cos. Devido os microrganismos alvos serem específicos, o constante uso de antibióticos para o controle de contaminação em indústrias pode induzir à seleção de microrganismos resistentes (EGUCHI, 2007). Quando o antibiótico Kamoran WP foi lançado, a indicação de dosagem era de 1 a 3 ppm, mas esta foi alterada atualmente para 4 ppm, demonstrando assim, a resistência das bactérias a este composto (SILVA, 2010). Em diversos países, não é permitido a utilização de levedura, tanto para alimentação animal ou alimentação humana, que contenha residual de antibióticos, tornando o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa segura, eficaz e econômica (BREGAGNOLI, 2006).

A associação de antibióticos é uma prática utilizada nas destilarias e pode ser vantajoso no combate à contaminação bacteriana (STROPPIA, 1998).

6. AUTOMAÇÃO E CONTROLE NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO

A automação consiste na sistematização das operações contínuas e batelada fazendo com que o resultado fique muito próximo de uma operação totalmente contínua, sem ou com pouca intervenção do operador (REVISTA ALCOOLBRAS, 2012). Este conceito se aplica em qualquer formato operacional, em usinas que possuem fábrica de açúcar onde o mel é um dos componentes para o preparo de mosto, ou de destilarias onde o processo inicia no tratamento do caldo (SMAR, 2015).

Na automação não há controle do processo biológico, este deve ser cuidado por especialista na área, porém, serve para dar condições de que este especialista possa definir e reproduzir em todas as dornas o perfil adequado de condução do processo que melhor condiz com as expectativas. Na fermentação, a automação consiste no acionamento de um conjunto de válvulas on/off que são comandadas pelo programa de automação respeitando uma lógica de passos que são divididas em seis grandes etapas: transferência do pé de fermento, alimentação de mosto, assepsia da linha de mosto, acionamento da bomba de resfriamento e do agitador da dorna, transferência para centrifugação e assepsia da dorna, controle de temperatura e ante espuma (MARÇAL, 2009).

Estas operações são todas realizadas de modo automático, num centro de operações industriais (COI), com informações on-line e em tempo real (EDITORA VALETE, 2008). A lógica de enchimento e centrifugação das dornas está interligada, interferindo e sofrendo interferência de outra lógica em batelada que é a o tratamento de levedura, ou seja, quando há a troca de dorna, também de maneira automática acontece a troca da cuba conforme o diagrama de ocupação (BIOCONTAL, 2013).

Define-se valor de set point de nível e o volume de ácido necessário que o programa comanda o acionamento da bomba, calculando o tempo necessário para que a bomba fique em funcionamento. Procedimento semelhante acontece para a dosagem de dispersante, com a troca de cubas o volume restante de água é colocado (MARQUES, 2009).

A condução da alimentação de mosto também é executada de maneira automática e o momento em que ele deve ser iniciado também respeita um dos passos na programação (SMAR, 2015)

Para cada dorna de fermentação existe uma receita onde se define tempos, temperaturas, valores de níveis e volumes que dão condições do programa executar a batelada de modo automático, inclusive os parâmetros necessários para o enchimento com mosto tais como: tempo de enchimento, volume total da dorna, volume do pé de fermento e nível final de enchimento. Define-se também o perfil que o enchimento que pode ser alterado a qualquer momento, assim como a receita que é individual para cada dorna e pode ter a sua batelada definida de acordo com a qualidade do fermento, inclusive o enchimento (BIOCONTAL, 2013).

O controle de temperatura deve ser automaticamente colocado em operação toda vez que seja necessário a remoção de calor, mediante a definição de set point de temperatura que será parametrizado na receita (MARQUES, 2009).

7 MATERIAS E MÉTODOS

7.1 CONTAGEM DE BASTONETES

7.1.1 Materiais

- . Frascos limpos
- . Água destilada
- . Tubo de ensaio
- . Corante azul de metileno
- . Sulfato azul do Nilo
- . Lâmina de vidro (26x76)
- . Óleo de imersão
- . Pipeta
- . Papel higiênico absorvente

7.1.2 Métodos

Em 2 momentos diferentes durante a safra em uma usina de açúcar e álcool da região de Assis – SP, foram coletados separadamente em frascos limpos 50 mL de mel ,50 mL de mosto antes do trocador de calor, 50 mL de mosto depois do trocador de calor, 50 mL de mosto no anel de entrada de mosto na dorna, 50 mL de vinho levedado na saída da dorna para centrifuga, 50 mL de vinho de levedado saído das centrifugas para os aparelhos de destilação, 50 mL de creme de levedura saindo da centrifuga para os pré fermentadores, 50 mL de fermento tratado com H₂SO₄ antes de bombear para as dornas.

Fluxograma das linhas de mosto e fermento

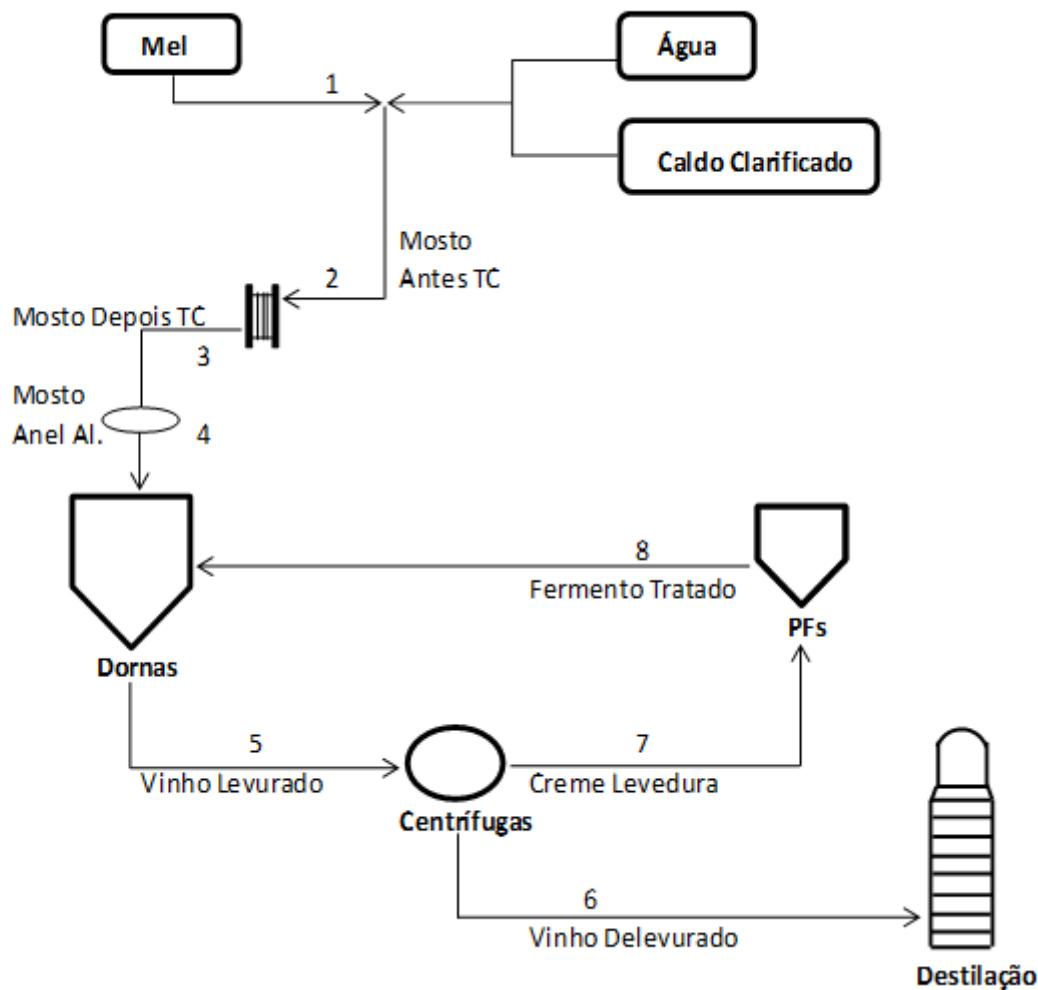


Figura 28: Pontos de coleta

7.1.3 Análises de contagem de bastonetes

Foi homogeneizado e diluída a amostra adequadamente, utilizando água destilada; Transferindo -se para um tubo de ensaio de 1,0mL da amostra diluída em seguida foi adicionado 1,0mL do corante azul de metileno + sulfato azul do nilo; Limpou- se a pipeta/ponteira com papel higiênico absorvente antes de transferir o volume para a

lâmina; Transferiu - se 0,003mL da amostra para uma lâmina de vidro (26x76); e colocou-se a amostra e sobre a amostra uma lamínula, tendo o cuidado para evitar a formação de bolhas. Adicionou-se 1 gota de óleo de imersão para o início da contagem dos bastonetes.

