

UFSCar - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CCET - CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DQ - DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
Trabalho de Conclusão de Curso

SUZANA SANTANA FRANCISCO

**Fermentação alcoólica: contaminação bacteriana e métodos para
sua detecção**

São Carlos - SP

2025

SUZANA SANTANA FRANCISCO

**Fermentação alcoólica: contaminação bacteriana e métodos para
sua detecção**

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento de
Química da Universidade Federal de
São Carlos como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Química Tecnológica.**

Orientadora: Prof^ª. Dra. Teresa Cristina Zangirolami

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza

São Carlos - SP

2025



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - DQ/CCET

Rod. Washington Luís km 235 - SP-310, s/n - Bairro Monjolinho, São Carlos/SP, CEP 13565-905
 Telefone: (16) 33518206 - <http://www.ufscar.br>

DP-TCC-FA nº 9/2025/DQ/CCET

Graduação: Defesa Pública de Trabalho de Conclusão de Curso

Folha Aprovação (GDP-TCC-FA)

FOLHA DE APROVAÇÃO

SUZANA SANTANA FRANCISCO

FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA: CONTAMINAÇÃO BACTERIANA E MÉTODOS PARA SUA DETECÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso

Universidade Federal de São Carlos – Campus São Carlos

São Carlos, 14 de fevereiro de 2025

ASSINATURAS E CIÊNCIAS

Cargo/Função	Nome Completo
Orientador	Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami
Membro da Banca 1	Prof. Dr. Felipe Christoff Wouters
Membro da Banca 2	MSc. Vanessa Moreira Costa Diana



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Samuel Schwab, Professor(a)**, em 18/02/2025, às 07:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufscar.br/autenticacao>, informando o código verificador **1748283** e o código CRC **5A2D815C**.

Referência: Caso responda a este documento, indicar expressamente o Processo nº 23112.001933/2024-38

SEI nº 1748283

Modelo de Documento: Grad: Defesa TCC: Folha Aprovação, versão de 02/Agosto/2019

AGRADECIMENTOS

Tudo é nada sozinho.

Os meus passos são guiados e confiados a Deus, que sempre se faz presente nos meus pensamentos, no meu coração e na minha intuição.

Aos meus pais Arlindo e Selma, que quando eu pensei em desistir, me aconselharam e me incentivaram a continuar.

Aos meus irmãos, Maria Eduarda e Luiz Otávio, que desde a notícia das suas vindas ao mundo, são a razão da minha vida, iluminam e enchem de graça tudo que é escuro e sem forma.

À Jaqueline, que acompanhou desde o sonho até a conclusão, me incentivou financeiramente, mentalmente e sentimentalmente, me deu forças e nunca deixou de acreditar e incentivar nos momentos difíceis. Acredito em você, assim como você acredita em mim.

Aos professores do Departamento de Química e Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, em especial a Prof^{ta}. Teresa Cristina Zangirolami e a Prof^{ta}. Dulce Helena Ferreira de Souza que coordenaram a escrita deste trabalho.

Ao Programa de Educação Tutorial “Usina de Reflexão” e todo o time, por todo conhecimento adquirido junto ao grupo, que me fazem refletir de forma crítica aos cenários sociais até hoje.

À Fermentec e aos colegas de Iniciação Científica, que me ensinaram de forma paciente grande parte do meu conhecimento sobre microbiologia.

Ao Programa de Assistência Estudantil da UFSCar.

Às minhas amigas Sara e Annie, que dividiram comigo dias felizes e dias de angústias, o pão de cada dia e noites de tantas risadas, que não quero nunca perder na memória. Aos meus amigos de graduação Laura, Larissa, Júlio e Gabriel (in memoriam), que compartilhamos os desafios do curso, dividimos problemas da vida, cantamos, dançamos, choramos e nos apoiamos até o final desse ciclo.

A todos os amigos e colegas, que se fizeram família e a todos os professores, mestres de vida, desde o ensino fundamental até o dia de hoje.

Meu sincero muito obrigada.

Tudo, não seria nada sem vocês.

RESUMO

A fermentação alcoólica, conduzida principalmente por leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae*, destaca-se pela sua eficiência e simplicidade operacional. No Brasil, a cana-de-açúcar é a principal matéria-prima utilizada, devido à sua alta produtividade e eficiência na conversão de açúcares fermentáveis em etanol e dióxido de carbono. Devido à escala de produção, que inviabiliza a realização do processo em condições assépticas, a ocorrência de contaminação bacteriana na fermentação alcoólica industrial é inevitável. As bactérias contaminantes, como as dos gêneros *Lactobacillus* e *Acetobacter*, competem com as leveduras por substratos e produzem compostos inibitórios, reduzindo o rendimento em etanol e aumentando os custos operacionais. O acompanhamento e a quantificação da presença das bactérias contaminantes são essenciais para o gerenciamento adequado das intervenções no processo visando a contenção da contaminação. Métodos tradicionais, como a contagem direta ao microscópio, apresentam limitações quanto à precisão e rapidez na detecção. Em contraste, técnicas modernas, como espectroscopia de infravermelho próximo e sensores portáteis, oferecem maior precisão e rapidez no monitoramento fermentativo. Este estudo descreve três métodos de acompanhamento da presença de bactérias em fermentações alcoólicas e analisa as vantagens e limitações desses métodos no contexto industrial, ressaltando a importância do aprimoramento das técnicas de monitoramento da contaminação para a sustentabilidade e a eficiência do setor sucroalcooleiro. Diferentes técnicas de fermentação, como os processos contínuo e descontínuo, além do método Melle-Boinot, amplamente utilizado por combinar eficiência e sustentabilidade econômica, são abordados. Aspectos como a relevância da fermentação alcoólica na matriz energética brasileira, seu impacto ambiental positivo na redução de emissões de gases de efeito estufa e sua contribuição para o desenvolvimento econômico e social de regiões rurais são comentados. O avanço em tecnologias, como a produção de etanol de segunda geração (E2G), amplia ainda mais a viabilidade sustentável do setor sucroalcooleiro, reforçando o papel estratégico do Brasil no cenário global de biocombustíveis. O estudo conclui que o avanço tecnológico no controle microbiológico é essencial para otimizar os processos produtivos, reduzir perdas e atender às demandas crescentes por biocombustíveis sustentáveis.

Palavras-chave: Fermentação alcoólica; Etanol; Cana-de-açúcar; Monitoramento microbiológico; Contaminação bacteriana.

ABSTRACT

Alcoholic fermentation, carried out mainly by yeasts of the genus *Saccharomyces cerevisiae*, stands out for its efficiency and operational simplicity. In Brazil, sugarcane is the main raw material used, due to its high productivity and efficiency in converting fermentable sugars into ethanol and carbon dioxide. Due to the scale of production, which makes it impossible to carry out the process under aseptic conditions, the occurrence of bacterial contamination in industrial alcoholic fermentation is inevitable. Contaminating bacteria, such as those from *Lactobacillus* and *Acetobacter* genus, compete with yeasts for substrates and produce inhibitory compounds, reducing ethanol yield and increasing operating costs. Monitoring and quantifying the presence of contaminating bacteria are essential for the proper management of interventions in the process aimed at containing contamination. Traditional methods, such as direct counting under a microscope, have limitations in terms of accuracy and speed of detection. In contrast, modern techniques, such as near-infrared spectroscopy and portable sensors, offer greater accuracy and speed in fermentation monitoring. This study describes three methods for monitoring the presence of bacteria in alcoholic fermentations and analyzes the advantages and limitations of these methods in the industrial context, highlighting the importance of improving contamination monitoring techniques for the sustainability and efficiency of the sugar and ethanol sector. Different fermentation techniques, such as continuous and discontinuous processes, as well as the Melle-Boinot method, widely used for combining efficiency and economic sustainability, are addressed. Aspects such as the relevance of alcoholic fermentation in the Brazilian energy matrix, its positive environmental impact in reducing greenhouse gas emissions and its contribution to the economic and social development of rural regions are discussed. Advances in technologies, such as the production of second-generation ethanol (E2G), further expand the sustainable viability of the sugar and ethanol sector, reinforcing Brazil's strategic role in the global biofuels scenario. The study concludes that technological advances in microbiological control are essential to optimize production processes, reduce losses and meet the growing demands for sustainable biofuels.

Keywords: Alcoholic fermentation; Ethanol; Sugarcane; Microbiological monitoring; Bacterial contamination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ambix, aparelho de destilação de Zósimo, de Marcelin Berthelot, “Coleção de Alquimistas Gregos Antigos”	15
Figura 2 - Estruturas dos componentes de celulose, hemicelulose e lignina da biomassa lignocelulósica.....	17
Figura 3 - Rota metabólica simplificada da produção de etanol pelas leveduras.....	20
Figura 4 - Produção de biocombustíveis em 2018 em comparação ao consumo previsto para 2030.....	29
Figura 5 - Consumo Mundial de Etanol e projeção para 2029.....	29
Figura 6 - Rotas tecnológicas para a produção de etanol.....	30
Figura 7 - Fluxo da produção de açúcar e etanol a partir da cana de açúcar.....	32
Figura 8 - Produção e Demanda de etanol no Brasil.....	33
Figura 9 - Imagem real de microscopia de viabilidade celular de leveduras coradas com azul de metileno, sobre câmara de Neubauer.....	35
Figura 10 - Análise de viabilidade celular de leveduras com a utilização de eritrosina B.....	37
Figura 11 - Leveduras e bactérias do gênero <i>Lactobacillus</i> dispersos (a) e floculados (b) em fermentação etanólica.....	39
Figura 12 - Imagem real de microscopia de análise de contaminação.....	43

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Percentual da viabilidade celular.....	36
Equação 2 - Percentual de células que estão se multiplicando no meio reacional.....	38
Equação 3 - Viabilidade de brotamento.....	38
Equação 4 - Número de bastonetes/mL presentes na amostra.....	43
Equação 5 - Conversão da concentração de ácido láctico na amostra em mmol/L em ppm...	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características de sistemas de fermentação industrial.....	21
Tabela 2 - Diferentes processos de fermentação usados no Brasil.....	24
Tabela 3 - Análise comparativa de diferentes aspectos dos métodos de acompanhamento da presença de bactérias em fermentações alcoólicas.....	47

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

ATP - Adenosina Trifosfato

CBIOs - Créditos de Descarbonização

CIDE - Contribuições de Intervenção no Domínio Econômico

CNPEM - Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

COFINS - Contribuição para Financiamento da Seguridade Social

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

E1G - Etanol de Primeira Geração

E2G - Etanol de Segunda Geração

EPE - Empresa de Pesquisa Energética

ESG - *Environmental, Social and Governance* (Ambiental, Social e Governança)

IA - Inteligência Artificial

ICMS - Imposto sobre Circulação de Mercadorias e Serviços

IEA - *International Energy Agency* (Agência Internacional de Energia)

LED - Diodo emissor de luz

NAD⁺ Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NADH Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NIR - *Near Infrared* (Infravermelho Próximo)

pH - Potencial Hidrogeniônico

PIS - Programa de Integração Social

pKa - *Negative Logarithm of the Acid Dissociation Constant* (Logaritmo Negativo da Constante de Dissociação Ácida)

ppm - Partes por milhão

RNA - Ácido Ribonucleico

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

UNEM - União Nacional do Etanol de Milho

UNICA - União da Indústria de Cana de Açúcar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. A “água da vida” - os primeiros relatos da destilação e da utilização do álcool	13
2.2. Etanol	16
2.3. Fermentação Alcoólica	19
2.4. Indústrias sucroalcooleiras e a produção de etanol no Brasil	27
2.5. Leveduras e seus principais parâmetros de análise	33
2.6. Contaminação bacteriana em fermentações alcoólicas	38
2.7. Métodos de acompanhamento da presença de bactérias em fermentações alcoólicas	41
2.8. Tendências futuras no acompanhamento da contaminação bacteriana em fermentações alcoólicas	47
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. INTRODUÇÃO

A fermentação alcoólica é um processo amplamente utilizado na produção de etanol, entretanto, a eficiência desse processo pode ser comprometida pela presença de bactérias contaminantes, que competem com as leveduras por substratos e produzem compostos inibitórios, como ácidos lático e acético, que reduzem o rendimento do etanol e elevam os custos operacionais. A contenção da contaminação bacteriana é um desafio significativo em usinas sucroalcooleiras, exigindo a implementação de estratégias de controle e monitoramento eficazes (Ceccato-Antonini, 2021).

Embora o método de contagem direta ao microscópio seja bem consolidado nas usinas sucroalcooleiras para o acompanhamento microbiológico, novos métodos têm sido desenvolvidos para proporcionar maior rapidez, precisão e sensibilidade, como técnicas baseadas em sensores e infravermelho (Ventura, 2007; Pasquini, 2003). Essas abordagens não apenas permitem a detecção precoce de contaminantes, mas também oferecem informações detalhadas sobre as condições microbiológicas do processo fermentativo, possibilitando intervenções mais eficazes.

O monitoramento frequente da presença bacteriana é essencial para garantir a eficiência e a sustentabilidade do processo fermentativo, reduzindo as perdas econômicas e minimizando os impactos ambientais. As usinas sucroalcooleiras desempenham um papel fundamental na produção de etanol, um biocombustível amplamente utilizado no Brasil e em várias partes do mundo. O processo de fermentação alcoólica, que transforma açúcares presentes no caldo de cana em etanol, é a etapa central nesse tipo de indústria, sendo que a presença de bactérias contaminantes durante a fermentação pode prejudicar significativamente a eficiência e o rendimento da produção, causando perdas econômicas e alterações indesejadas na qualidade do produto final (Ventura, 2007).

Bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Acetobacter* são frequentemente encontradas nesse tipo de processo fermentativo e competem diretamente com as leveduras, pela utilização dos açúcares (Ceccato-Antonini, 2021). Além de reduzirem o rendimento da produção de etanol, essas bactérias podem produzir compostos indesejáveis, como ácidos orgânicos (lático e acético), que inibem a atividade das leveduras, além de aumentar o custo operacional das usinas devido ao aumento no consumo de insumos (como antibióticos) e à necessidade de intervenções para controlar a contaminação (Ventura, 2007).