Contar: Caldo 70 campos

Cálculo:

Bast /mL= FM x (1/Vol Amostra) x M x D

Onde:

0,003 é o volume da amostra

FM= fator do microscópio (15406,2)

M=total de bactérias vivas / nº campos contados

D= diluição utilizada (2)

Fator microscópio = área da lamínula / área do campo do microscópio

Área do microscópio = $(\pi * D^2) / 4$

Área da lamínula= 22x22=484

7. 2 VIABILIDADE CELULAR DA LEVEDURA

7.2.1 Materiais

- Frascos de 200mL
- Béquer
- Corante azul de metileno
- Câmara de Neubauer
- Agua destilada
- Microscópio óptico
- Citrato de sódio

- Termômetro
- Papel absorvente
- Óleo de imersão

7.2.2 Métodos

As amostras foram coletadas numa usina de açúcar e álcool da região de Assis – SP, nos dias 02/04/2015 e 08/04/2015 em frascos de 200mL limpos, inquebráveis e transparentes. As coletas foram realizadas em 3 pontos diferentes, ambas com temperatura de 28 a 32°C. A primeira amostra coletada foi de vinho levedurado com pH de 4,7 no (Ponto 5) numa dorna fechada com capacidade para 1000m³, a segunda amostra coletada foi de creme de levedura com pH de 4,8 (Ponto 7) onde ocorre a separação nas centrifugas do vinho de levedurado e do creme de levedura e a terceira amostra coletada foi de levedo tratado após sua diluição com água e H₂SO₄ deixando seu pH com 2,20(Ponto 8) num pré fermentador com capacidade para 300m³.

7.2.3 Análises de viabilidade

As amostras foram homogeneizadas e analisadas no laboratório logo após sua coleta. Foi preparado um volume da solução, somente o suficiente para o uso. As análises foram feitas em duplicatas e realizado a média para melhor confiabilidade no resultado.

As amostras coletadas foram diluídas separadamente, em seguida foi transferido 1mL da amostra diluída em um béquer de 25mL. Adicionou-se a mesma quantidade de corante azul metileno, citrato de sódio e homogeneizou-se, transferiu-se em seguida para câmara de Neubauer, fixou-se uma lamínula (20X20mm) e retirou-se o excesso com auxílio de papel absorvente. Em seguida foi adicionado 1 gota de óleo de imersão sobre a lamínula e procedeu-se a imersão da objetiva por 100 vezes.

Foram contadas as células coradas e células não coradas, utilizando-se a lente objetiva 100X, que encontravam em 4 retículos centrais de cada quadriculo que na soma da 100 retículos considerou-se todas as células que estavam em questão no interior deles e as que estavam até 1/2 para dentro dos quadriculos, sendo células não coradas as vivas e as células coradas as mortas.

Cálculos:

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{\text{Total de células viáveis}}{\text{Total células viáveis + não viáveis}} \times 100$$

7.3 PLAQUEAMENTO NAS ETAPAS DO PROCESSO

7.3.1 Materiais

- Petrifilm
- Tubos de ensaio
- Estufa de incubação
- Pipeta
- Contador Quebec com lupa
- Frascos de 200 mL
- Prensa hidráulica
- Betoneira
- Reagentes
- Desfibrador
- Solução salina (NaCl 0,85%)
- Papel absorvente
- álcool 70%

7.3.2 Métodos

As coletas foram realizadas em uma usina de açúcar e álcool na região de Assis – SP, em frascos limpos, em 10 pontos diferentes no período de 04/05/2015 a 14/08/2015 numa usina de açúcar e álcool, onde a amostra foi mantida fora do alcance da luz.

01 Ponto (PCTS) = A cana foi desfibrada, e homogeneizada numa betoneira e logo em seguida foi colocada numa prensa hidráulica em torno de 2 minutos ocorrendo a separação do caldo e do bagaço e logo após foram coletados 200mL de caldo.

02 Ponto (Moenda) = foram coletados 200mL de caldo misto.

03 Ponto (Tratamento de caldo) = foram coletados 200mL de caldo no decantador.

04 Ponto (Fabrica de açúcar) = foram coletados 200mL de xarope.

05 Ponto (Fabrica de açúcar) = foram coletados 200mL produção.

06 Ponto (Fermentação) = foram coletados 200mL de mel no tanque.

07 Ponto (Fermentação) = foram coletados 200mL de mosto antes do trocador.

08 Ponto (Fermentação) = foram coletados 200mL de mosto depois do trocador.

09 Ponto (Fermentação) = foram coletados 200mL de mosto alimentação.

10 Ponto (Fermentação) = foram coletados 200mL de agua de diluição do fermento

Foi utilizado petrifilm que constitui-se, de cartões de papel quadriculado revestido de polietileno, recoberto com nutrientes desidratados e um agente coloidal solúvel em agua fria. A lamina inferior é impregnada de nutrientes e agente coloidal, a lamina superior é impregnada de um agente coloidal e um indicador. Na presença de cloreto de trifênil tetrazóico que é um indicador de óxido redução, as colônias de bactérias se colorem de vermelho, facilitando a contagem.

7.3.3 Análises de plaqueamento

Foi colocado o petrifilm em sua superfície plana, e levantado o filme superior e inoculado cuidadosamente 1mL da amostra diluída no centro do filme inferior deixando o filme superior cair cuidadosamente sobre a amostra inoculada.

Foi posicionado o difusor plástico no centro da placa com o lado rebaixado voltado para baixo e distribuído a amostra uniformemente pressionando delicadamente o centro difusor plástico, não arrastando o difusor sobre o filme.

Em seguida foi removido o difusor sem tocar na placa num período de 1 minuto para permitir a solidificação do gel. As placas foram incubadas as placas em estufas umidificadas na posição horizontal com a superfície transparente para cima numa temperatura de 35°C por um período de 48 horas.

Foi efetuado a contagem utilizando contador de colônias tipo Quebec com auxílio de uma lupa, contou-se todas as colônias coradas independentemente de tamanho ou intensidade de cor. A redução do indicador originou a coloração das colônias. Em placas com mais de 250 colônias foi feita a estimativa de contagem, contando-se o número de colônias em dois ou mais quadrados representativos e determinou-se o número médio por quadrado, multiplicou-se esse número por 20 para determinar a contagem total da placa.

A superfície circular de crescimento é de 20 cm² e cada quadriculo 1cmx1cm.

Exemplo de contagem: Diluição a 10⁻³, plaqueando 0,1mL

140 colônias = $140 \times 10^3 \times (0,1 \times 10) = 1,4 \times 10^5$ UFC/mL.

Observação: Nas etapas de diluição de 04/05/2015 a 15/10/2015 houve variação na diluição.

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 CONTAGEM DE BASTONETES.

A tabela 3: Mostra contagem de bastonetes em 8 pontos diferentes.