A produção de etanol em usinas sucroalcooleiras é um dos pilares da matriz energética e industrial do Brasil, sendo de extrema importância tanto para o abastecimento interno de

combustíveis quanto para a exportação. Embora as usinas possuam estratégias para controle microbiológico, os métodos de monitoramento da presença de bactérias ainda podem ser aprimorados para garantir maior precisão, rapidez e custo-benefício. Métodos otimizados de acompanhamento podem levar a um diagnóstico precoce de contaminações, facilitando as ações corretivas e garantindo a viabilidade econômica do processo fermentativo (Ceccatto-Antonini, 2021). É fundamental prospectar e avaliar os métodos de detecção de bactérias em fermentações alcoólicas, buscando identificar aqueles que oferecem maior eficácia no ambiente industrial. Isso permitirá não apenas a otimização do processo produtivo, mas também a garantia de um controle microbiológico mais eficiente, contribuindo para a sustentabilidade do setor sucroalcooleiro. A melhoria nas práticas de monitoramento bacteriano pode favorecer o desenvolvimento de novas tecnologias e metodologias que reduzam os impactos das contaminações, beneficiando o setor de biocombustíveis e a economia como um todo.

Diante desse cenário, torna-se essencial a aplicação de métodos eficazes para o monitoramento da presença bacteriana ao longo do processo de fermentação alcoólica, que permitam a detecção precoce de contaminações e a implementação de medidas corretivas que minimizem os impactos negativos sobre o processo produtivo. Assim, o presente estudo tem como principal objetivo fazer um levantamento acerca de alguns dos métodos de acompanhamento da presença de bactérias em fermentações alcoólicas nas usinas sucroalcooleiras, com ênfase em sua aplicabilidade, vantagens e limitações no contexto industrial.

Com base na análise dos resultados do levantamento, espera-se contribuir para uma reflexão acerca da otimização do controle microbiológico no setor sucroalcooleiro, promovendo práticas mais eficientes e alinhadas aos princípios de sustentabilidade, além de promover o avanço técnico-científico no controle microbiológico em ambientes industriais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A “água da vida” - os primeiros relatos da destilação e da utilização do álcool

Muitos autores e pesquisadores consideram que o álcool foi extraído pela primeira vez através do vinho ou de outras bebidas fermentadas. Na Alexandria, segundo Zósimo¹ de

¹ Na obra “Tratado dos Fornos”, Zósimo descreve aparelhos de vidros destinados ao processo de destilação antes dos árabes terem definido sua existência.

Panópolis (alquimista que viveu no século IV), os sábios locais dominavam a técnica da destilação com instrumentos desenvolvidos especialmente para seus experimentos, inclusive o alambique (Amorim, 2005). Infelizmente, as pesquisas realizadas nesse território se perderam com as invasões dos povos árabes e pelos exércitos romanos de Júlio César em 641 a.C e 48 a.C., respectivamente. Os árabes não só dominaram como também aperfeiçoaram a técnica de destilação, com a assimilação das culturas que ficaram sob seu domínio, como os antigos egípcios, judeus e gregos. No século VIII, o alquimista e filósofo árabe Geber, escreveu um tratado sobre a destilação da aguardente² de vinho, e aperfeiçoou os métodos existentes com o uso do alambique (Amorim, 2005). Em Salerno, na Itália, por volta de 1110, sabe-se que o álcool etílico puro era fabricado, e aos poucos se desenvolveu com o emprego de desidratantes (como o carbonato de potássio). Já eram então diferenciados dois tipos: o *acqua ardens*, de 60 graus alcoólicos e a *acqua vitae*, com 90 graus, e então o álcool começou a ser conhecido na Europa (Amorim, 2005). Aos poucos, a ideia de que a fabricação do álcool só poderia ser possível a partir da fermentação foi sendo aceita, e em 1600, com o Renascimento, novos procedimentos para obter-se o álcool industrial foram descritos (Amorim, 2005).

A Figura 1 é uma ilustração do aparato de destilação descrito e utilizado por Zósimo de Panópolis (AlkhemyLab, 2020).

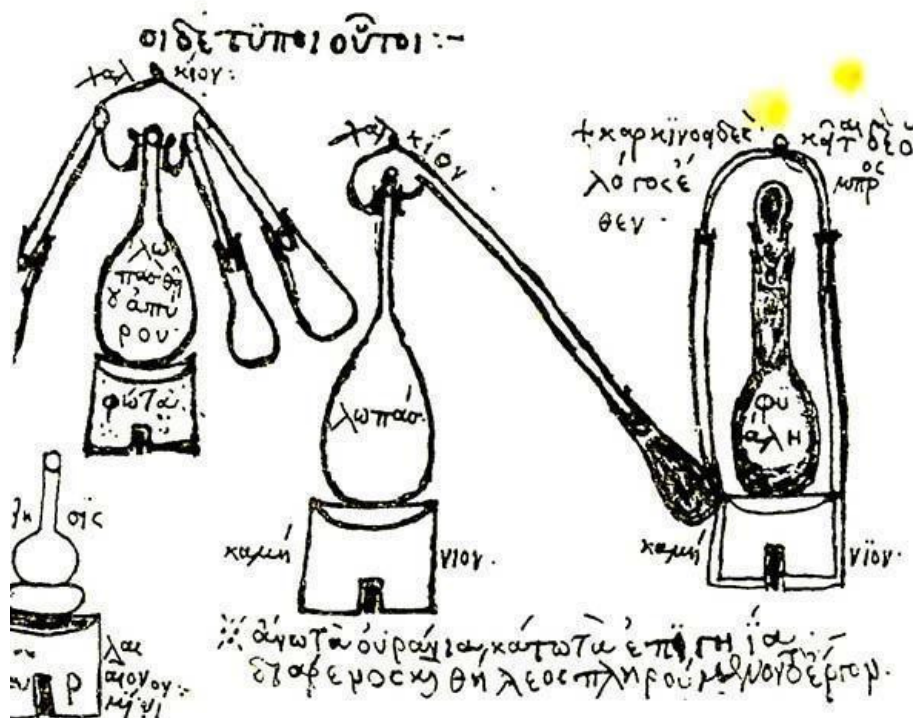
A palavra álcool tem origem do árabe (*al*, o artigo "a", e *kóhol*, "coisa útil"), e a primeira utilização do nome álcool é creditada ao médico suíço Theophrast Bombast von Hohenheim, onde em seus estudos, descrevia com detalhes a sua própria concepção de como deveria ser realizada a destilação (Amorim, 2005).

Ao final do século XV, o álcool deixou de ser monopólio dos sábios e alquimistas e passou para as mãos de comerciantes, principalmente holandeses, que além de se interessarem pela sua produção, também viram valor econômico agregado ao produto e visavam comercializá-lo. Aos poucos, os aparelhos de destilação foram sendo aperfeiçoados e, em 1796, Lowitz conseguiu obter álcool 100%, partindo de um líquido de alta concentração alcoólica, fazendo o uso também de um desidratante (Amorim, 2005). No início do século XX, a utilização do álcool foi ampliada consideravelmente, pelo emprego na indústria química, para fins científicos, e na fabricação de bebidas e vinagres. Tal ampliação do uso do álcool exigiu modernização nos processos de obtenção. O método mais tradicional consistia no preparo do

² Uma bebida de alto teor alcoólico, resultante de um processo de destilação de vinhos, licores ou produtos vegetais.

mosto com matérias açucaradas, ou amiláceas (aquelas que são fontes de amido) que sacarificavam³ (processo de conversão de amido em açúcar). Este mosto era submetido à fermentação alcoólica e depois à destilação, desse processo obtinha-se o álcool com um grau mais ou menos elevado, denominado flegma, e um resíduo, a vinhaça. A flegma (produto que se obtém na primeira destilação de suco fermentado de cana e de frutos, e que ainda contém diversas impurezas) devia ser retificada (série de várias etapas de destilação) antes de sua comercialização (Amorim, 2005).

Figura 1 - Ambix, aparelho de destilação de Zósimo, de Marcelin Berthelot, “Coleção de Alquimistas Gregos Antigos”.



Fonte: AlchemyLab (2020).

O processo de destilação comum descrito, permitia obter o álcool com titulação máxima a 96%. Para elevá-la em 2-3%, e retirar a água que restava, recorria-se à desidratação com agentes químicos (como a cal viva, o carbureto de cálcio e o cloreto de cálcio). Em seguida, era submetido a uma nova destilação e o produto final era o chamado álcool absoluto. Entretanto, este método era delicado e caro, não sendo bem aplicável à escala industrial (Amorim, 2005).

³ Processo de hidrólise de carboidratos complexos, como amido e celulose, em monossacarídeos (açúcares mais simples), como a glicose.

Ao longo da década de 1970, a hipótese da utilização do álcool como força motriz para impulsionar motores de automóveis começou a crescer, devido às duas crises do petróleo, que forçaram a busca por outras fontes de energia. Através da fermentação da sacarose, o álcool passou a ocupar esse papel de forma promissora, por oferecer índices menores na emissão de gases poluentes (Amorim, 2005).

2.2. Etanol

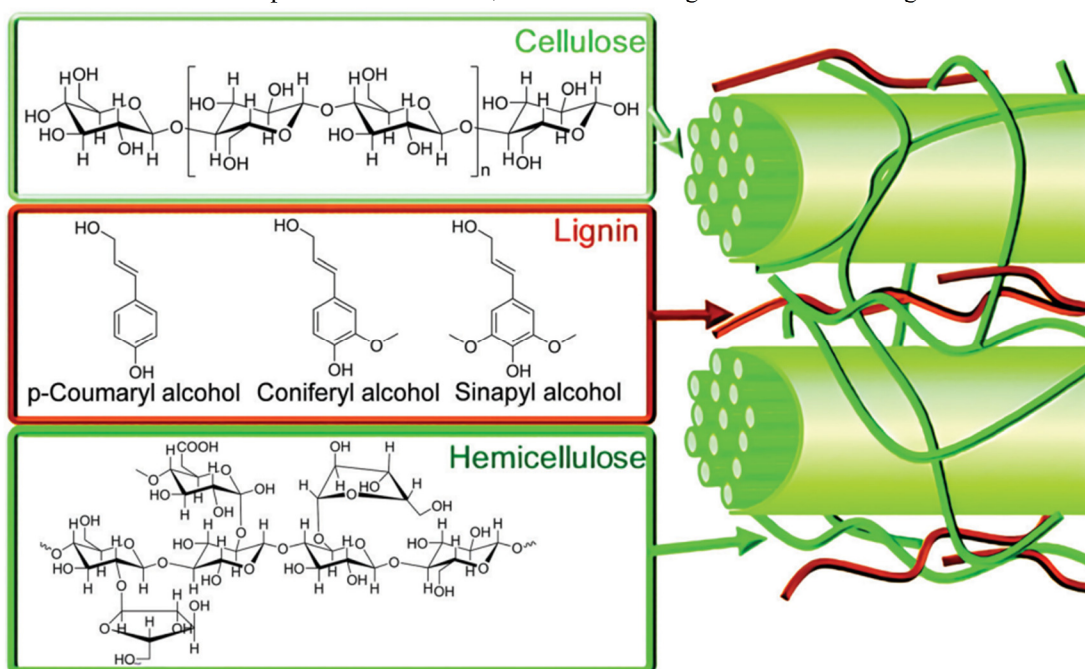
Como já mencionado anteriormente, o etanol é uma substância orgânica, obtida pelo processo de fermentação de açúcares (rota bioquímica) ou pela hidratação do etileno (rota química). O álcool etílico é líquido à temperatura ambiente, com pontos de fusão e ebulição de $-114,3^{\circ}\text{C}$ e $78,5^{\circ}\text{C}$, respectivamente (NovaCana, 2013). Incolor, volátil, inflamável e solúvel em água, suas moléculas são constituídas por carbono, hidrogênio e uma hidroxila ligada ao carbono saturado ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ou $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$). Além da cana de açúcar, a cevada, o milho, a aveia, o trigo e o sorgo, são utilizados como matéria prima no processo produtivo de etanol (Raízen, 2022).

O etanol pode ser obtido a partir de alguns compostos, sendo os mais explorados a sacarose, os amidos e a celulose:

- Sacarose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) - apesar de ser um composto presente em várias plantas que passam pelo processo de fotossíntese, este açúcar é encontrado principalmente na cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e na beterraba (*Beta vulgaris*). A cana-de-açúcar é uma das matérias-primas mais atraentes para a produção de etanol, visto que o caldo extraído a partir da cana contém formas simples de carboidratos fermentáveis, ou seja, açúcares e pelo balanço de CO_2 no processo de fotossíntese (Costa *et al.*, 2005).
- Amidos - são encontrados em cereais (milho, trigo, cevada etc) e tubérculos (batata-doce, batata etc). Quando o amido é utilizado como matéria-prima, deve inicialmente ser hidrolisado, em glicose ou maltose, através do processo conhecido como sacarificação, que introduz um passo adicional na produção de etanol (Gallo *et al.*, 2012).
- Celulose - o etanol de segunda geração (E2G) ou etanol celulósico é obtido a partir de resíduos do processo de produção do etanol de primeira geração (E1G) e do açúcar ou de materiais ricos em celulose. A biomassa que será processada pode ser composta por bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho, cascas de arroz e outros subprodutos agrícolas. A sua produção consiste na conversão das cadeias poliméricas da estrutura

das plantas (celulose, hemicelulose e lignina) (Figura 2), em açúcares simples (glicose, xilose, arabinose e galactose). Esta conversão acontece via hidrólise com processos físicos, químicos e enzimáticos, incluindo pré-tratamentos que alteram a estrutura das cadeias poliméricas e a sacarificação, por hidrólise ácida ou enzimática, para conversão da celulose em glicose e da hemicelulose em xilose, glicose e arabinose (Pacheco, 2011).

Figura 2 - Estruturas dos componentes de celulose, hemicelulose e lignina da biomassa lignocelulósica.



Fonte: Royal Society of Chemistry.

A produção de etanol é diferenciada a partir do tipo de substância que se deseja como produto final, ou seja, o etanol anidro (álcool etílico anidro) ou o etanol hidratado (álcool etílico hidratado):

- Anidro - esse tipo de álcool possui teor alcoólico mínimo de 99,3° de acordo com o Instituto Nacional de Pesos e Medidas (INPM), com a concentração de água sendo no máximo de 0,5% (Raízen, 2022);
- Hidratado - é uma mistura hidroalcoólica, possuindo teor alcoólico mínimo de 92,6° INPM, com a concentração de água sendo no máximo de 5% (Raízen, 2022).

Apesar de ser diferenciado a partir desses dois tipos básicos, o etanol pode ser diferenciado a partir da graduação alcoólica e da presença ou não de outros componentes e impurezas:

- Etanol Hidratado Neutro - esse produto exige alto grau de pureza por ter aplicações nobres, como uso humano e veterinário, por essa razão sua produção exige dois processos: a hidrosseleção e o repasse (Raízen, 2022);
- Hidratado Industrial - não envolve uso humano e em geral é requerida uma graduação alcoólica mínima de 94,0% m/m, ou seja, teores baixos de impurezas (Raízen, 2022);
- Etanol Hidratado Carburante - encontrado em postos de combustíveis para abastecimento de automóveis, em sua composição possui entre 95,1% e 96% de etanol, com o restante sendo água (Raízen, 2022);
- Etanol Hidratado Especial (REN e COREIA) - para a produção de etanóis especiais, várias especificações são exigidas. Atualmente, o mercado externo demanda produtos com designações REN, COREIA 24 e COREIA 40 (os números 24 e 40 referem-se à quantidade máxima de álcoois superiores permitida). Além da remoção de óleos baixos e altos na retificação, procedimentos como repasse e hidrosseleção (para remoção de impurezas) podem ser requeridos nessa produção (Raízen, 2022);
- Etanol Anidro Industrial e Neutro - caracterizado pela baixa quantidade de água (menos de 1%), é utilizado na mistura da gasolina que, nos termos da Lei nº 9.478 de 6 de agosto de 1997, autoriza uma faixa de 18% a 27% de etanol anidro misturado na gasolina. Outrossim, este produto pode ser aplicado na fabricação de tintas, vernizes, aerossóis, desodorantes, entre outros (Raízen, 2022);
- Etanol Aditivado - esse tipo de etanol é misturado com detergentes aditivos que dissolvem resíduos de combustíveis que podem se formar no interior dos motores dos automóveis. Este tipo de “limpeza” promete melhorar o rendimento do automóvel e proporcionar menor desgaste para o motor (Raízen, 2022).

Em suma, o etanol como biocombustível apresenta vantagens significativas do ponto de vista ambiental. Tanto a cana-de-açúcar quanto o milho (as duas matérias-primas mais utilizadas na produção de etanol) são plantas com alta eficiência na conversão de CO₂ atmosférico e água em polímeros, como amido, celulose e hemicelulose e açúcar, por meio da fotossíntese, que utiliza a energia da luz solar para fixar carbono e liberar oxigênio no ar atmosférico (Ceccato-Antonini, 2021). Neste cenário, conclui-se que todo o CO₂ resultante da

queima do etanol é reciclado por meio da fotossíntese, contribuindo para reduzir a taxa de redução das emissões de gases do efeito estufa de 40 a 62% quando se utiliza etanol de cana-de-açúcar em comparação com a gasolina (Wang *et al.*, 2012; Lopes *et al.*, 2016).

2.3. Fermentação Alcoólica

A fermentação alcoólica é um processo metabólico essencial para a produção de energia em certos organismos. Inicialmente, a sacarose (o açúcar reserva da cana), sofre hidrólise e é convertida aos açúcares frutose e glicose, pela enzima invertase (enzima encontrada na levedura *S. cerevisiae*), esses monossacarídeos entram na célula por difusão facilitada e sofrem fosforilação intracelular (primeira etapa do ciclo glicolítico) (Ceccato-Antonini, 2021). Através de uma série de reações, ambos os monossacarídeos são convertidos a piruvato, este é descarboxilado pela enzima piruvato descarboxilase, formando acetaldeído e liberando CO₂. Em seguida, por meio de uma reação catalisada pela álcool desidrogenase, o acetaldeído é reduzido a etanol (Ceccato-Antonini, 2021).

Sendo assim, a fermentação alcoólica é o resultado de dois processos distintos: a glicólise e o metabolismo anaeróbico do piruvato. A glicólise divide-se em duas partes: a fase de seis carbonos (fase inicial) e a fase de de três carbonos (fase final). Na fase inicial, ocorre a fosforilação da glicose, que origina a frutose-1,6-difosfato, com o consumo de duas moléculas de ATP. A frutose-1,6-difosfato é quebrada e dá origem ao gliceraldeído-3-fosfato e a di-hidroxiacetona fosfato. O gliceraldeído-3-fosfato é degradado nas reações de glicólise e a di-hidroxiacetona fosfato é reversivelmente convertida em gliceraldeído-3-fosfato, pela enzima triose fosfato isomerase (Ceccato-Antonini, 2021) Na fase final, o piruvato é convertido, formando quatro moléculas de ATP. A reação de redução do piruvato a etanol pode ser dividida em duas etapas: primeiro, ocorre a descarboxilação do piruvato, e na segunda, o acetaldeído é reduzido a etanol (Ceccato-Antonini, 2021).

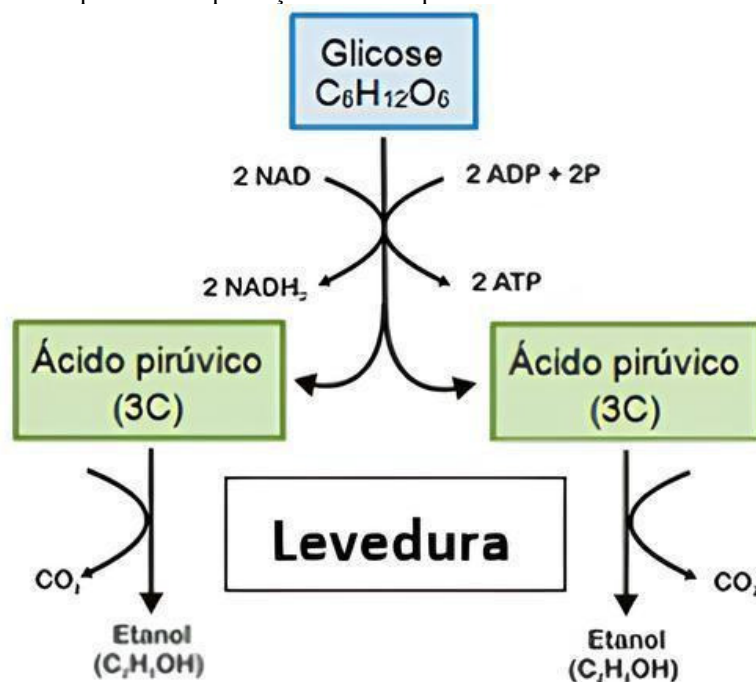
A produção de etanol e CO₂ a partir da sacarose, envolve 12 reações ordenadas, cada uma catalisada por uma enzima específica (Ceccato-Antonini, 2021).

A Figura 3, ilustra a rota metabólica realizada pelas leveduras para a produção de etanol.

Além de sua importância no setor alimentício, a fermentação alcoólica também desempenha um papel estratégico na produção de biocombustíveis, especificamente o etanol, uma alternativa mais sustentável e menos poluente do que os combustíveis fósseis. O etanol derivado da cana-de-açúcar e do milho é amplamente utilizado em países como Brasil e Estados Unidos, onde políticas governamentais incentivam a mistura de etanol à gasolina, visando

reduzir a emissão de gases de efeito estufa e a dependência de petróleo. Esse biocombustível não só proporciona uma redução nas emissões de dióxido de carbono, contribuindo para o combate ao aquecimento global, como também promove a geração de empregos e o desenvolvimento econômico em regiões agrícolas. No Brasil, por exemplo, a cadeia produtiva do etanol gera milhões de empregos diretos e indiretos e impulsiona o investimento em tecnologia agrícola e sustentabilidade, criando um ciclo econômico virtuoso que beneficia toda a cadeia produtiva do agronegócio (Senior, 2024).

Figura 3 - Rota metabólica simplificada da produção de etanol pelas leveduras.



Fonte: Fermentec, 2020.

Resumidamente, a fermentação alcoólica é um processo bioquímico exotérmico (necessita resfriamento), trabalhando com temperaturas de processo de 32°C a 35°C (Ceccato-Antonini, 2021).

O modo de operação de processos industriais depende do regime de produção escolhido. Basicamente, os tipos de regimes de produção são diferenciados entre batelada, contínuo e semi-contínuo (Propeq, 2020). A Tabela 1 distingue as características e o funcionamento dos modos de operação citados anteriormente:

Tabela 1 – Características de sistemas de fermentação industriais.

Regime	Características	Funcionamento
Batelada	Transiente	O sistema é operado de forma descontínua, onde cada batelada significa um “ciclo”. Após o produto final ser retirado do sistema, o reator é alimentado novamente com os insumos e inicia-se uma nova batelada (ou um novo ciclo). Nesse modelo as variáveis temperatura e concentração no reator variam com o tempo.
	Não estacionário	
Contínuo	Permanente	Nesse processo, não são realizadas paradas de reabastecimento do sistema, exceto paradas para manutenção, ou seja, a produção acontece de forma ininterrupta. O sistema é suprido simultaneamente ao produto sendo formado. Aqui, vazão e temperatura oscilam pouco ao longo do tempo. Esse é o processo utilizado na destilação do álcool (sistema é alimentado com mosto fermentado delevedurado e o álcool hidratado é produzido - a todo instante).
	Estacionário	
Semi-contínuo	Transiente	Neste tipo de operação a entrada da corrente de alimentação é contínua, mas geralmente a retirada da corrente de produto só ocorre ao final do processo. Variáveis como volume e concentração no reator variam com o tempo.

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Algumas variáveis são importantes para o acompanhamento, gestão e operação do processo produtivo. Para isso, as características da matéria-prima, do caldo e do vinho são acompanhadas por análises dos seguintes parâmetros (Centro de Tecnologia Canavieira, 2005):

- Cana-de-açúcar (Vian, 2022):
 - POL: porcentagem em massa de sacarose aparente contida em uma solução açucarada. É determinada pelo desvio provocado pela solução no plano de vibração da luz polarizada;

- Brix: porcentagem em massa de sólidos solúveis contidos em uma solução de sacarose quimicamente pura;
 - Pureza (POL/Brix): porcentagem de sacarose nos sólidos solúveis.
 - Impureza mineral solúvel;
 - ART: açúcares redutores totais;
 - AR: açúcares redutores (glicose e frutose);
 - ATR: açúcar total recuperável;
 - Fibra: possui poder energético e influência nas características do caldo de cana. A fibra é um fator de redução no cálculo do ATR, visto que, quanto maior seu teor, menor é a quantidade de açúcares nas moendas de cana, o que conseqüentemente impacta no pagamento de cana aos fornecedores (TECNAL).
- Mosto:
 - Brix;
 - POL;
 - pH;
 - Acidez: soma de todos os ácidos presentes no mosto;
 - Teor de impurezas: quantidade de impurezas (subprodutos não açucarados), como proteínas, fibras e sais minerais;
 - Cinzas: matéria mineral no mosto, ajuda a avaliar o nível de impurezas e pode influenciar o processo de clarificação;
 - Cor e turbidez: quantidade de sólidos suspensos e compostos orgânicos.
- Vinho:
 - Teor de etanol
 - Densidade
 - Acidez
 - pH
 - Açúcares redutores

Ao longo dos anos, no Brasil, foram sendo utilizadas diferentes estratégias de fermentação (Amorim, 2005), as quais estão descritas na Tabela 2:

Tabela 2 - Diferentes processos de fermentação usados no Brasil.

Processo	Características e rendimento fermentativo	Avaliação	
		Vantagens	Desvantagens
Batelada sem centrifugação	O mosto é adicionado lentamente sobre o fermento. O fermento geralmente flocula e decanta. Muito utilizado por fabricantes de aguardente. Rendimento fermentativo: 70%-75%	Menor custo de instalação.	Menor rendimento; Grande possibilidade de contaminação; Necessidade de fornecimento de levedura, caso não haja decantação.
Batelada com centrifugação - <i>Melle-Boinot</i> (década de 1970)	Preparo do pé-de-cuba e adição do mosto para fermentação em dornas. O mosto é centrifugado e o fermento é separado do “vinho” que vai para destilação. O fermento recuperado por centrifugação é transferido para uma cuba de tratamento onde recebe adição de água e ácido antes de retornar para a dorna de fermentação. Rendimento fermentativo: 75%-80%	Aproveitamento do levedo em várias fermentações; Otimização do tempo de fermentação para 10 horas; Diminuição da contaminação, mas não a índices satisfatórios.	Grande perda de fermento na recirculação (mau uso das centrífugas); Possibilidade de contaminação em torno de 10 ⁹ mL.
Batelada com centrifugação otimizada - Fermentec (década de 1990)	A partir de 1980 o processo <i>Melle-Boinot</i> recebeu aperfeiçoamentos, alcançando maior controle laboratorial e otimização das centrífugas. O caldo da cana moído nas moendas, é recebido na destilaria, aquecido e enviado para clarificação, afim de remover impurezas. Para garantir a qualidade do mosto ele é peneirado e recebe polímeros que auxiliam no processo de purificação. O caldo limpo é enviado para para pré- evaporadores que o concentram e o misturam com o melaço. Essa mistura se transforma no mosto, que é enviado para as dornas de fermentação. Terminado o processo, o vinho é conduzido para a dorna volante de vinho bruto e segue para as centrífugas, onde ocorrerá a recuperação do fermento. O “vinho” delevedurado é então bombeado para as colunas de destilação e as leveduras recebem tratamento ácido (com ácido sulfúrico) nas dornas de tratamento, esta etapa viabiliza a reutilização do fermento e auxilia na	Maior rendimento de fermentação; Rapidez (5-8 horas); Processo mais estável e menos sujeito a contaminação bacteriana (em torno de 10 ⁶); Passível de automação e permite trabalho com teores alcoólicos mais elevados (11%-12% v/v).	Maior custo de instalação (tempo ocioso das dornas nas operações de enchimento e esvaziamento); Maior custo com trocadores de calor.