Data	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8
02/04/2015	4,0,E+03	2,1,E+04	1,9,E+04	2,3,E+04	1,0,E+07	2,0,E+05	1,9,E+07	1,7,E+07
08/04/2015	1,6,E+04	4,9,E+03	5,2,E+04	4,1,E+04	5,7,E+06	2,0,E+05	1,0,E+07	9,4,E+06
MEDIA	1,0,E+04	1,3,E+04	3,6,E+04	3,2,E+04	7,9,E+06	2,0,E+05	1,5,E+07	1,3,E+07

Tabela 3: Contagem de bastonetes diversos pontos da fermentação.

O experimento de contagem de bastonetes foi realizado apenas na fermentação e foi constatado que no ponto 7 (Creme de levedura) houve um aumento significativo de bastonetes em relação aos outros pontos devido a tubulação não sofrer nenhuma assepsia, onde sua tubulação é mal dimensionada, apresentando soldas sem acabamento e válvulas em lugares irregulares, contendo pontos mortos o que acaba favorecendo o aumento de contaminantes.

8. 2 VIABILIDADE CELULAR DA LEVEDURA

A tabela 4 mostra o resultado das análises efetuadas em duplicatas nos dias 02/04/2015 e 08/04/2015.

Data	Ponto 5	Ponto 8	Ponto 7
02/04/2015	90%	85%	82%
08/04/2015	86%	75%	72%
Média	88%	80%	77%

Tabela 4: Análises de % viabilidade do levedo em 3 pontos diferentes

A figura 29 mostra a influência da infecção na viabilidade da levedura

Onde P5 = Vinho levurado da dorna

P8 = Levedo tratado com água e H_2SO_4

P7 = Creme de levedura saindo das centrifugas

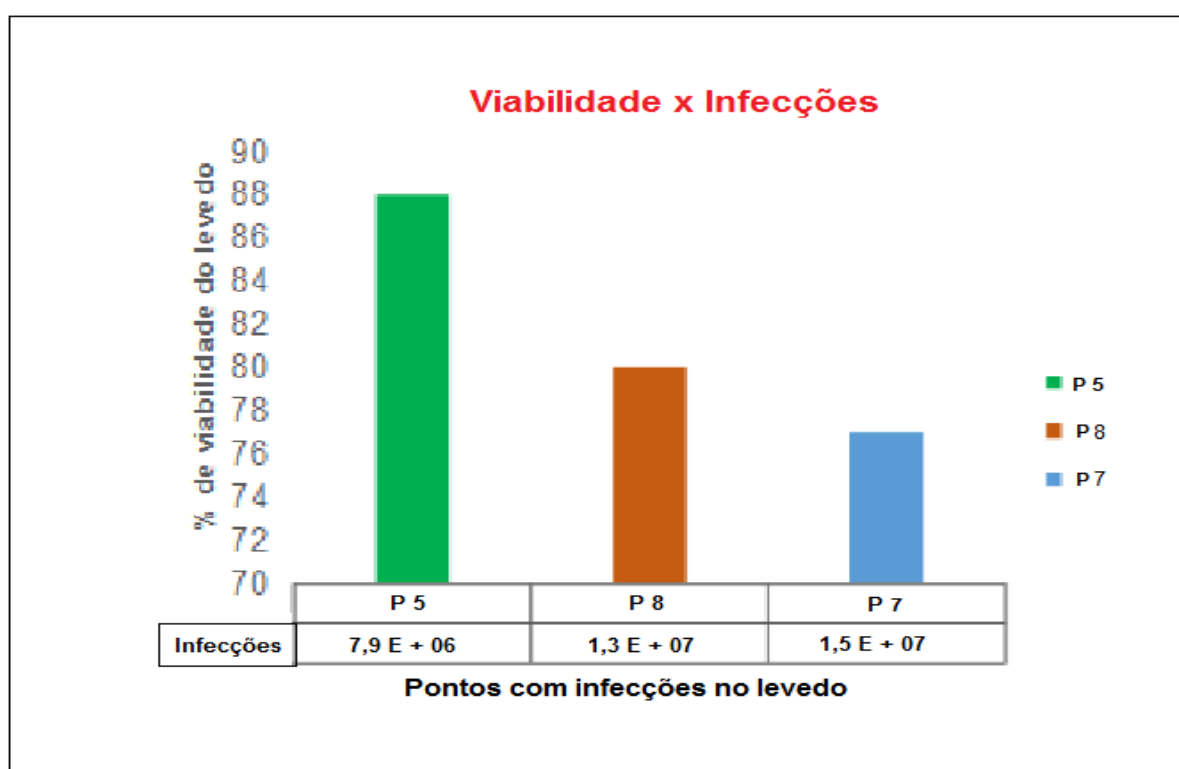


FIGURA 29: Gráfico da queda da viabilidade em relação ao aumento da infecção.

No experimento da viabilidade analisamos somente os pontos que contém célula de levedura na fermentação que são os pontos 5,8 e 7 onde foi efetuado as coletas e notou-se que com aumento da infecção, ocorre gradativamente a redução da viabilidade. As bactérias contaminantes inibem o crescimento e o brotamento da levedura, gerando o aumento de ácido lático e consumindo açúcar para sua sobrevivência, além de ocasionar floculação. Já no ponto 8 a infecção é reduzida devido o tratamento

desse levedo com ácido sulfúrico com pH 2,20 pois em pH menor que 2 a viabilidade diminui ou pode até zerar.

8.3 PLAQUEAMENTO NAS ETAPAS DO PROCESSO

A tabela 5 mostra plaqueamento em diversas etapas do processo em dias diferentes.

PLAQUEAMENTO DO PROCESSO

PONTO COLETA	04/05/2015	11/05/2015	17/05/2015	24/05/2015	01/06/2015	08/06/2015	15/06/2015
Prensa PCTS	1,20E+08	1,80E+09	8,10E+08	2,10E+07	1,9E+09	7,00E+07	2,90E+07
Caldo Misto	1,20E+08	2,40E+08	4,70E+07	1,10E+07	2,0E+09	3,10E+07	3,20E+07
Decantado	2,30E+03	3,60E+02	2,70E+03	8,00E+01	2,7E+03	1,00E+01	4,00E+01
Xarope	5,20E+02	3,10E+02	4,40E+03	2,40E+02	5,0E+01	2,00E+01	1,80E+04
Mel Produção	1,40E+03	2,60E+02	3,00E+03	2,00E+02	2,6E+02	1,60E+02	4,40E+02
Mel Tanque	1,60E+04	7,60E+03	1,30E+05	6,00E+02	7,4E+02	4,40E+03	6,40E+02
Mosto Antes Trocador	2,00E+03	4,00E+04	4,40E+06	4,30E+05	1,5E+04	4,00E+03	9,20E+05
Mosto Depois Trocador	3,00E+04	2,50E+04	3,10E+04	2,10E+05	1,0E+04	1,00E+03	8,50E+05
Mosto Alimentação	1,40E+04	2,30E+04	7,10E+05	2,10E+05	3,1E+04	1,00E+03	9,60E+05
Água Diluição do Fermento	2,00E+01	0,00E+00	1,30E+05	3,00E+01	1,9E+01	0,00E+00	0,00E+00

PONTO COLETA	23/06/2015	30/06/2015	05/07/2015	12/07/2015	19/07/2015	28/07/2015	04/08/2015
Prensa PCTS	7,20E+08	7,50E+08	1,10E+08	1,20E+08	2,80E+06	2,20E+07	3,10E+07
Caldo Misto	7,60E+08	3,20E+09	9,80E+07	1,20E+08	1,80E+07	1,70E+07	2,70E+07
Decantado	1,60E+03	1,20E+05	2,10E+04	1,20E+02	2,00E+01	6,00E+01	2,50E+02
Xarope	6,00E+03	9,00E+03	1,80E+03	1,20E+02	3,70E+03	1,40E+03	1,60E+03
Mel Produção	8,20E+03	3,20E+05	2,20E+05	2,20E+04	2,20E+03	1,10E+04	8,20E+03
Mel Tanque	5,60E+03	1,80E+03	5,20E+03	4,80E+03	4,80E+05	1,00E+03	6,20E+03
Mosto Antes Trocador	3,10E+05	9,00E+04	3,10E+05	2,10E+05	1,30E+04	1,60E+04	2,10E+04
Mosto Depois Trocador	3,90E+05	3,70E+05	2,60E+05	2,40E+05	4,90E+04	5,00E+03	2,70E+04
Mosto Alimentação	5,10E+05	5,70E+05	3,40E+05	2,10E+05	1,00E+04	2,10E+05	1,90E+04
Água Diluição do Fermento	1,00E+01	2,40E+02	5,70E+02	1,00E+02	4,50E+02	3,00E+01	2,00E+00