	<p>retirada de bactérias acidófilas. O fermento, após ser tratado, é destinado para as chamadas cubas de descanso, onde permanece por cerca de duas horas. Caso haja a necessidade, é possível adicionar antibiótico nessas cubas para controle da contaminação. Após todo esse processo, o fermento está pronto para retornar ao processo.</p> <p>Rendimento fermentativo: 92% em média.</p>		
<p>Fermentação Contínua - Fermentec</p>	<p>4 a 5 dornas de fundo cônico. A primeira dorna é a maior e o seu volume de trabalho é 70% do volume da segunda e da terceira. O mosto entra pela parte superior. Se, o teor alcoólico é de 6%-8% na última dorna, todo o mosto e todo o fermento entram na primeira dorna, entretanto, se o teor alcoólico é de 8,5%-10%, aproximadamente 70% do mosto entra na primeira dorna e 30% na segunda.</p> <p>Rendimento fermentativo: 90%-91% (estimativa).</p>	<p>Menor custo de instalação; Menos trocadores de calor; Automação mais econômica.</p>	<p>Dificuldade na medição do rendimento real da fermentação ao utilizar caldo ou caldo e mel além de problemas de contaminação.</p>
<p>Fermentação Contínua adaptada com vários fermentadores</p>	<p>É uma adaptação do sistema por batelada pela união das dornas através de tubulações que saíam do fundo da primeira e entrando por cima na seguinte. O teor alcoólico é de 9% e para teores acima deste valor, pode ocorrer queda na viabilidade celular. As dornas recebem agitação para evitar a decantação do fermento.</p> <p>Rendimento fermentativo: 90% no máximo (estimativa).</p>	<p>Operação em duas alas (possibilita paralisação de metade da produção) além de uma automação menos dispendiosa que o sistema em batelada.</p>	<p>Dificuldade na medição do rendimento e na assepsia além da facilidade de contaminação para todas as dornas.</p>
<p>Fermentação Contínua - Copersucar</p>	<p>Todas as dornas são de fundo cônico. O “vinho” tem saída por baixo e entra por cima da dorna seguinte. O tratamento do fermento é realizado de forma contínua. A operação de teor alcoólico máximo fica entre 8,5%-9%.</p> <p>Rendimento fermentativo: 90% (estimativa).</p>	<p>Sistema compacto; Menor gasto com antiespumante e automação acessível.</p>	<p>Difícil assepsia nas dornas - aumento de contaminação e problemas com floculação.</p>
<p>Fermentação Contínua - Unicamp</p>	<p>Trabalho de quatro dornas de fundo cônico, sendo o nível da primeira menor do que o da segunda e o da terceira. O tamanho da primeira dorna permite a seguinte distribuição do material: 75%-80% de conversão na primeira, 89%-92% na segunda; 97,5%-98% na terceira e até 99% na quarta. De forma preferencial, deve ser operada com uma mistura de água e melaço, entretanto, algumas unidades operam com caldo. Este método permite trabalho com alto teor alcoólico e o sistema de agitação é indispensável.</p>	<p>Menos investimento em refrigeração de dornas; Menos mão de obra operacional e menor investimento na automação.</p>	<p>Problemas com contaminação.</p>

	Rendimento fermentativo: 91%-92% , estimativa da Unicamp.		
Fermentação Contínua - <i>Biostill</i> (com um ou dois fermentadores)	Desenvolvido na Suécia pela Alfa Laval em 1970. Baseia-se em um ou dois fermentadores, a vinhaça pode sair da coluna de destilação com até 35° Brix, dependendo do tipo de mosto. Este é colocado na dorna e recebe nutrientes e agitação, posteriormente é resfriado e centrifugado. Parte da vinhaça é resfriada e retorna ao processo. Rendimento fermentativo: 88% (estimativa).	<i>Layout</i> compacto e produz vinhaça concentrada em até 50% de sólidos.	Ocorrência de paralisações por queda de viabilidade do fermento; Baixos teores alcoólicos no vinho - limitando a produção e alto custo de implantação.
Fermentação Contínua - <i>Natron</i>	Utilização de leveduras floculantes. O melaço é a matéria prima. Grande parte da fermentação ocorre no fundo das dornas. A massa é enviada para um sedimentador de fundo cônico, onde pela parte inferior o levedo é bombeado de volta ao processo e o vinho sai por cima para ser direcionado a destilação. Rendimento fermentativo: 88%-89% no máximo.	Menor custo de implantação - não utiliza-se centrífugas e menores gastos com insumos.	Possibilidade de ocorrência de leveduras selvagens sobressaíram as leveduras selecionadas e perda excessiva de fermento.
Fermentação Contínua com uma dorna - <i>Fercen/Engenh o Novo</i>	agitação. O “vinho” é centrifugado e o levedo retorna para a mesma dorna. Nas paralisações, o levedo pode ser tratado na cuba. O enchimento da cuba é semelhante ao do sistema em batelada, entretanto, ao término do processo, a alimentação é contínua e o “vinho” começa a ser bombeado para a centrífuga. Rendimento fermentativo: 90% (estimativa).	Menos gasto com refrigeração e trabalho com teores alcoólicos altos no vinho.	Açúcar residual em grande quantidade.
Fermentação Contínua - <i>Combat/Empra l</i>	Idealizado para minimizar custos quando se quer elevar a capacidade da fermentação em batelada. Tem-se uma dorna grande no início, continuamente com teor alcoólico de 4%-7% (v/v); o “vinho” é centrifugado, tratado e retorna ao processo. Ao seguir para as demais dornas, o processo termina em batelada. Atualmente, o sistema é utilizado em poucas unidades industriais. Rendimento fermentativo: 90% (estimativa).	Bom para destilarias com fermentação a batelada que necessitam ampliação; Menor investimento em refrigeração e trabalho em alto teor alcoólico sem comprometer o rendimento.	Formação de zonas de contaminação; Aparecimento de leveduras selvagens; Alta produção de espumas e sérios problemas com limpeza.

Fonte: Adaptado de Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia, Amorim (2005).

No Brasil, o método mais utilizado é o *Melle-Boinot*, que combina fermentação em batelada alimentada com o reciclo de células. Essa abordagem reduz o estresse nas leveduras e maximiza a produtividade permitindo maior controle sobre as condições operacionais (Góes-Favoni *et al.*, 2018).

Entre os fatores biológicos que alteram a eficiência do processo de fermentação, destaca-se a importância das características da levedura utilizada. Leveduras adaptadas para o ambiente industrial precisam ser resistentes a altas concentrações de etanol, flutuações de temperatura, pH variado e contaminações por microrganismos indesejáveis, como bactérias e fungos (Santos, 2016). Neste contexto, cepas específicas de *Saccharomyces cerevisiae* podem alcançar níveis de eficiência superiores (Lima, 2021).

Já entre os fatores operacionais, a escolha do substrato é determinante para a produtividade. O caldo de cana, por exemplo, é amplamente utilizado devido à sua alta concentração de sacarose, que permite uma fermentação rápida e eficiente. A adaptação dos processos fermentativos às diferentes matérias-primas que podem ser utilizadas, requer ajustes significativos nas condições de operação, como a suplementação com nutrientes e o controle rigoroso do ambiente (Sonego, 2016). No nível técnico, além de temperatura e pH, altas concentrações de açúcares podem gerar inibição osmótica, enquanto baixas concentrações limitam a produtividade.

Outro desafio técnico significativo está relacionado à presença de contaminantes. Durante a fermentação, o meio pode ser tomado por bactérias e outros microrganismos que competem com as leveduras pelo substrato, reduzindo a eficiência do processo. A implementação de medidas de controle, como o uso de antibióticos ou agentes químicos para assepsia, têm se mostrado eficazes, mas também exigem cautela devido a implicações regulatórias e ambientais. Estudos como o de Santos (2016) demonstram que sistemas contínuos de fermentação podem oferecer maior controle contra contaminação, mantendo a viabilidade celular ao longo dos ciclos sucessivos.

Um avanço significativo no processo da fermentação alcoólica é o desenvolvimento de cepas de leveduras geneticamente modificadas ou selecionadas, capazes de suportar condições extremas de temperatura, pH e alta concentração de etanol. Essas leveduras, além de aumentar a viabilidade celular ao longo do processo, permitem o uso de matérias-primas de segunda geração, como resíduos lignocelulósicos, ampliando a base de insumos disponíveis (Lima, 2021). A utilização de biomassa como bagaço e palha de cana-de-açúcar, para a produção do

etanol de segunda geração, representa um importante passo rumo à sustentabilidade, ao transformar resíduos agrícolas em produtos de valor agregado.

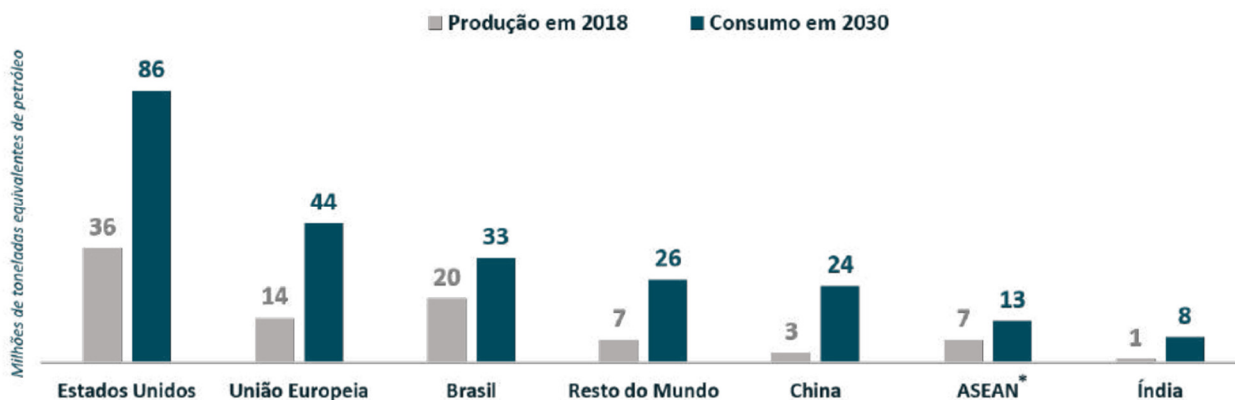
O sucesso do processo da fermentação alcoólica está diretamente relacionado à aplicação de estratégias de controle operacional e à constante inovação tecnológica, que visam otimizar a eficiência e a qualidade do produto final. Como destacado por Góes-Favoni *et al.* (2018), o conhecimento aprofundado das bases científicas que regem cada etapa do processo é essencial para superar desafios, reduzir perdas e atender à crescente demanda por biocombustíveis sustentáveis.

2.4. Indústrias sucroalcooleiras e a produção de etanol no Brasil

A instabilidade da oferta de combustíveis fósseis e a urgência de resposta às mudanças climáticas no mundo incentivaram e elevaram a busca por alternativas energéticas mais sustentáveis, em especial os biocombustíveis (Solomon *et al.*, 2007). Em 1975, visando a redução da dependência nacional em relação ao petróleo que era importado, foi lançado o Programa Nacional do Álcool (Proálcool). Aproximadamente 80% do petróleo consumido pelo Brasil nesta época era importado, o que correspondia a cerca de 50% da balança comercial. Já no início do século XXI e a partir de 2003, o setor sucroalcooleiro já era forte e competitivo, ganhando impulso pela utilização do etanol em veículos flex-fuel. Atualmente, o RenovaBio (criado em 2016) busca garantir segurança e previsibilidade ao mercado de biocombustíveis através de um mecanismo que recompensa os produtores pela redução das emissões de carbono (Créditos de Descarbonização - CBIOs).

Segundo a Agência Internacional de Energia (do inglês *International Energy Agency* - IEA), a demanda por biocombustíveis poderá aumentar significativamente e exigirá um aumento de cerca de 165% na produção global desses produtos (Figura 4).

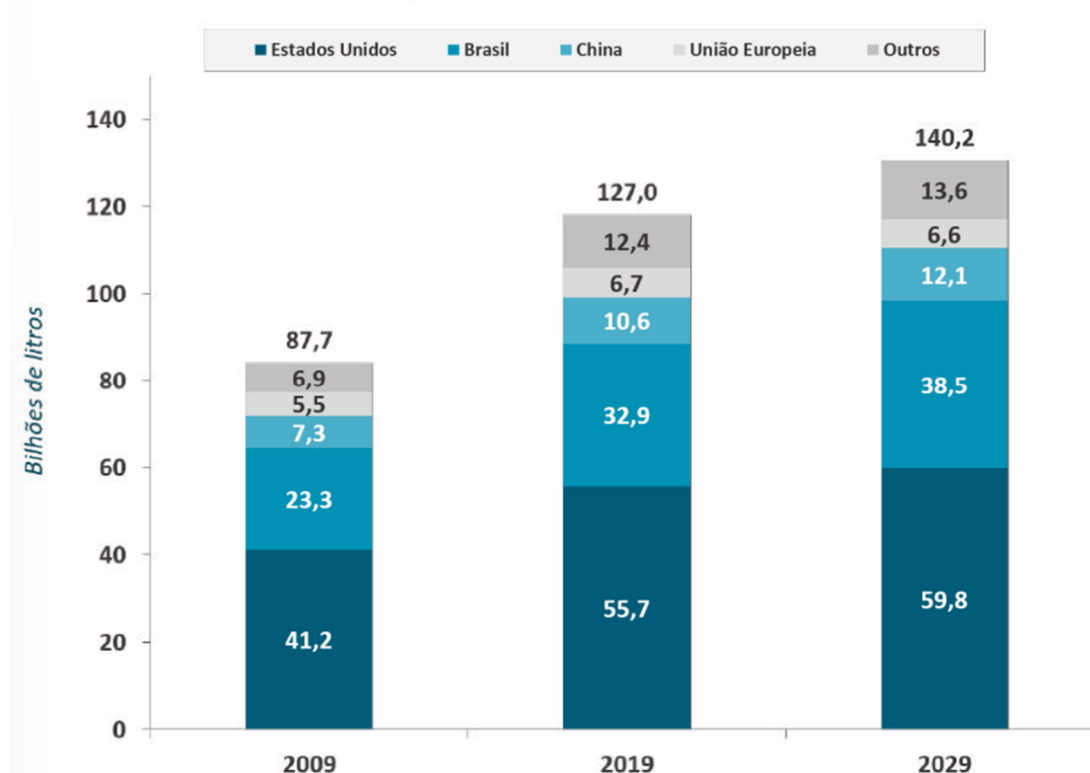
Figura 4 - Produção de biocombustíveis em 2018 em comparação ao consumo previsto para 2030.



Fonte: Neves, 2021.

Em 2019, os Estados Unidos consumiram 55,7 bilhões de litros de etanol, enquanto o Brasil atingiu 32,9 bilhões de litros. Atualmente, estes dois países são responsáveis por utilizar 70% de todo o etanol produzido globalmente e de acordo com projeções da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (OECD/FAO) esse cenário se mantém para 2029. A Figura 5 mostra a evolução no consumo mundial de etanol em algumas nações e a projeção estimada para 2029.

Figura 5 - Consumo Mundial de Etanol e projeção para 2029.



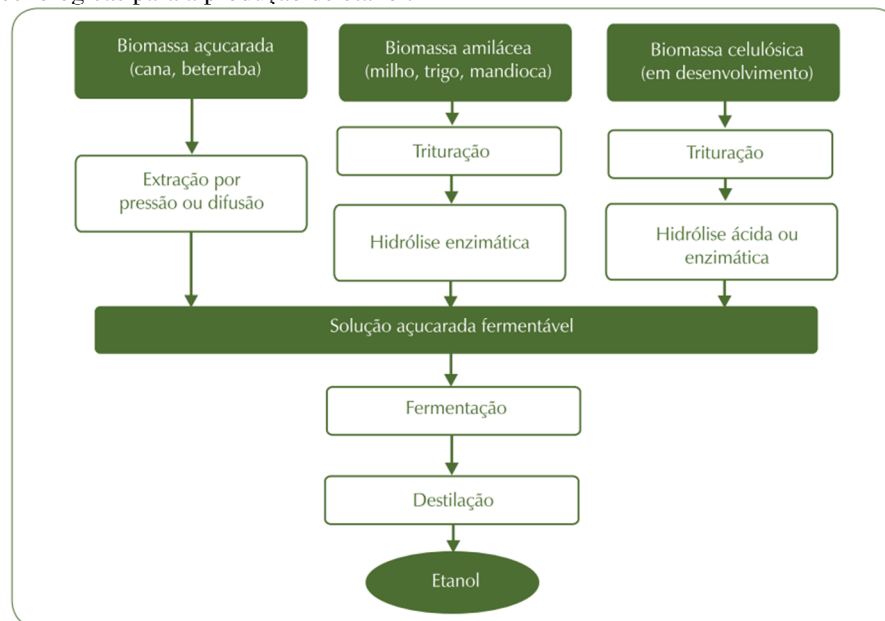
Fonte: Neves, 2021.

No Brasil, a cana-de-açúcar é a principal matéria-prima utilizada para a produção de etanol. Uma pesquisa coordenada pelo Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) afirma que o etanol provindo desta matéria-prima é o menos poluente (CNPEM, 2021) pois o uso de fertilizantes nitrogenados nas áreas de cana brasileira reduz em 19% as emissões totais do biocombustível. Entretanto, o etanol de milho vem se consolidando no Brasil como um produto valioso sob várias perspectivas. De acordo com projeções da União Nacional do Etanol de Milho (UNEM), a produção brasileira do produto deve alcançar 10 bilhões de litros de etanol produzido pelo cereal em 2030. Atualmente existem três modelos de usinas de etanol de milho operando no país, o modelo Full, que processa exclusivamente milho para a

produção do biocombustível, o modelo Flex, onde as usinas de cana-de-açúcar são adaptadas para produzir etanol de milho no período de entressafra ou indisponibilidade da cana, e por fim, o modelo Flex Full, que são usinas de cana e milho operando paralelamente (Boschiero, 2024).

O processo industrial de produção de etanol a partir de diferentes matérias-primas é mostrado na Figura 6. Para materiais que geram caldos ricos em açúcares (como a cana e a beterraba), a primeira etapa consiste na extração dos caldos (por moagem ou difusão). Já para matérias-primas de origem amilácea ou celulósica são requeridas duas etapas para a obtenção da solução contendo os açúcares fermentáveis. Essa solução rica em açúcares, independentemente da origem, segue para a fermentação. O vinho resultante do processo de fermentação é então destilado para a obtenção do etanol (Jardine *et al.*, 2009).

Figura 6 - Rotas tecnológicas para a produção de etanol.



Fonte: BNDES (2008).

A Figura 7 mostra de forma simplificada o processo de produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, no modelo de extração por pressão. Segundo a Raízen (2022), uma tonelada de cana pode chegar a produzir 80 litros de Etanol de Primeira Geração (E1G). As principais etapas do processo de produção do etanol consistem em (Raízen, 2022):

- Moagem: a cana é moída por rolos trituradores, dando origem ao caldo;
- Eliminação de impurezas: o caldo passa por tratamento químico e segue para a filtração, com a finalidade de separar as impurezas minerais e vegetais. Neste momento, o caldo

passa a ser chamado de caldo clarificado. Parte deste caldo é destinado à produção de açúcar e a outra, para produção de etanol;

- Fermentação: o caldo é destinado às dornas de fermentação, no qual é misturado ao fermento (leveduras) que metabolizam as moléculas de glicose e frutose provenientes da hidrólise da sacarose (pela enzima invertase presente nas células das leveduras), produzindo etanol e gás carbônico em solução, que contém ainda subprodutos da fermentação e as leveduras (o “vinho”);
- Destilação e Retificação: a partir do vinho de leveduras é realizada a separação do etanol de outros compostos por diferença de volatilidade, nas colunas de destilação. Obtém-se o etanol hidratado, usado como etanol combustível (grau alcoólico de cerca de 96%);
- Desidratação: ao remover a água presente no etanol hidratado, tem-se o etanol anidro;
- Armazenamento: o produto é então armazenado em tanques até serem levados por caminhões às distribuidoras.

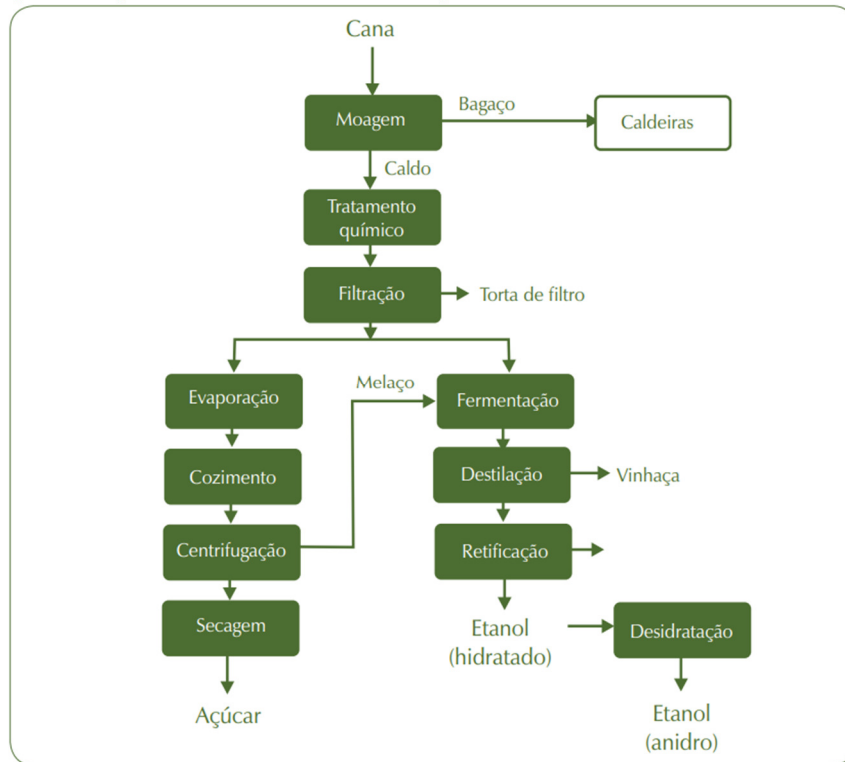
Vale ressaltar que o bagaço obtido após o processo de moagem é transferido para as caldeiras, para sua queima possibilitar a conversão da energia térmica em mecânica e posteriormente, em energia elétrica. Outrossim, após a cana ser moída, o caldo é transformado em xarope a partir da evaporação de água. Posteriormente, o xarope é aquecido e centrifugado (aqui ocorre a separação do açúcar e do melaço, onde este último pode também ser utilizado para gerar etanol). Em seguida, o açúcar passa por um processo de secagem, peneiramento e é submetido a um separador e detector de metais antes de ser embalado ou armazenado.

A integração de diferentes etapas da cadeia produtiva do etanol tem sido um fator decisivo para aumentar a eficiência e a competitividade do setor. A cogeração de energia, por exemplo, aproveita os resíduos da cana-de-açúcar para geração de eletricidade e vapor, que são utilizados internamente pelas usinas, reduzindo a dependência de fontes externas de energia e contribuindo para a redução das emissões de carbono (Dutra, 2017). Essa abordagem, integrada também permite a comercialização do excedente de energia elétrica, fortalecendo o modelo de negócio das usinas sucroalcooleiras.

Durante os últimos anos, a produção de etanol a partir da biomassa vem sendo cada vez mais estudada e recebe a denominação de Etanol de Segunda Geração (E2G) ou Etanol Celulósico. Este produto é formado a partir dos subprodutos da produção de etanol de primeira geração, como a palha e o bagaço da cana-de-açúcar (Raízen, 2023). A possibilidade de usar

os açúcares restantes na biomassa como substrato para geração de etanol permite aumentar sua produção sem aumento da área de plantio (Raízen, 2023).

Figura 7 - Fluxograma da produção de açúcar e etanol a partir da cana de açúcar.



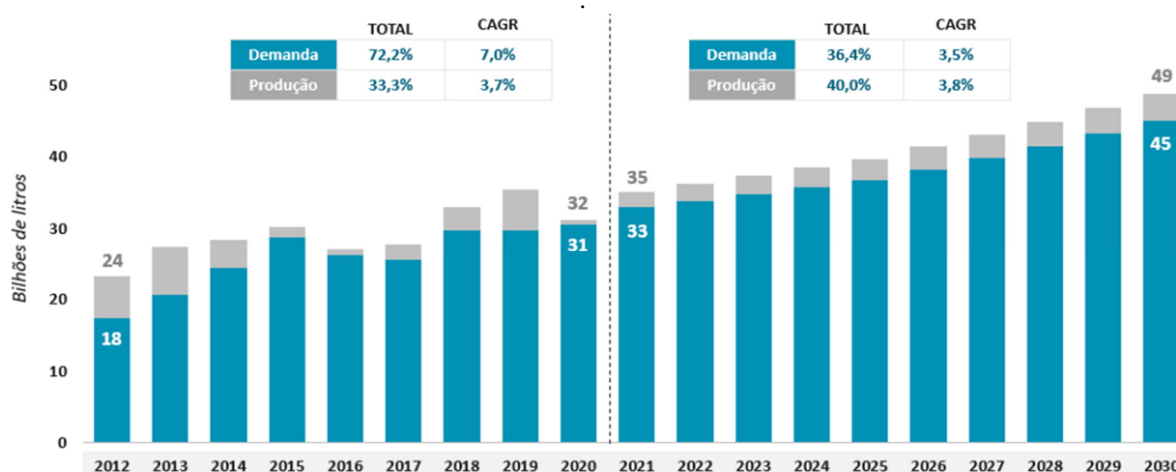
Fonte: BNDES (2008).

Segundo dados da Empresa de Pesquisa Energética (EPE, 2020), o histórico e a projeção da produção e da demanda de etanol no Brasil seguem algumas premissas: preço entre combustíveis mais favoráveis; continuidade de políticas de incentivo ao setor, como diferenciações em Imposto sobre Circulação de Mercadorias e Serviços (ICMS), Contribuições de Intervenção no Domínio Econômico (CIDE) e o Programa de Integração Social (PIS), além da Contribuição para Financiamento da Seguridade Social (COFINS); sucesso na implantação do programa RenovaBio; disponibilidade de recursos das negociações de crédito de carbono e linhas de crédito para setores com redução e otimização de custos na cadeia sucroenergética (EPE, 2019).

Analisando as projeções de etanol, de acordo com a EPE (2020), o Brasil deve aumentar a produção do biocombustível em 14 bilhões de litros até 2029. Analogamente a demanda (consumo doméstico e exportações) deve aumentar 44,5 bilhões de litros até o ano de 2029. A

Figura 8,⁴ elaborada com base em EPE (2019b) e UNICA (2021), ilustra o histórico e a projeção na produção e na demanda de etanol no Brasil, de 2012 a 2029.

Figura 8 - Produção e demanda de etanol no Brasil.



Fonte: Neves, 2021.

A expansão da produção de etanol também enfrenta desafios, especialmente em relação ao impacto ambiental e à sustentabilidade das práticas agrícolas. A monocultura de cana-de-açúcar, quando não manejada adequadamente, pode levar à degradação do solo, perda da biodiversidade e ao aumento do uso de insumos químicos. Neste sentido, práticas agrícolas sustentáveis, como o plantio direto, a rotação de culturas e o manejo integrado de pragas, são fundamentais para mitigar os impactos ambientais e garantir a longevidade do setor (Ilha *et al.*, 2008).

Do ponto de vista econômico, o etanol apresenta vantagens competitivas em relação aos combustíveis fósseis, principalmente devido à sua menor pegada de carbono e aos incentivos governamentais. Entretanto, a volatilidade dos preços internacionais de açúcar e petróleo pode impactar diretamente o setor, exigindo políticas públicas que assegurem a estabilidade do mercado interno. A adoção de metas claras para a inserção de biocombustíveis na matriz energética, como as estabelecidas pelo programa RenovaBio, tem sido uma ferramenta importante para consolidar a posição do etanol como um pilar estratégico da

⁴ CAGR: Taxa de Crescimento Anual composta. Quantifica o crescimento médio anual de um investimento, ativo financeiro ou qualquer dado que experimente variações ao longo do tempo. Obtido através de uma equação matemática, quando este valor é positivo, tem-se um crescimento, analogamente, quando o CAGR é negativo, tem-se um decréscimo na taxa de crescimento anual

transição energética no Brasil (Sonego, 2016). Além disso, iniciativas de cooperação internacional e acordos comerciais voltados para a exportação de etanol brasileiro reforçam sua posição no mercado global como um combustível limpo e renovável (Góes-Favoni *et al.*, 2018).

Portanto, o processo de fermentação alcoólica para a produção de etanol não é apenas um avanço técnico, mas também uma ferramenta de transformação econômica, social e ambiental. À medida que a demanda global por energia renovável continua a crescer, o etanol se consolida como um elemento-chave na transição para um futuro mais sustentável. Combinando inovação científica, práticas sustentáveis e políticas públicas eficazes, o setor pode continuar evoluindo e contribuir significativamente para os objetivos globais de sustentabilidade e desenvolvimento.

2.5. Leveduras e seus principais parâmetros de análise

Responsáveis pelo processo da fermentação, as leveduras são organismos vivos que possuem suas próprias características. Estes microrganismos são fundamentais no processo de fermentação alcoólica, desempenhando um papel central na conversão de açúcares fermentáveis em etanol e dióxido de carbono. Dentre as espécies utilizadas, destaca-se a *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente reconhecida por sua eficiência em condições industriais (Ceccato-Antonini, 2021). Esses organismos são metabolicamente adaptados para sobreviver em ambientes anaeróbicos, tornando-os indispensáveis para a produção de biocombustíveis, bebidas e alimentos fermentados.