PONTO COLETA	10/08/2015	15/08/2015	21/08/2015	27/08/2015	03/09/2015	10/09/2015	16/09/2015
Prensa PCTS	4,00E+07	4,00E+06	2,30E+07	1,00E+06	7,70E+07	2,00E+06	1,10E+07
Caldo Misto	5,10E+07	2,10E+07	3,10E+07	2,00E+07	1,70E+08	1,30E+07	1,10E+07
Decantado	3,20E+02	9,00E+01	2,10E+02	1,10E+02	2,80E+03	1,00E+02	9,00E+01
Xarope	2,20E+03	1,20E+02	2,60E+02	3,20E+03	2,50E+03	4,90E+04	1,60E+04
Mel Produção	1,90E+04	4,40E+02	5,80E+03	1,40E+03	3,00E+02	8,80E+03	1,60E+04
Mel Tanque	1,70E+04	3,40E+02	4,20E+03	6,80E+02	1,30E+05	1,10E+04	5,40E+03
Mosto Antes Trocador	2,60E+04	0,00E+00	2,10E+04	2,30E+04	5,00E+04	4,50E+04	3,90E+04
Mosto Depois Trocador	2,80E+04	9,00E+00	2,40E+04	4,60E+04	1,30E+06	8,00E+04	7,70E+05
Mosto Alimentação	3,50E+04	1,00E+04	1,80E+04	4,70E+04	6,60E+04	1,20E+04	3,80E+05
Água Diluição do Fermento	8,00E+00	2,60E+01	1,20E+02	0,00E+00	1,70E+04	1,30E+02	1,00E+02

PONTO COLETA	22/09/2015	27/09/2015	01/10/2015	06/10/2015	11/10/2015	15/10/2015	Média
Prensa PCTS	1,10E+07	1,00E+08	1,50E+09	3,60E+09	6,00E+06	2,90E+07	4,58E+08
Caldo Misto	1,10E+07	1,30E+08	3,10E+07	4,50E+09	2,00E+07	4,10E+07	4,52E+08
Decantado	9,00E+01	7,10E+03	1,00E+03	3,10E+01	1,30E+02	5,50E+03	6,49E+03
Xarope	1,60E+04	1,70E+03	1,00E+05	7,60E+03	6,00E+02	2,40E+03	8,95E+03
Mel Produção	1,60E+04	8,40E+03	1,30E+03	1,50E+04	1,00E+03	9,80E+04	2,97E+04
Mel Tanque	5,40E+03	4,80E+03	5,60E+04	7,00E+02	1,20E+03	4,80E+04	3,63E+04
Mosto Antes Trocador	3,90E+04	1,10E+07	0,00E+00	2,60E+05	4,00E+04	2,40E+05	7,41E+05
Mosto Depois Trocador	7,70E+05	1,20E+07	9,10E+04	1,30E+04	4,40E+05	2,30E+05	6,74E+05
Mosto Alimentação	3,80E+05	1,10E+07	8,70E+06	1,10E+04	4,70E+04	1,70E+04	9,29E+05
Água Diluição do Fermento	1,00E+02	0,00E+00	8,00E+01	2,40E+01	1,80E+01	2,10E+02	5,74E+03

Tabela 5: Plaqueamento em diversas etapas do processo

A figura 30 mostra o gráfico com a média gerada do plaqueamento

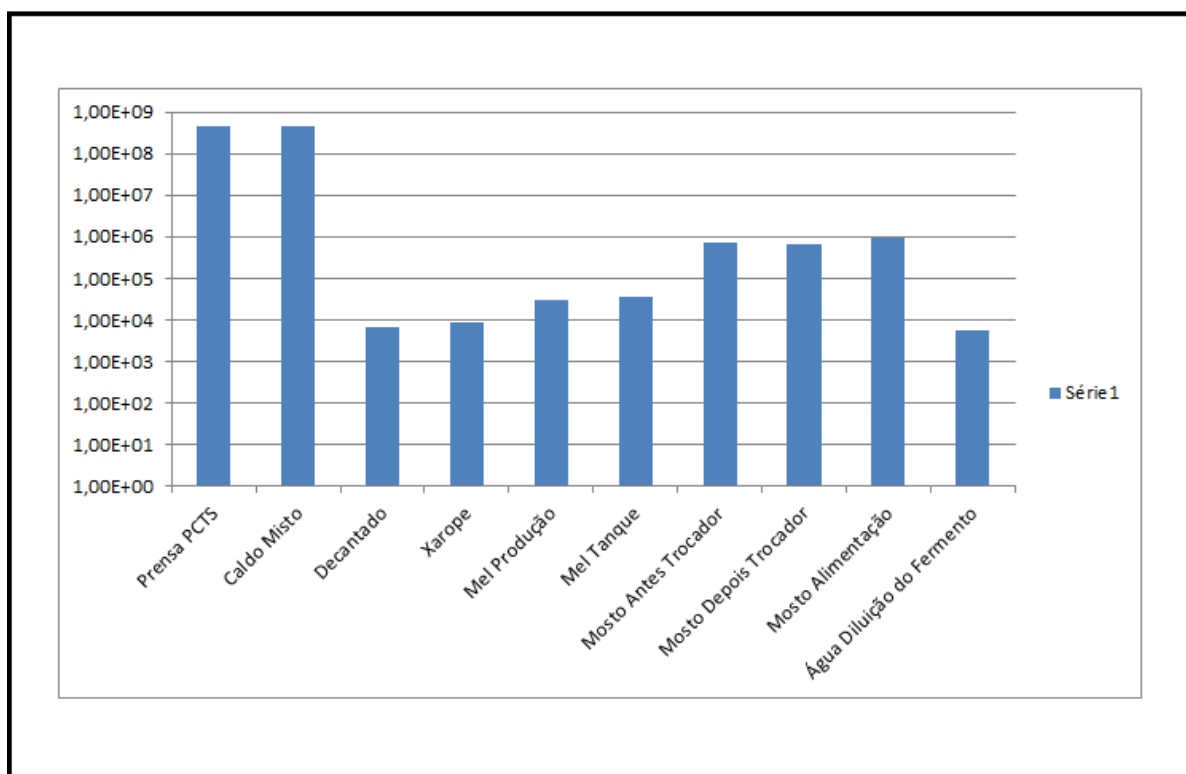


Figura 30: Gráfico com a média do plaqueamento.

O plaqueamento foi efetuado em 10 etapas diferentes do processo, com o objetivo de verificar os pontos mais críticos de contaminação desde a entrada da cana na indústria até chegar na fermentação, onde na fermentação foi analisado o mel, o mosto que é a mistura de mel, água e caldo.

O mosto antes do trocador de calor e depois do trocador de calor devido os trocadores sofrer incrustações de bactérias em suas placas formando gomas e a água para fazer diluição do fermento.

A partir desse plaqueamento verificamos que a cana chega contaminada a indústria, devido diversos fatores, como tempo de corte, porque quanto mais aumenta o tempo desta cana chegar na indústria também aumenta os níveis de contaminantes gerado através da penetração de microrganismos nos colmos através de rachaduras ocasionadas por pragas como a broca da cana e também demonstrou-se, que em alguns momentos na moenda onde ocorre a extração de caldo o nível de contaminantes au-

menta, devido falta de assepsia, água de baixa qualidade com sujeira ou falta de lavagem da cana com jato de ar (Caso a cana seja cortada por máquinas) ou até mesmo picadores e desfibradores contaminados. Entretanto obtivemos dados muito bons, no processo de tratamento do caldo, onde o caldo misto passa por tratamentos sendo aquecido até 105°C, logo após é adicionado leite de cal para correção de ph para manter entre 6 e 7 e decantado onde adiciona polímeros para retirar suas impurezas nele contida, com isso ocorreu uma queda brusca em seu nível de contaminação, esse tratamento é de extrema importância porque se for de má qualidade ocorre um efeito cascata até atingir o produto final, ocasionando perdas irreparáveis no processo. Já no mosto, os contaminantes aumentaram, mesmo contendo 2 linhas independentes ocorreu a falta de assepsia na linha e quando houve assepsia a temperatura estava muito abaixo em torno de 45°C, onde deveria ser em torno de 90°C, devido algumas bactérias crescer a 60°C.

9 CONCLUSÃO

Os contaminantes bacterianos existem há milhares de anos e dificilmente serão eliminados, porém podem causar grandes prejuízos a indústria, ou até mesmo parar a linha de produção de açúcar e álcool. Além da perda do produto final, também aumenta o custo com produtos antissépticos gerando gastos desnecessários para controlar as bactérias e seus efeitos.

Os maiores prejuízos causados pela contaminação bacteriana, são a degradação da sacarose e o acúmulo de ácidos que ocasiona perda de açúcar e intoxicação da levedura

Portanto é de grande importância a lavoura trabalhar em conjunto com a indústria e vice-versa, para que matéria prima (Cana), chegue com qualidade na indústria. Devemos fazer sempre um mapeamento rotineiro juntamente com a microbiologia nos setores sujeitos a contaminação para tomar ações preventivas e corretivas para fermentação, e para os processos antes da fermentação. Porque apesar de todos cuidados, novos focos sempre surgem e espalham rapidamente no processo industrial.

Deve-se efetuar teste de antibióticos em laboratórios para verificar qual é o antibiótico mais atuante na inibição das bactérias, e manter uma assepsia de qualidade ocasionando redução de gastos com insumos e antibióticos.

A automação precisa está bem definida onde os parâmetros de controle possam passar informação em tempo real com o máximo de precisão, como por exemplo pH, temperatura, brix e etc.

E como foi constatado tubulação mal dimensionada, juntamente com válvulas em lugares não propícios, precisam de uma atenção especial porque é onde ocorre a proliferação de bactérias prejudicando o processo

REFERÊNCIAS

ALCARDE, A.R; WALDER J.M.M. **Efeito da radiação gama na sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Cepa M300-A) em mosto de mel de cana de açúcar.** Centro de Energia Nuclear na Agricultura. USP, Piracicaba SP, 1997. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-90161997000200015&script=sci_arttext. Acesso 03/07/2015

ALCARDE, Y.E. **Avaliação de antimicrobianos na germinação de esporos e na multiplicação de bactérias isoladas de processos de fermentação alcoólica.** Piracicaba, 1995. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

ALCOOLBRÁS. Revista Alcoolbrás. **Busca pela vanguarda.** Edição 101. Abril, 2006

ALCOOLBRÁS. Revista Alcoolbrás. **Automação no setor sucroalcooleiro – uma visão de fornecedor e usuário**, ed 138, 2012. Disponível em http://www.revistaalcooolbras.com.br/edicoes/ed_138/mc_1.html Acesso em 28/09/2015

ALCOOLINA, **Química e Derivados.** Cravinhos – SP, 2015. Disponível em:<<http://www.alcolina.com.br/produto/setor-sucroenergetico>>. Acesso em 16/06/2015

ALFA LAVAL. **Produtos.** Disponível:<www.alfalaval.com.br>. Acesso em 08/05/2015

ALFA LAVAL. **Separadoras.** Disponível em: <<http://local.alfalaval.com/pt-br/tecnologias-chave/separacao/separadoras/pages/separadoras-brasil.aspx>>. Acesso em 13/10/2015

ALMEIDA, Luciana dos Santos. **Pesquisa qualitativa dos requerimentos fundamentais para a transferência, registro sanitário, estabelecimento e parâmetros de estabilidade de bancos de células de *Escherichia coli*.** Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro 2009. Disponível em: <http://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/5866/2/luciana-de-santos-almeida.pdf>> Acesso 04/10/2015

ALMEIDA, Zuleika Catarina Guilherme. **Metodologia Prática para o Estudo de Bactérias no Ensino Médio. 2013.** (Especialização em Ciências) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2013. Disponível em <http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/2304/1/MD_ENSCIE_III_2012_85.pdf>. Acesso em 14/10/2015.

ALTERTHUM, F. **Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. STAB. Açúcar Álcool e Subproduto**, v.3, n.1, 1984.

AMARAL, Flávia Silvério. **Influência conjunta do pH, temperatura e concentração de sulfito na fermentação alcoólica de mostos de sacarose.** Universidade Federal de Uberlândia – MG, 2009. Disponível em: < <http://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/548/1/Influ%C3%AanciaConjuntaPh.pdf>> Acesso em 20/06/2015

AMORIM, H. V. **Fermentação alcoólica: Ciência e Tecnologia.** Piracicaba. São Paulo, 2005. Fermentec.

AMORIM, H. V.; OLIVEIRA A. J. **Infecção na fermentação: como evitá-la. Açúcar e Álcool**, v. 5, 1982.

AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; ZAGO, E.A.; BASSO, L.C.; GALLO, C.R. **Processos de fermentação alcoólica, seu controle e monitoramento.** Piracicaba: Centro de Biotecnologia Agrícola, 1989. 145p.

ANDRIETTA, Maria da Graça S. **Dorna de fermentação a microbiota de um sistema artificial.** Unicamp, 2011. Disponível em:<<http://stab.org.br/fermentacao/Graca.pdf>>. Acesso 01/06/2015

ANDRIETTA, Maria da Graça S. STECKELBERG, Claudia. **Bioetanol Brasil – 30, anos na vanguarda.** Divisão de biotecnologia e processos. Unicamp – Campinas SP, 2006 Disponível em:<https://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_02_7.pdf>. Acesso em 19/05/2015.

ANDRIETTA, S. R. **Fermentação e tratamento do caldo**. Apostila do Curso de Investimento e Gestão na Agroindústria Sucroalcooleira. PECEGE/ESALQ/USP. Piracicaba, 2007

ANTONINI, S.R.C. **Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. Universidade Federal de São Carlos. Departamento. Tecnologia Agroindustrial e Sócio - Econômica Rural, Centro de Ciências Agrárias, São Carlos, SP, Brasil, 2004.

ANTÔNIO, Lucas de Felipe. **Hidrolise acida de polissacarídeos de microrganismos para produção de etanol**. UNAERP – Ribeirão Preto –SP, 2010. Disponível em < <http://www.unaerp.br/documentos/582-lucas-de-felipe-antonia770nio/file>> Acesso em 04/10/2015

AQUARONE, Eugênio. BORZANI, Walter. SCHIMIDELL, Willibaldo. LIMA, Urgel Almeida. **Biotecnologia industrial** vol.2 e 3. 1ª edição. Editora: Edgard Blucher São Paulo – SP, 2001.

ARAUJO, Priscila Jesus de. **Seleção de motobombas para o setor sucroalcooleiro**. Unesp – Faculdade de Engenharia, Guaratinguetá – SP, 2013. Disponível em <<http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/118098/000740580.pdf>>. Acesso em 22/09/2015.

ATALA, D. I. P.; COSTA, A. C.; MACIEL FILHO, R. e MAUGERI FILHO, F., **Fermentação Alcoólica com alta densidade celular: Modelagem cinética e convalidação de parâmetros**; Livro de Resumos do XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2000.

BASSETO, N. Z. **SEPPA-Sistema especialista para planta de produção de álcool**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2006.

BASSO, L.C. **Fisiologia e ecologia da fermentação alcoólica**, workshop tecnológico sobre produção de etanol, ESALQ – USP, 2004

BASTOS, Rafael Koglin. Revista Brasileira de Energias Renováveis. **Produção de bioetanol de cana de açúcar**. 3 trimestre de 2013.