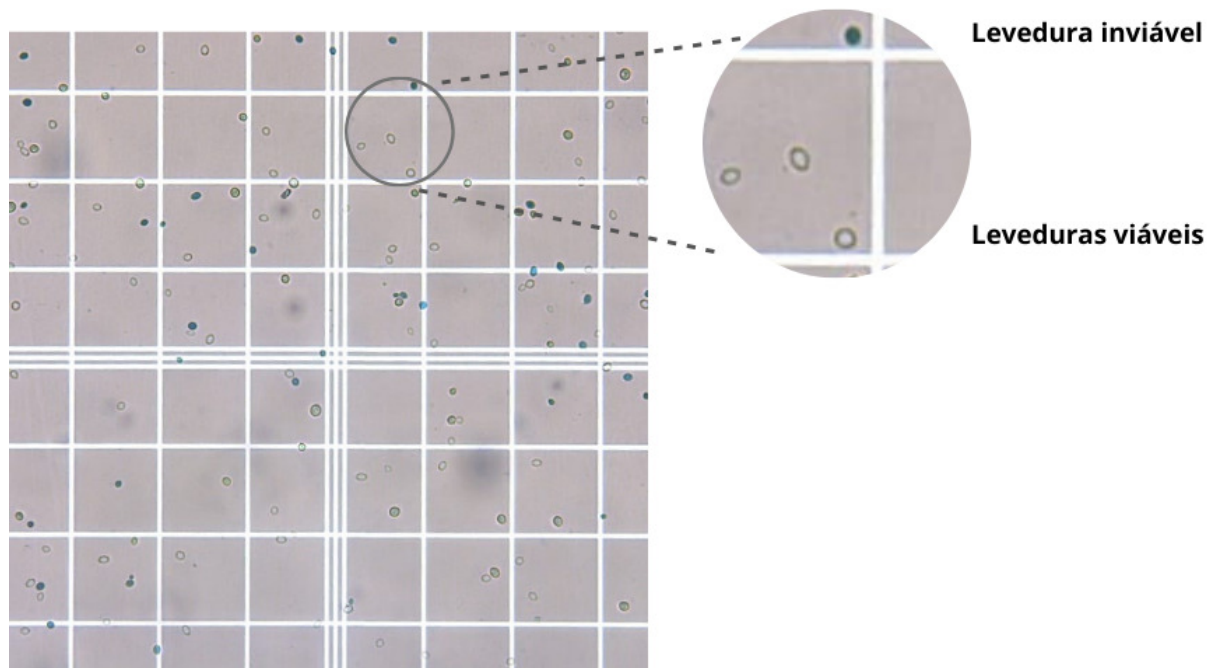
A escolha de cepas adequadas é crucial para maximizar o rendimento do processo fermentativo. A *Saccharomyces cerevisiae* é frequentemente preferida devido à sua capacidade de operar em condições extremas e manter alta eficiência na conversão de açúcares em etanol. Além disso, a reciclagem de células é uma prática comum em métodos como o Melle-Boinot, que permite a reutilização das leveduras após a fermentação, reduzindo custos operacionais e aumentando a viabilidade econômica do processo (Santos, 2016).

Um dos parâmetros fundamentais na análise do potencial de leveduras para produção de etanol, é a viabilidade celular. Esta medida determina a proporção de células vivas em uma cultura celular, ou seja, determina a porcentagem de células capazes de realizar suas atividades metabólicas. Este parâmetro é continuamente acompanhado durante a safra inteira, nas usinas sucroalcooleiras, visto que uma queda considerável na viabilidade celular significa menor produção de etanol. O cálculo da viabilidade depende do método usado para a determinação da proporção de células viáveis e não viáveis (mortas/sem atividade metabólica), sendo o mais

comumente nas usinas, o método por coloração com azul de metileno em câmara de Neubauer, como descrito por Bortoli *et al.* (2013):

Da amostra do meio, coleta-se uma alíquota e a esta adiciona-se a ponta de uma espátula de papaína, afim de desfazer possíveis aglomerados de leveduras e deixa-se um repouso por 5 minutos. À solução anterior, adiciona-se azul de metileno na proporção de 1:1, homogeneiza-se e incuba-se a amostra por 5 minutos em temperatura ambiente. Com a câmara de Neubauer limpa, sobrepõe-se a ela uma lamínula, cobrindo a superfície espelhada, e então, com o auxílio de uma micropipeta, transfere-se a solução de amostra com corante entre a câmara de Neubauer e a lamínula. Assim, a câmara já pode ser analisada via microscópio, com a objetiva de 40x. As células viáveis são aquelas que permanecem incolores, enquanto que as células não viáveis, ou seja, sem ação metabólica, são aquelas que ficam azuis. A Figura 9 exemplifica a análise de viabilidade pelo método descrito.

Figura 9 - Imagem real de microscopia de viabilidade celular de leveduras coradas com azul de metileno, sobre câmara de Neubauer.



Fonte: Acervo da autora.

Sendo assim, o percentual da viabilidade celular é dado pela Equação 1:

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células vivas}}{\text{N}^\circ \text{ de células totais}} \times 100 \quad (1)$$

A viabilidade celular e o brotamento ainda podem ser analisados por coloração diferencial de células com solução de Eritrosina B (corante de cor rosa vibrante), um corante não tóxico para as leveduras pois atinge e penetra a parede celular apenas das células não viáveis (Oliveira, 1996), deixando as leveduras viáveis intactas (Figura 10). Diferentemente do que ocorre com a utilização do corante azul de metileno que penetra em células viáveis e não viáveis, sendo que as viáveis conseguem quebrar a coloração pois possuem enzimas ativas (Escarpment, 2023).

A técnica de coloração com eritrosina inicialmente se dá pela preparação do corante, da solução tampão de fosfato e da solução final de trabalho da seguinte forma:

- Solução estoque de eritrosina:

Pesar 0,1 g de eritrosina e dissolve em 10,0 mL de água destilada esterelizada. Conservar em frasco âmbar sob refrigeração (validade de 8 meses sob essas condições).

- Solução tampão de fosfato:

Pesar 17,90 g de Na_2HPO_4 , dissolver em 250,0 mL de água destilada esterelizada (solução A). Pesar 6,89 g de NaH_2PO_4 e dissolver em 250,0 mL de água destilada esterilizada (solução B). Misturar as soluções A e B e transferir para um frasco âmbar e manter sob refrigeração (validade de 8 meses sob estas condições).

- Solução de trabalho:

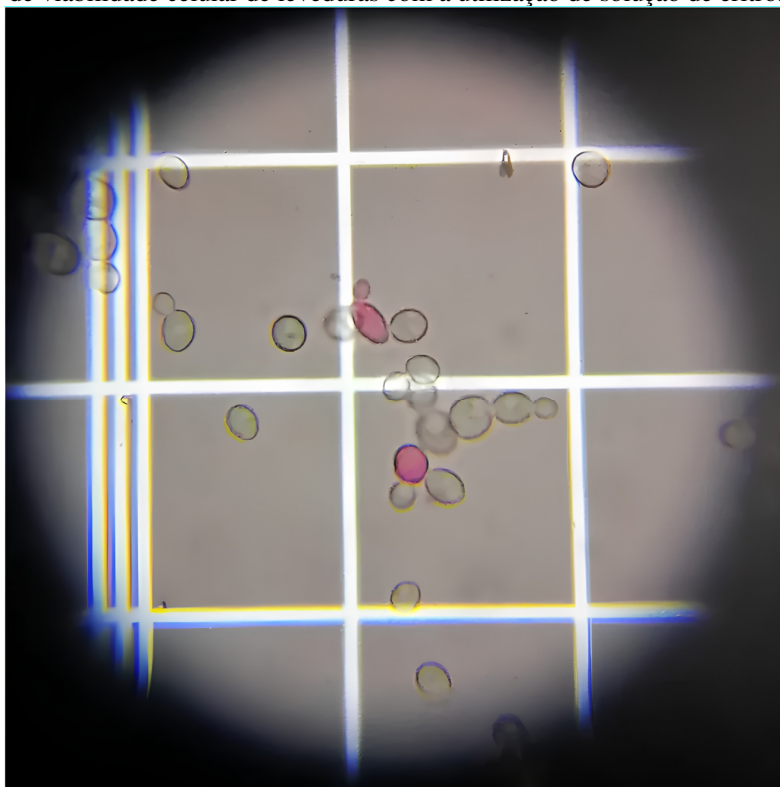
Misturar 0,1 mL da solução de eritrosina para cada 5,0 mL do tampão fosfato.

Após a coleta da amostra do vinho bruto e/ou creme de levedura, proceder da seguinte forma:

- Homogeneiza-se a amostra, dela, coleta-se uma alíquota da de 3 - 5 mL e transfere-se para um tubo de ensaio. A este, adiciona-se a ponta de uma espátula de papaína e homogeneizar em um agitador para tubos, após a homogeneização, deixa-se em repouso durante 5 minutos. Após o tempo de reação com a papaína, homogeneiza-se a amostra e dilui-se com água destilada (a fim de ter um número de células adequado para maior precisão), transfere-se 1 mL da amostra diluída para outro tubo de ensaio e a este, adiciona-se 1 mL da solução de trabalho de eritrosina, homogeneiza-se em agitador para tubos e com a câmara de Neubauer preparada, cobre-se o espelho com uma lamínula, transfere-se um volume da solução corada até cobrir a área da câmara de Neubauer e com a objetiva de 40X, analisa-se os campos em microscópio.

O procedimento de contagem para determinação da % de células viáveis se dá pela utilização da equação 1.

Figura 10 - análise de viabilidade celular de leveduras com a utilização de solução de eritrosina B.



Fonte: Escarpament, 2023.

As leveduras podem se reproduzir sexuada ou assexuadamente, por gemulação (também chamado de brotamento), esporulação ou por fissão. O método assexuado por brotamento ocorre quando uma célula dá origem a uma outra, que se torna uma célula independente após se desprender e que carrega o mesmo material genético da célula anterior (Jacob *et al.*, 2023). Segundo Silva (2009), as células de *S. cerevisiae* são capazes de se dividir a cada 90 minutos em condições nutricionais adequadas.

De forma experimental, a Equação 2 é permite determinar o percentual de células que estão se multiplicando no meio reacional, enquanto que a viabilidade de brotamento pode ser obtida pela Equação 3, que relaciona brotos vivos e brotos mortos. Quanto maior a viabilidade de brotamento, maior o número de brotos sendo formados em comparação com o número de brotos que estão morrendo (Jacob *et al.*, 2023).

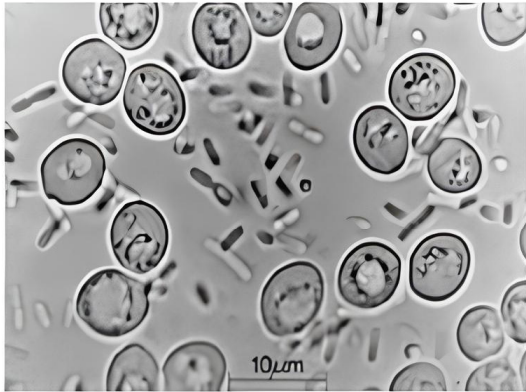
$$\% \text{ Brotamento} = \frac{N^{\circ} \text{ de brotamentos vivos}}{N^{\circ} \text{ de células vivas}} \times 100 \quad (2)$$

$$\% \text{ Viabilidade de brotamento} = \frac{N^{\circ} \text{ brotamentos vivos}}{N^{\circ} \text{ total de brotamentos}} \times 100 \quad (3)$$

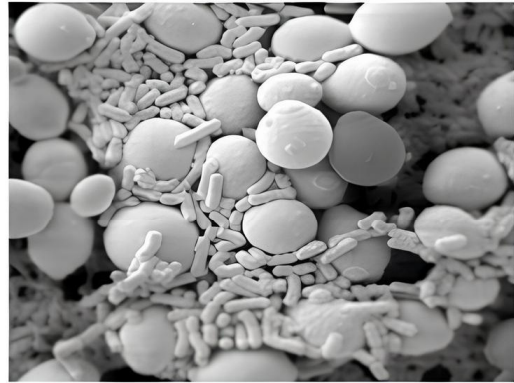
O tipo de reprodução por esporos sexuados, constitui-se de uma das fases do ciclo sexual da levedura, o qual permite que a célula passe por recombinações genéticas, mutações, hibridação e seleção. Por fim, o processo reprodutivo por fissão acontece pelo alongamento ou aumento de tamanho da levedura, que se divide em duas células filhas (Só biologia, 2008).

A floculação é um mecanismo de agregação de células e pode ser induzida por vários fatores como a interação entre, leveduras e bactérias floculantes, como bactérias do gênero *Limosilactobacillus fermentum* (Souza *et al.*, 2003). A floculação é prejudicial para o processo fermentativo, levando a um comprometimento do desempenho industrial. Ao cessar a fermentação ou devido à interrupção da agitação mecânica no fermentador (quando presente), os flocos formados se sedimentam rapidamente, resultando em duas fases na suspensão, uma concentrada (rica em flocos) e outra mais dispersa, na qual os flocos flutuam, impulsionados por bolhas de gases (Souza *et al.*, 2003). Essa formação de flocos compromete a conversão de açúcares em etanol e CO₂ devido à redução da superfície de contato entre células e meio reacional. A interação para formação de flocos pode ser do tipo parede-parede das leveduras e leveduras-bactérias (Figura 10), devido à contaminação bacteriana durante o processo fermentativo. Nas usinas onde ocorre o reaproveitamento de células, as operações de recuperação ficam prejudicadas pela presença dessas estruturas. Os flocos podem ser analisados sob o número de células, o tamanho e a estabilidade quanto ao rompimento das ligações.

Figura 11 - Leveduras e bactérias do gênero *Lactobacillus* dispersos (a) e floculados (b) em fermentação etanólica.



a



b

Fonte: Ventura, 2007

As leveduras são elementos-chave no processo de fermentação alcoólica e em diversas outras indústrias. O avanço da biotecnologia tem ampliado suas aplicações, permitindo o desenvolvimento de cepas mais eficientes e adaptadas a diferentes demandas industriais. Esses avanços consolidam as leveduras como ferramentas essenciais para a sustentabilidade e inovação em diversos setores.