BATISTA, A.S. **Saccharomices cerevisae em milho armazenado e o efeito na redução de aflatoxicoses**. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP, Brasil, 2001.

BIOCONTAL. **Tecnologia em bioprocessos**. Campinas-SP. Disponível em < www.biocontal.com.br/sobre>. Acesso em 04/10/2015

BITANT, Adriana Penko. **O álcool: o desafio de conhecer uma substância química do nosso cotidiano**, Loanda-PR 2008. Disponível em: < <http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/portals/pde/arquivos/2101-6.pdf>> Acesso em 20/05/2015

BREGAGNOLI, F.C.R. **Comportamento fisiológico de microrganismos submetidos a biocidas convencional e natural na produção de cachaça orgânica**. 2006. 80p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006

CAETANO, Alessandra C G. MADALENO, Leonardo L. **Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com aplicação de biocidas naturais**. Fatec, Jaboticabal SP– 2011. Disponível em:< <http://www.citec.fatecjab.edu.br/index.php/files/article/viewFile/8/9>> Acesso em 05/05/2015

CAMARGO. Ilana L B C. **Biorreatores e processos fermentativos**. IFSC – USP, 2015. Disponível em <<http://www.ifsc.usp.br/~ilanacamargo/FFI0740/aula7.pdf>> Acesso em 15/10/2015

CAMOLEZ, M A. MUTTON, M J R. **Influência de microrganismos contaminantes sobre processo fermentativo**. FCAV/Unesp. Campus Jaboticabal – SP, 2005. Disponível: <<http://mcdesinfeccaoindustrial.com.br/Site/biblioteca/INFLU%C3%8ANCIA%20DE%20MICRORGANISMOS%20CONTAMINANTES%20SOBRE%20O%20%20PROCESSO%20FERMENTATIVO.pdf>>. Acesso em 02/05/2015

CARRER, Helaine. **Fermentação alcoólica**. Departamento de ciências biológicas. LCB0208–bioquímica, 2013. Disponível em: <<http://docentes.esalq.usp.br/luagallo/bioquimica%20dinamica/fermentacao.pdf>> Acesso em 10/05/2015.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. **Fermentação Descontínua Alimentada**. In: Schmidell, Willibaldo. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgar Blücher, p. 205-222 (Biotecnologia Industrial; v.2), 2001.

CENTRIPAR. **Centrifuga separadora – conceitos básicos**, Maringá – PR, 2014. Disponível em <<http://www.centripar.com.br/tag/centripar-centrifugas/>>. Acesso em 13/10/2015

CETEC. Centro de Tecnologia Canavieira. **Impurezas e qualidade da cana de açúcar**, 2011. Disponível em <<http://stab.org.br/impurezas/Luiz.pdf>>. Acesso em 02/08/2015

CONHECER. Centro Científico Conhecer, **Enciclopédia biosfera** - Goiânia, vol.6, N.11; 2010.

CHAGAS, Arthur Lygeros. **Produção de carotenoides e lipídeos pela microalga *Dunaliella tertiolecta* utilizando CO₂ de fermentação de cerveja**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre RS, 2014. Disponível em <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/104847/000941947.pdf?sequence=1>> Acesso em 30/05/2015

CHERUBIN, Rudimar Antonio. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003, 124p. Tese doutorado, Escola Superior Luiz de Queiroz – Esalq, Universidade de São Paulo, Piracicaba - SP, 2003.

CINELLI, A. B. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-graduação e Pesquisa de Engenharia, Rio de Janeiro, 2012.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira**, 2010. Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_01_06_09_14_50_boletim_cana_3o_lev_safra_2010_2011..pdf>. Acesso 14/10/2015

CONTROLE & INSTRUMENTAÇÃO, Revista. **A automação pode ajudar o setor sucroalcooleiro nacional a administrar melhor seus negócios, atingidos imediatamente pela crise mundial financeira mundial**. Editora valete, ed nº 143, ano 2008. Disponível em http://www.editoravalete.com.br/site_controleinstrumentacao/arquivo/ed_143/cv2.htm> Acesso em 28/09/2015

CORAÇA, Alessandra Cristina M, Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, **Utilização do ácido sulfúrico no tratamento das leveduras na fermentação etanólica**. Piracicaba – 2012. Disponível <<http://www.etanol.ufscar.br/trabalhos-mta/piracicaba-i-links/trabalhos/utilizacao-de-acido-sulfurico-no-tratamento-das-leveduras-na-fermentacao-etanolica>>. Acesso em 12/04/2015

CORREA, M. F. **Produção de proteína monocelular com baixo teor de ácidos ribonucléicos a partir de Cândida utilis**. Rio Claro, 1992. 99p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada). Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista. São Paulo. Brasil. 1992.

DEDINI. **Sistema de desidratação via peneira molecular**. Piracicaba – SP, 2015. Disponível em >http://www.codistil.com.br/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=97&Itemid=40&lang=pt> Acesso em 05/09/2015

DUARTE, J. C.; LOURENÇO, V.; RIVEIRO, B. Instituto Nacional de Engenharia, **Tecnologia e Inovação**, Portugal, 2006.

EGUCHI, J.Y. **Ativos antimicrobianos utilizados na indústria**. Revista Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação, São Paulo, n.22, 2007. Disponível em:<http://www..sbcc.com.br/sumario_22.htm> Acesso em: 10/05/2015.

EMBRAPA. Agencia Embrapa de Informação Tecnológica. **Fermentação**. Ano 2015. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_105_22122006154841.html>. Acesso em 01/10/2015

FASOLIN, Luiz Henrique. **Produção do álcool**. Maringá- PR 2005. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAfMgMAL/eng-bioquimica-producao-etanol>>. Acesso em 02/05/2015

FEDERICO, A. **Curso avançado de vinhos**. Winexpert-2006. Disponível em <<http://winexperts.terra.com.br/arquivos/cursoavancado.01.asp>>. Acesso em 28/09/2015

FERNANDES, Nayara Claudia de Assunção. VIEIRA, Darlene Ana Paula. **Microbiologia aplicada**. Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia. Inhumas-GO, 2012. Disponível em <http://estudio01.proj.ufsm.br/cadernos/ifgo/tecnico_acucar_alcool/microbiologia_aplicada.pdf>. Acesso em 01/04/2015

FILHO, U. Coutinho, **Engenharia Bioquímica**. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2007. Apostila.

FILHO, Waldemar G. Venturini. NOGUEIRA, Andressa Milene Parente. **Aguardentes e cachaça**. UNESP – Campus Botucatu, 2013. Disponível em <<http://www.fca.unesp.br/Home/Instituicao/Departamentos/Horticultura/aguarden-tes-e-cachaca-2013.pdf>>. Acesso em 13/10/2015

FORNI, Renato. **Projeto mecânico de um sistema de higienização CIP (Cleaning in Place)**. Universidade de São Paulo. Escola politécnica departamento de engenharia mecânica, São Paulo 2007. Disponível em <http://sites.poli.usp.br/d/pme2600/2007/Trabalhos%20finais/TCC_005_2007.pdf>. Acesso em 27/09/2015

FREGUGLIA, R.M.O., **Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura mista com *Lactobacillus fermentum***. Piracicaba, 1997. 104p. Dissertação mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo.

FURTADO, Natália de Moraes. ALCARDE, Walmir Eduardo. **Floculação de leveduras: Estudo do comportamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em processo de fermentação alcoólica**. UNIMEP – Piracicaba, 2010.

FURTADO, T.A. SCANDIFFIO, M.G. **Alcool no Brasil – uma longa história**. Scientific American Brasil. Outubro 2006.

GALLO, C. R.; CANHOS, V. P. **Efeito do tratamento ácido no fermento sobre a microbiota bacteriana contaminante da fermentação alcoólica**. Stab: Açúcar, Alcool e Subprodutos, Piracicaba, v. 9, n. 6, jul/ago. 1991

GEINTEC. Revista Geintec; **Gestão, inovação e tecnologia**, São Cristóvão - SE, 2012, Vol.2 Disponível em: www.revistageintec.net/portal/index.php/revista/article/viewfile/33/94>. Acesso em 17/09/2015

GOMES, Silvia C M P. **Produção de etanol utilizando mix de sorgo sacarino e cana de açúcar em processo de maturação**. UNESP- Universidade Estadual Paulista Campus de Jaboticabal, 2014. Disponível em <http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/110642/000791736.pdf?sequence=1>> Acesso em 10/10/2015

HENRIQUE, Miriam Roberta. **Efeitos da concentração dos compostos fenólicos do mosto na fermentação alcoólica**. Unesp – Faculdade de ciências agrônômicas – Botucatu. Disponível em < www.pg.fca.unesp.br/teses/pdfs/arq0929.pdf>. Acesso em 22/09/2015

JATAI. Revista Jatai. **Estudo comparativos das diferentes tecnologias utilizadas para produção de etanol**. n°19, ano 2012. Disponível em: < www.revistas.ufg.br/index.php/geoambiente/article/view/26058/15029>. Acesso em 22/09/2015

JORNAL DA CANA. **Assepsia em moendas**. Janeiro 2015. Série 2, nº 252, pág. 49

JORNAL DA CANA. **Limpeza é fundamental para o sucesso da fermentação**. Julho, 2013. Disponível em: <<http://www.jornalcana.com.br/limpeza-e-fundamental-para-o-sucesso-da-fermentacao/>>. Acesso em 06/06/2015

JORNAL DA CANA. **O diagnóstico rápido da contaminação bacteriana do processo e fermentação de alta performance**. Disponível <<http://www.jornalcana.com.br/fermentacao-de-alta-performance-2/>>. Acesso em 12/10/2015

JÚNIOR, Adalberto P.; KILIKIAN, B. V., **Purificação de Produtos Biotecnológico**, p. 30 a 36, Editora Manole, 2005.

JÚNIOR, João Baptista Chieppe. **Tecnologia e fabricação do álcool**. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia. Campus Inhumas – GO, 2012. Disponível: <http://estudio01.proj.ufsm.br/cadernos/ifgo/tecnico_acucar_alcool/tecnologia_fabricacao_alcool.pdf>. Acesso em 28/06/2015

JUNIOR, Raul José dos Santos M. **Obtenção do álcool etílico hidratado com gradação alcoólica para uso automotivo: Validação de um processo em batelada**.

Universidade Federal de Santa Maria – Santa Maria – RS, 2010. Disponível em <http://cascavel.cpd.ufsm.br/tede/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=3268> Acesso em 13/10/2015

LIMA, Léo da Rocha. MARCONDES, Aluizio de Abreu. **Álcool carburante. Uma estratégia Brasileira**. Curitiba-PR. Editora UFPR, 2002.

LIMA, U.A. Biotecnologia industrial: **Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Blucher, 2001. v.3

LIMA, W. J. N. **Produção de proteínas recombinantes utilizando Escherichia coli em cultivos em alta densidade celular**. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 2004.

LUCIO, C. A.; FRANCISCO, O. **Os contaminantes na fermentação do caldo**. Departamento de Ciências Biológicas. Faculdades Integradas de Ourinhos - FIO/FEMM. Disponível em <http://fio.edu.br/cic/anais/2010_ix_cic/pdf/03BIO/41BIO.pdf>. Acesso em 03/03/2015.

MARÇAL. Kleber de Souza. **Automação de baixo custo em biofermentadores**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 2009. Disponível em <<http://www.cin.ufpe.br/~tg/2009-1/ksm.pdf>>. Acesso em 14/08/2015

MARQUES, Líbia Diniz Santos. **Produção de açúcar invertido pelo uso de invertase imobilizada em resinas**. UFU, Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, Uberlândia-MG, 2007. Disponível em <http://www.btd.ufr.br/tde_arquivos/12/TDE-2007-05-09T081010Z-555/Publico/LDSMarquesDISSPRT.pdf> Acesso em 10/08/2015

MARQUES, Rodrigo Fonseca. **Controle de processo batelada-Aplicação ao sistema de mistura veramix**. UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto, 2009. Disponível em <<http://www.em.ufop.br/cecau/monografias/2009/Rodrigo%20F.%20Marques.pdf>> Acesso em 28/09/2015.

MAUSA. **Centrifuga separadora**. Piracicaba, 2015 Disponível em <<http://www.mausa.com.br/?pagina=produtos-detalhes&id=3>> Acesso em 13/10/2015

MECATRÔNICAATUAL. Revista mecatrônicaatual, 2013. **Destilação de álcool: Desafio para automação**. Disponível em <<http://www.mecatronicaatual.com.br/educacao/760-destilao-de-lcool-desafio-para-a-automao?showall=&start=1>>. Acesso em 05/08/2015

MELLO, Alexandre Galvão Brasileiro. **Redução e reaproveitamento de água no processo de produção do etanol: Um estudo de caso**. Universidade Federal de São Carlos, centro de ciências agrárias. Piracicaba, 2012. Disponível em <<http://www.etanol.ufscar.br/trabalhos-mta/piracicaba-i-links/trabalhos/reducao-e-reaproveitamento-de-agua-no-processo-de-producao-de-etanol-um-estudo-de-caso>>. Acesso em 27/09/2015

MENEGUETTI, Claudio Cezar. MEZARROBA, Silvana. **Processo de produção álcool etílico de cana de açúcar e os possíveis reaproveitamentos dos subprodutos e resíduos resultantes do sistema**. Fecilcam-Campo Mourão-PR,2010. Disponível em: <http://www.fecilcam.br/anais_iveepa/arquivos/9/9-04.pdf> Acesso 20/09/2015

MUTTON, M.J.R. **Reflexos da qualidade da matéria-prima sobre a fermentação etanólica**. Workshop sobre: “Produção de etanol: qualidade de matéria-prima”. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil, 2003.

NOBRE, Thais de Paula. HORII, Jorge. ALCARDE, André Ricardo. **Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes na fermentação alcoólica**. Ciência em tecnologia em alimentos. Campinas – SP, 2007. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v27n1/03.pdf>>. Acesso em 06/05/2015.

NOVACANA. **Como é feito o processamento da cana de açúcar nas usinas**,2015. Disponível:<<http://www.novacana.com/usina/como-e-feito-processamento-cana-de-acucar/>>. Acesso em 04/06/2015.

NUNES, P.C. **Conceito de fermentação**. Ciência da terra e da vida, 2015. Disponível em:<<http://www.knoow.net/ciencterravida/biologia/fermentacao.htm>>. Acesso em 17/02/2015.

OLIVA-NETO, P. **Estudo de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por leveduras**. Campinas, 1995. 183p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

PACHECO, Thályta Fraga. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. Uberlândia-MG, 2010. Disponível: <www.bdttd.ufu.br/_busca/arquivo.php?cod_arquivo=2851>. Acesso em 20/05/2015.

PAPIN, L. F. **Seleção e avaliação de linhagens de leveduras para produção de etanol e aguardente**. Monografia (Trabalho de Conclusão do Curso de Engenharia Agrônômica) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de São Carlos, Araras-SP, 2009.

PELCZAR, M.J.JR.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. Vol 1. São Paulo: Pearson Makron Books, 1997.

PEREIRA, Thais Johnson. **Estudo da utilização de vinhaça no preparo da cuba e da fermentação alcoólica**. Universidade de Ribeirão Preto – SP, 2009. Disponível em: < <http://www.unaerp.br/index.php/documentos/485-thais-johnson-pereira/file>>. Acesso em 21/09/2015

PINTO, Camila Ramos da Silva. **Remoção de etanol por stripping empregando dióxido de carbono**. Universidade Federal de São Carlos, 2014. Disponível em <http://www.bdttd.ufscar.br/htdocs/tedeSimplificado//tde_busca/arquivo.php?codArquivo=8191>. Acesso em 10/08/2015

PORTAL DO PROFESSOR. **Síntese de etanol a partir da fermentação alcoólica da sacarose**. Disponível em <<http://portaldoprofessor.mec.gov.br/fichaTecnicaAula.html?aula=20851>> Acesso em 10/10/2015

PRONEX, **Soluções para seus processos industriais**. São Paulo - SP. Disponível em: <<http://www.pronex.com.br/spray.php>>. Acesso em 08/05/2015.