2.6. Contaminação bacteriana em fermentações alcoólicas

A contaminação em fermentações alcoólicas representa um desafio significativo para a eficiência e a viabilidade econômica do processo na produção de etanol. Durante a fermentação, além das leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae*, que são os principais agentes desejados, diversos microrganismos contaminantes podem se proliferar. Entre eles, bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Acetobacter* são frequentemente encontradas e interferem negativamente no rendimento da fermentação ao competir com as leveduras pelos substratos disponíveis. A bactéria do gênero *Lactobacillus* é um destaque de organismo predominante no processo como contaminante, devido à sua alta adaptabilidade e capacidade de sobrevivência em ambientes com elevados teores de etanol, baixo pH e escassez de oxigênio, típico cenário de fermentações alcoólicas (Beckner *et al.*, 2011). A contaminação por microrganismos (incluindo leveduras nativas e bactérias) pode alcançar concentrações de $10^8 - 10^9$ células de bactérias/mL (Costa, 2017).

A riqueza nutricional do mosto e o fato do processo fermentativo não ocorrer de forma asséptica, são fatores que colaboram para que a contaminação bacteriana nas fermentações alcoólicas (Ceccato-Antonini, 2021).

As bactérias prejudicam a eficiência da fermentação de várias formas diferentes, entre elas, a diminuição da produção de etanol, a floculação e também a perda da viabilidade celular de levedura (Costa, 2017). Essas bactérias, especialmente as produtoras de ácido lático e acético, não apenas consomem os açúcares destinados às leveduras, mas também produzem compostos inibitórios que afetam a viabilidade das células de levedura. Além disso, esses ácidos reduzem o pH do meio fermentativo, criando condições desfavoráveis para o crescimento das leveduras e exigindo intervenções adicionais no controle de variáveis operacionais. Como resultado, a eficiência da conversão de açúcares em etanol é significativamente comprometida, levando a perdas econômicas e aumento nos custos de produção (Santos, 2016).

Segundo Milessi (2017), os ácidos acético e lático são ácidos fracos, com pKa de 4,76 e 3,86 respectivamente, e em pHs baixos se apresentam em sua forma não dissociada, que difunde pela membrana plasmática e chega até o citosol. É então no citosol onde ocorre a dissociação em prótons e ânions acetato e lactato (isso pois o pH intracelular é neutro), o que diminui o pH intracelular e prejudica o mecanismo de síntese de DNA, RNA e a atividade das enzimas intracelulares, levando a um consumo elevado de ATP para bombear os prótons para fora das células (atividade da ATPase).

A contaminação pode ter origem de distintas fontes, desde a lavoura com a matéria-prima, até as esteiras, moendas, tubulações, a água utilizada nos processos e outros equipamentos. Vale ressaltar que, mesmo que o meio seja propício, nem todos os microrganismos são capazes de crescer no caldo de cana, sendo dependente das condições de cada etapa do processo de fermentação (Ceccato-Antonini, 2021).

As infecções por bactérias podem chegar a 10^8 - 10^9 células/mL e podem ser caracterizadas pelo acúmulo de substâncias como ácido lático e ácido acético (Ceccato-Antonini, 2021). Já é sabido que, em fermentações industriais, a contaminação bacteriana acima de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL resulta na queda do rendimento fermentativo, dificultando operações do processo de produção, como a centrifugação das células de leveduras e a floculação (Cherubin, 2003; Amorim *et al.*, 2009; Basso *et al.*, 2014) Amorim *et al.* (2011) estimam que uma contaminação de 10^8 UFC/mL é capaz de diminuir o rendimento de 10.000 a 30.000 litros de etanol por dia em uma destilaria com capacidade produtiva de 1.000.000 litros por dia.

Além da contaminação por bactérias, a contaminação por leveduras nativas⁵ também afeta a produtividade do processo (Beckner *et al.*, 2011). As espécies *Dekkera bruxellensis*, *Candida tropicalis*, *Pichia galeiformis* exemplificam os microrganismos que podem estar envolvidos em episódios onde a contaminação é crítica (Basílio *et al.*, 2008). A levedura da espécie *Dekkera bruxellensis* é a principal contaminante em destilarias que utilizam caldo bruto de cana-de-açúcar como matéria prima na produção de etanol.

A origem da contaminação bacteriana em fermentações alcoólicas pode ser atribuída a diversos fatores. O ambiente rico em nutrientes do mosto, a temperatura em torno de 30 a 35°C e a presença de água criam condições ideais para o crescimento microbiano. Equipamentos mal higienizados, o uso de matérias-primas contaminadas e falhas no controle do pH são fatores que contribuem para a proliferação desses contaminantes. Por esse motivo, o controle rigoroso das condições operacionais é essencial para minimizar os impactos negativos da contaminação (Góes-Favoni *et al.*, 2018)

Na prática industrial, diferentes estratégias têm sido adotadas para mitigar os efeitos da contaminação bacteriana. O uso de antimicrobianos, como antibióticos, é uma abordagem comum, embora apresente limitações devido ao aparecimento de bactérias mais resistentes e à possibilidade de resíduos nos produtos finais. Alternativamente, o desenvolvimento de leveduras geneticamente modificadas ou adaptadas para tolerar condições adversas tem se mostrado uma solução promissora, permitindo maior resiliência ao estresse causado pela presença de compostos inibitórios produzidos pelas bactérias contaminantes (Ceccato-Antonini, 2021).

A contaminação em fermentações alcoólicas é um problema complexo e multifatorial que requer abordagens integradas para sua mitigação. O controle rigoroso das condições operacionais, o desenvolvimento de tecnologias inovadoras e o uso de microrganismos mais resistentes são estratégias para superar esse desafio e garantir a sustentabilidade e a eficiência do processo produtivo. Essas medidas não apenas contribuem para a melhoria do rendimento do etanol, mas também fortalecem a competitividade da indústria de biocombustíveis no cenário global.

⁵ Chamadas de leveduras nativas, leveduras selvagens ou leveduras rugosas, são aquelas que, advindas da cana-de-açúcar ou da água de lavagem de cana, invadem o processo fermentativo.

2.7. Métodos de acompanhamento da presença de bactérias em fermentações alcoólicas

O monitoramento da presença de bactérias em fermentações alcoólicas é uma etapa crucial para garantir a eficiência do processo e minimizar perdas produtivas. As bactérias contaminantes, como as dos gêneros *Lactobacillus* e *Acetobacter*, competem diretamente com as leveduras por substrato, além de produzirem compostos inibitórios, como ácidos orgânicos, que comprometem a viabilidade das leveduras e reduzem o rendimento do etanol (Ceccato-Antonini, 2021). Nesse contexto, métodos precisos e eficazes de acompanhamento são indispensáveis para a detecção precoce de contaminantes e para a implementação de medidas corretivas.

Um método amplamente utilizado nos laboratórios de microbiologia das usinas sucroalcooleiras é a contagem direta ao microscópio feita por coloração de bastonetes. A metodologia Fermentec (2023) é um exemplo deste tipo de técnica e segue o seguinte procedimento:

- Inicialmente é imprescindível a disponibilidade de todos os reagentes utilizados para análise. Sendo assim, o corante que será utilizado para corar os bastonetes deve ser preparado antecipadamente.
 - Preparação do corante Cristal Violeta:
Solução A: Pesar 2 g de cristal violeta e acrescentar 20 mL de álcool 95%;
Solução B: Pesar 0,8 g de oxalato de amônio e dissolver em 80 mL de água destilada esterilizada.
Misturar as duas soluções e armazenar em frasco escuro e limpo.
- De posse da amostra a ser analisada, adiciona-se uma ponta de espátula de papaína (a papaína atua desmembrando possíveis aglomerados de bactérias) e aguarda-se alguns instantes, em seguida, uma alíquota de 1 mL é transferida para um eppendorf e a este adiciona-se 1 mL do corante cristal violeta (proporção 1:1), homogeneiza-se e mantém-se a suspensão sob repouso por 5 minutos. Após o tempo de reação, 3 µL da suspensão é transferida para uma lâmina limpa e a esta sobrepõe-se uma lamínula de 22x22 mm. Sobre a lamínula é adicionada 1 gota de óleo de imersão. Com o microscópio já ligado, ajusta-se a objetiva para 100 vezes, a lâmina é apoiada sobre a base e a aproximação da lente é feita com o macrométrico até que se observa a mudança da coloração do óleo de imersão e então a contagem pode ser iniciada.

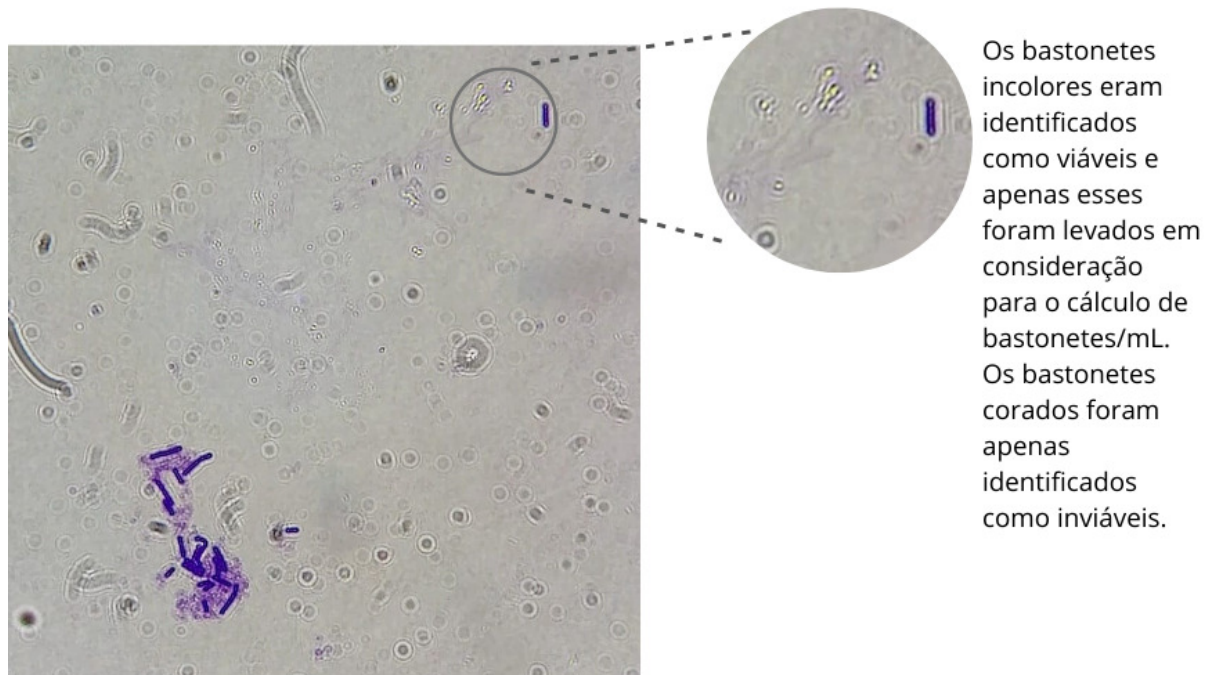
A contagem é feita levando em conta apenas o número de bastonetes vivos observados nos campos que foram analisados e ao final da contagem, utiliza-se da equação 4 para definir o número de bastonetes/mL presentes na amostra.

$$\frac{bast}{mL} = \frac{n^{\circ} \text{ bastonetes vivos}}{n^{\circ} \text{ campos analisados}} \cdot FM \cdot \frac{l}{\text{volume da amostra}} \cdot \text{diluição final} \quad (4)$$

Onde FM é o fator do microscópio utilizado.

A Figura 11 é uma imagem real de microscopia de análise de contaminação realizada pelo método Fermentec.

Figura 12 - Imagem real de microscopia de análise de contaminação.



Fonte: acervo da autora.

Pensando nos impactos ambientais (como o aumento da resistência bacteriana a antibióticos (Ceccato-Antonini, 2021)), produtivos e consequentemente econômicos, que a contaminação bacteriana tem no processo de fermentação alcoólica, métodos microbiológicos podem ser desenvolvidos ou aprimorados, a fim de permitirem resultados cada vez mais rápidos e sensíveis no acompanhamento da contaminação bacteriana neste processo, implicando em uma tomada de ação cada vez mais sustentável, com menos perda produtiva e mais econômica.

Além das técnicas laboratoriais, a automação e o uso de sistemas de controle em tempo real têm sido testados para otimizar o monitoramento da presença bacteriana. Sensores instalados diretamente nos tanques de fermentação podem medir parâmetros como pH, temperatura e concentrações de ácidos orgânicos, permitindo a detecção indireta de atividades bacterianas (Ventura, 2007). Esses sistemas facilitam a identificação precoce de contaminações e a adoção de medidas corretivas antes que os problemas se tornem críticos.

Nesse contexto, destacam-se as técnicas espectrofotométricas para identificação de moléculas e no controle de processos químicos. Baseadas na propriedade de absorção de energia por moléculas em regiões específicas do espectro eletromagnético, quando a radiação incide sobre uma molécula, esta pode sofrer transição de estado energético dos tipos eletrônico, rotacional, translacional ou vibracional, onde esta última ocorre no espectro do infravermelho próximo (Salla, 2008). Um exemplo dessa técnica é a espectroscopia vibracional NIR (*Near Infra-Red*, ou, Espectroscopia de Infravermelho Próximo, em português) que utiliza $2,65 \times 10^{19}$ a $7,96 \times 10^{20}$ J, radiação eletromagnética correspondente a 780 - 2500 nm de comprimento de onda (Pasquini, 2003), tendo como principal vantagem a possibilidade de quantificar multicomponentes em matrizes complexas sem ser destrutiva, de forma rápida e simultânea, sem a necessidade de preparo de amostra, uma vez que esta pode ser analisada sem retirada de amostras ou diluição (Pasquini, 2003; Marcondes *et al.*, 2017). A radiação NIR, ao ser absorvida pelas moléculas orgânicas em frequências específicas, de acordo com as características de suas estruturas, pode gerar como resposta, espectros, os quais, ao serem analisados por técnicas quimiométricas, podem gerar informações de extrema importância quanto à composição da amostra (Pasquini, 2003).