RIBEIRO, A. F. C.; BLUMER, S. A. G.; HORRI, J. **Fundamentos de tecnologia sucroalcooleira: tecnologia do álcool**. Piracicaba, 1999. Apostila didática.

RIBEIRO, Eloizio Júlio. **Clarificação do caldo de cana**. Universidade Federal de Uberlândia 2008. Disponível em ftp://ftp.feq.ufu.br/Eloizio/Clarificacao_Caldo_Cana-2008.pdf. Acesso em 01/05/2015.

RONDINI, M.A.T. **Isolamento, caracterização e identificação de bactérias contaminantes de dornas de fermentação nas destilarias de etanol.** Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba 1985.

ROSALES, S. Y. R. **Contaminantes bacterianos da fermentação alcoólica: isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfetantes.** 1989. 200 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro 1989.

SÁ, Clarissa Brito Carvalho. **Caracterização de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* E *Zymomonas mobilis* para aplicação na produção de bioetanol.** Universidade Federal de Pernambuco. Centro de ciências biológicas, Recife – PE, 2012. Disponível em https://www.ufpe.br/ppgbi/images/documentos/dissertao_clarissa_s_marco2012.pdf>Acesso em 13/10/2015

SANTOS, David Ferreira; REBELATO, Marcelo Giroto; RODRIGUES, Andreia Marize. **Análise da viabilidade econômica de uma planta para captura de CO₂ na indústria alcooleira.** Revista gestão & tecnologia. Pedro Leopoldo, vol.2, n.2, 2012

SCHMIDELL, W. FACCIOTTI, M. C. R. **Biorreatores e Processos Fermentativos.** In: Schmidell, Willibaldo et al.(Coord.). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blücher, Biotecnologia Industrial; v.2, 2001.

SERRA, G.E; Contaminação da fermentação alcoólica:” flocculação do fermento”. **Brasil açucareiro.** Vol. 93, nº 6, junho 1979

SERMATEC. **Evoluindo com o Brasil,** 2015. Disponível em: < <http://www.sermatec.com.br/produtos/peneira-molecular/>>. Acesso em 24/06/2015.

SMAR. **Produção de álcool.** Disponível em http://www.smar.com/Brasil/wsugar/20_producao_de_alcool. Acesso em 28/09/2015

SOUSA, R.L.; SCABORA, M.H.; SILVA, E.M.; PRETONI, T.F. **Identificação de leveduras contaminantes em fermentação do tipo batelada em usina de álcool de Pereira Barreto - SP.** Faculdades integradas de três lagoas. Encontro científico dos estudantes da AEMS. Três Lagoas – MS, 2011. Disponível em < <http://www.aems.edu.br/conexao/edicaoanterior/Sumario/2013/downlo-ads/2013/1/15.pdf>>. Acesso em 02/06/2015

SOUZA, Crisla Serra. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linha *S. cerevisiae***. USP – Instituto Butantan/IPT. São Paulo, 2009. Disponível em <www.teses.usp.br/teses/...05082009>. Acesso em 10/06/2015

STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2001.

STROPPIA, C. T.; **Avaliação da ação de antibióticos utilizados na fermentação alcoólica através do consumo de açúcar por bactérias contaminantes**. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas - SP, 1998.

SULZER, **Misturadores Estáticos**. Jundiaí – SP, 2015. Disponível em: <<http://www.sulzer.com/pt/Products-and-Services/Agitators-Mixers-and-Dispensers/Static-Mixers>>. Acesso em 04/05/2015

TELEKEN, Joel Gustavo. **Bioetanol**. Universidade Federal do Paraná – setor Palotina-PR, 2014. Disponível :

<http://www.unicentro.br/posgraduacao/mestrado/bioenergia/material_didatico/2014/Bioetanol_BIOENERGIA_538342e37dfbf.pdf>. Acesso em 20/05/2015.

TILBURY, R. H. **Occurrence and effect of lactic acid bacteria in the sugar industry**. In: CARR, J. G.; CUTTING, C. V.; WHITING, G. C. Lactic acid bacteria in beverages and food. New York: Academic Press, 1975. p.177-191.

UDOP. União dos Produtores de Bioenergia. **Fluxograma da produção de álcool**. Disponível em: <<http://www.udop.com.br/index.php?item=noticias&cod=29960>>. Acesso em 09/09/2015

URBANO, Luiz Henrique. **Fermentação etanólica em mostos hidrolisados de hidrolisados de amido de mandioca**. Unesp, Botucatu – SP, 2012. Disponível em: <www.pg.fca.unesp.br/Teses/PDFs/Arq0821.pdf>. Acesso em 22/06/2015

USINA ALCOESTE. **Produção**. Fernandópolis – SP, 2015. Disponível em: <http://www.alcoeste.com.br/?pg=perguntas_g>. Acesso em 05/08/2015

USINA MORENO. **Processo produtivo do etanol**. 2015. Disponível em: <<http://www.usinamoreno.com.br/produtos/16/27/Etanol>>. Acesso em 20/05/2015

USINA SÃO FERNANDO. **Tratamento do caldo**. Dourados-MS, 2015. Disponível em: <http://www.usinasaofernando.com.br/conteudo_site.asp?tipoID=2>. Acesso em 06/06/2015

VALSECHI, Octávio Antônio. **Perdas no processo: do campo a indústria**. Curso teórico e prático da fermentação etanólica UNESP/UFSCAR, 2006. Disponível emfile:///C:/Users/CASA/Pictures/Perdas%20no%20processo%20da%20lavoura%20a%20industria%20(1).pdf.Acesso em 06/08/2015

VASCO DA GAMA. Colégio Vasco da Gama. **Transformação e utilização de energia pelos seres vivos: Fermentação**. Disponível em <<http://www.colegiovascodagama.pt/ciencias3c/decimo/index.html>>. Acesso 10/06/2015

VASCONCELOS, Clara Braunger. **Fermentação alcoólica como uso de levedura floculantes em reator tipo torre**. Universidade Federal de Uberlândia, 2011. Disponível em <ftp://ftp.feq.ufu.br/Curso_Eng_Quimica/Monografias> Acesso em 12/10/2015

VIAN, C.E.F. **Qualidade de matéria prima**. Agência Embrapa de Informação Tecnológica – Brasília DF, 2015. Disponível <www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/canade-acucar/arvore/contago1_138_22122006154842.html>. Acesso em 08/06/2015

VIEGAS, M.C. **Otimização de sistema de fermentação alcoólica contínua utilizando reatores tipo torre e leveduras com características floculantes**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 2003

VIEIRA, Érica N R. **Influência do tipo de mosto e do gênero de levedura na formação de amins bioativas e carbamato de etila em destilados alcoólicos**. UFV-Viçosa MG, 2011. Disponível em: < <http://alexandria.cpd.ufv.br:8000/teses/ciencia%20e%20tecnologia%20de%20alimentos/2011/238413f.pdf>>. Acesso em 26/09/2015

VILLEN, R. A. Mauá: **Biotechnologia – Histórico e Tendências**. Escola de Engenharia de Mauá. Apostila, 2009.

VOLPE, Pedro L O. **Estudo da fermentação alcoólica de soluções diluídas de diferentes açúcares utilizando microcalorimetria de fluxo**. Instituto de Química – UNICAMP – 13083-970 Campinas – SP, 1996. Disponível em < www.scielo.br/pdf/qn/v20n5/4894.pdf>. Acesso em 26/09/2015