A tecnologia de espectroscopia de infravermelho próximo já é utilizada nas destilarias de álcool norte-americanas (Ventura, 2007) para monitorar a produção de ácido láctico produzido por bactérias do gênero *Lactobacillus*. Devido ao metabolismo dessas bactérias, sabe-se que, a concentração de ácidos orgânicos no processo (como o ácido láctico) é diretamente proporcional à contaminação bacteriana. O resultado da incidência do laser sobre a amostra de forma contínua, são gráficos de concentração do analito por tempo de análise (tempo de fermentação). Esta tecnologia possui vantagens como o monitoramento online da contaminação das dornas de fermentação, que possibilita a tomada de ações corretivas antes de ter o processo comprometido por este parâmetro e a capacidade de aplicação em praticamente todas as amostras do setor sucroalcooleiro, como: açúcares redutores totais (ART), Brix, rotação da luz polarizada (POL), umidade, fibra, impurezas, dextrana, amido, sulfito, teor alcoólico, teor de fermento, glicerol e acidez (FERRAZ, 2015).

O monitoramento dos dados relacionados à contaminação no processo fermentativo e o rastreamento do processo como um todo pode ser realizada através de análise de ácido láctico com a utilização de um lactímetro (Raízen, 2020). O funcionamento do lactímetro ocorre usando uma tira de codificação. Uma tira de teste não utilizada é inserida no instrumento e a área de aplicação da tira-teste é iluminada por um LED (diodo emissor de luz). Antes da medição real ser realizada, o comportamento de reflexão da tira de teste é determinado por meio da luz refletida (da área de aplicação). A amostra é então aplicada à área de aplicação e a tampa da câmara de medição é fechada. O componente a ser determinado na amostra aplicada sofre uma reação enzimática e altera a cor do corante. A intensidade da coloração formada aumenta com a concentração da substância a ser determinada. Após um certo tempo (que depende da marca e modelo do equipamento utilizado) a intensidade da cor é medida retroiluminando a área de aplicação com o LED. A intensidade da luz refletida é medida com um detector (fotometria de reflectância). O valor medido é determinado a partir da intensidade do sinal da luz refletida, levando também em consideração o valor alvo previamente medido e a leitura da informação específica do lote (faixa de codificação). Por fim, o resultado é exibido na tela e simultaneamente salvo na memória do aparelho. A utilização do lactímetro permite a obtenção da concentração de ácido láctico na amostra em mmol/L e pode ser convertida em partes por milhão (ppm) pela equação 5:

$$\text{Ácido láctico (ppm)} = \text{ácido láctico medido no lactímetro (mmol/L)} \times 90 \text{ g/mol} \quad (5)$$

Maiorella *et al.* (1984b) observaram que a concentração inibitória de ácido láctico para a *S. cerevisiae* varia entre 10 – 40 g/L.

A Figura 13 ilustra a técnica para análise de lactato em amostras:

Figura 13 - Procedimento de análise da concentração de lactato pela utilização do equipamento lactímetro.



Fonte: acervo da autora.

Vale ressaltar que o aparelho lactímetro possui precisão mediana, visto que o equipamento não foi desenvolvido com a finalidade de realizar a análise da concentração de ácido láctico em amostras do processo de produção de etanol e sim de análise concentrações de lactato no sangue humano.

Sabe-se que o lactato possui dois isômeros ópticos, o D-lactato e o L-lactato, onde ambos têm a capacidade de desviar o plano da luz polarizada (em direções opostas). Em todos os vertebrados, incluindo humanos, o isômero L-lactato é de longe o mais abundante e fisiologicamente significativo, e essa é a forma que é especialmente medida por sensores em analisadores de sangue humano (Higgins, 2011). Sendo assim, quando utiliza-se o aparelho a fim de se obter a concentração de ácido láctico em uma amostra do processo de produção de etanol, deve-se ter consciência de que o equipamento é capaz de detectar apenas o isômero L-lactato. Assim, caso o isômero D-lactato estiver sendo produzido por bactérias contaminantes, este não será contabilizado na análise, levando a uma possível subestimativa da ocorrência de contaminação.

Devido à sua finalidade principal ser a análise de componentes no sangue, o aparelho lactímetro tem capacidade de medir, além do lactato, triglicerídeos e colesterol. Entretanto, o mesmo não possui modo de operação para realizar análise de ácido acético. Dessa forma, em cenários onde o processo esteja contaminado com bactérias produtoras deste ácido orgânico, o mesmo não será identificado, levando novamente a uma subestimativa dos resultados de contaminação.

O setor do controle de qualidade nas usinas sucroalcooleiras, durante a safra, ou seja, durante os meses de produção, segue uma frequência analítica que especifica a periodicidade de cada análise a ser realizada. A contagem da contaminação bacteriana geralmente é realizada uma vez por turno durante todos os dias da safra em dornas variadas (Raízen, 2024). De forma a avaliar a viabilidade econômica e a sustentabilidade dos métodos apresentados, a Tabela 3 apresenta as características dos mesmos em termos de impacto ambiental e custos. O custo inicial de cada um dos métodos foi levantado analisando diferentes marcas dos produtos e obtendo-se uma faixa de variação, exceto para o equipamento NIR-Online, onde adotou-se como referência o custo do equipamento cotado em 2022 pela empresa BUCHI. O custo estimado para 100 análises foi feito levando em consideração os insumos para a realização das análises. O custo estimado para 100 análises do método de contagem direta ao microscópio foi fornecido por uma analista da empresa Fermentec Soluções Industriais Ltda. (comunicação pessoal).

Tabela 3 - Análise comparativa de diferentes aspectos dos métodos de acompanhamento da presença de bactérias em fermentações alcoólicas.

Método	Descrição	Sustentabilidade do método	Estimativa de custo inicial	Custo estimado para 100 análises
Contagem direta ao microscópio	Técnica tradicional que envolve a coloração das bactérias com cristal violeta e posterior contagem ao microscópio. Requer materiais como corantes, lâminas, lamínulas e um microscópio de qualidade.	Se o corante for despejado diretamente em sistemas de esgoto ou em águas superficiais sem tratamento, pode contaminar ecossistemas aquáticos.	<ol style="list-style-type: none"> Média de custo de um microscópio óptico: R\$ 5.000,00 - 30.000,00 (a depender das especificações e da marca); Insumos: R\$ 200,00. 	R\$ 900,00
NIR-Online	Utiliza espectroscopia de Infravermelho Próximo (NIR) para monitorar em tempo real características do processo fermentativo. Requer investimento no equipamento e software de análise.	A utilização do equipamento não gera nenhum resíduo químico ou tem qualquer efeito poluente.	<ol style="list-style-type: none"> Custo do equipamento: Em 2022, a cotação do equipamento na empresa BUCHI era de R\$ 600.000,00. 	Alto investimento inicial, porém o custo por análise é reduzido após a aquisição do equipamento.
Lactímetro	Método simples que utiliza tiras reagentes para detectar a presença de ácido láctico, indicando contaminação bacteriana. Requer investimento no equipamento e nas tiras testes.	As tiras testes geralmente contêm plásticos e pequenas quantidades de reagentes químicos, sendo difíceis de reciclar e, se descartadas inadequadamente, contribuem para o acúmulo de lixo plástico e resíduos químicos no meio ambiente.	<ol style="list-style-type: none"> Custo do equipamento: R\$ 1.000,00 - 2.500,00 (a depender das especificações e da marca); Custo de 25 tiras testes (uma caixa) tipo LAC para análise de lactato: R\$ 400,00 - 500,00. 	Após a compra do aparelho, o custo variável será apenas o custo das tiras testes, que para 100 análises ficaria entre: R\$ 1.600,00 - 2.000,00.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em suma, os métodos de acompanhamento da presença de bactérias em fermentações alcoólicas são de extrema importância e o método ideal deve permitir maior precisão e rapidez na detecção de contaminantes. Estes métodos contribuem para a otimização do processo fermentativo, reduzindo perdas produtivas e econômicas, fortalecendo a sustentabilidade do setor sucroalcooleiro. O investimento contínuo em tecnologias de monitoramento é essencial para garantir a competitividade da indústria de biocombustíveis e atender às demandas crescentes por etanol sustentável.

2.8. Tendências futuras no acompanhamento da contaminação bacteriana em fermentações alcoólicas

As tendências futuras no acompanhamento da contaminação bacteriana em fermentações alcoólicas estão diretamente relacionadas ao avanço tecnológico e à crescente necessidade de aumentar a eficiência e a sustentabilidade do processo fermentativo. O monitoramento em tempo real e o desenvolvimento de sistemas integrados são algumas das inovações que podem transformar o controle microbiológico em ambientes industriais. Essas ferramentas têm como objetivo não apenas identificar contaminantes com maior precisão, mas também prever cenários adversos para ajudar a propor soluções imediatas (Ventura, 2007).

A espectroscopia de infravermelho próximo já é utilizada no Brasil, nos Laboratórios de Pagamento de Cana por Teor de Sacarose (LPCTS). A matéria-prima passa por uma esteira, onde o laser do NIR inside, medindo o teor de sacarose presente na amostra e o pagamento ao fornecedor é feito levando em consideração a quantidade de sacarose presente na cana-de-açúcar (Raízen, 2019). Porém, seu uso no monitoramento das fermentações ainda está em fase de avaliação técnico-econômica. Já nas indústrias de produção de etanol norte-americanas, a tecnologia NIR já é utilizada para o acompanhamento em tempo real de substâncias que são diretamente relacionadas à atividade bacteriana (como os ácidos orgânicos), otimizando a tomada de ação perante uma concentração considerada alarmante. Essa tomada de decisão precoce garante a viabilidade celular das leveduras e conseqüentemente o rendimento fermentativo, que implica em menos paradas para assepsia, menos gastos com antibióticos e menores perdas econômicas, uma vez que, segundo Ventura (2007), a perda de álcool calculada com base em uma produção de 151.000 m³ /ano, contaminada com 10⁹ UFC/mL pode chegar a 3.180.000 litros de etanol. A capacidade desta tecnologia em analisar metabólitos bacterianos e fornecer informações detalhadas sobre a atividade microbiana oferece uma abordagem abrangente para o controle da fermentação.

A utilização de métodos práticos e econômicos como o lactímetro, permite rastrear nas etapas do processo de produção de etanol o local de maior concentração de ácido láctico, possibilitando a identificação de possíveis pontos de contaminação. Este método já é utilizado em algumas unidades sucroalcooleiras, como por exemplo na Raízen Bioenergia, que possui um protocolo corporativo de rastreamento de contaminação no processo, utilizando este equipamento (Raízen, 2020). A utilização desse recurso, além de acessível economicamente, garante rapidez na análise e pode ser utilizado em amostras de diferentes partes do processo produtivo.

Com a disseminação do conceito *Environmental, Social, and Governance* (ESG), que avalia o desempenho e os impactos de empresas, organizações ou investimentos em questões ambientais, sociais e de governança, com o objetivo de direcionar a atividade industrial de forma que atue com impacto positivo no mercado, na sociedade e no planeta, a sustentabilidade continuará a ser uma força motriz na evolução das tecnologias de monitoramento. O desenvolvimento de métodos menos invasivos e mais eficientes, que utilizem menos recursos químicos e gerem menos resíduos, será essencial para atender às demandas por processos industriais mais verdes e alinhados às práticas de economia circular.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de bactérias contaminantes em fermentações alcoólicas é um dos principais desafios enfrentados pelas usinas sucroalcooleiras, impactando diretamente na eficiência do processo e nos custos operacionais. Métodos tradicionais de monitoramento, apesar de amplamente utilizados, apresentam limitações que podem comprometer a detecção precoce e o controle efetivo das contaminações. Nesse cenário, o avanço da microbiologia, da biotecnologia e da inteligência artificial pode oferecer soluções inovadoras que permitam um acompanhamento mais rápido, preciso e integrado deste parâmetro.

O uso de tecnologias mais avançadas não apenas melhora a detecção de contaminantes, mas também contribui para a adoção de práticas preventivas e corretivas mais eficientes. Além disso, a integração de sistemas automatizados ao ambiente industrial permite o monitoramento contínuo e em tempo real, reduzindo a necessidade de intervenções emergenciais e promovendo a sustentabilidade do processo fermentativo.

Este estudo reafirma a relevância do processo de fermentação alcoólica como uma ferramenta biotecnológica de impacto global. A sua aplicação na produção de etanol evidencia

a capacidade de unir eficiência técnica, sustentabilidade ambiental e viabilidade econômica, características essenciais para enfrentar desafios energéticos. A fermentação alcoólica não é apenas uma alternativa energética, ela representa um mecanismo vital na transição para uma economia de baixo carbono, contribuindo significativamente para a mitigação dos efeitos das mudanças climáticas.

A aplicação de métodos analíticos rápidos e precisos é essencial para que engenheiros, operadores das plantas e toda a gestão de uma unidade de produção de etanol possam tomar decisões rápidas a partir das informações geradas pelo laboratório de controle de qualidade. Nesse cenário, as tecnologias de respostas em tempo real têm se mostrado mais adequadas para o controle dos processos, reduzindo o tempo de análise e diminuindo o custo de mão de obra. A identificação das concentrações iniciais de contaminação bacteriana ou de produção excessiva de ácidos orgânicos permite antecipar intervenções corretivas, o que reduz custos com insumos e eventuais desperdícios.

O impacto ambiental positivo do etanol produzido por fermentação alcoólica é inegável. A redução de emissões de gases de efeito estufa, a menor dependência de combustíveis fósseis e o aproveitamento de resíduos agrícolas posicionam o etanol como uma solução estratégica para problemas energéticos e ambientais globais. A integração de práticas como a fertirrigação com vinhaça e a cogeração de energia a partir do bagaço de cana-de-açúcar reforçam a sustentabilidade do setor, promovendo a economia circular e otimizando o uso de recursos. Outrossim, os impactos ambientais dos métodos abordados no trabalho fortalecem a importância e a necessidade de métodos cada vez mais sustentáveis ambientalmente, que gerem menos resíduos químicos.

O processo de fermentação alcoólica gera impactos sociais significativos, especialmente em países como o Brasil, onde a produção de etanol movimentou economias locais e gera milhares de empregos. Essa integração entre ciência, economia e sociedade demonstra o papel transformador da fermentação alcoólica.

Em um contexto global, a fermentação alcoólica está bem posicionada para desempenhar um papel ainda maior no futuro da energia sustentável. A expansão do uso de matérias-primas alternativas, como resíduos lignocelulósicos e biomassa, abre novas possibilidades para ampliar a produção de etanol sem competir com a cadeia alimentar.

Em suma, conclui-se que o aprimoramento de tecnologias mais precisas e a implementação de métodos simples e rápidos de acompanhamento microbiológico são alternativas atraentes para otimizar o controle de bactérias em fermentações alcoólicas. Apesar do método tradicional de contagem direta ao microscópio apresentar menor precisão, a técnica

possui boa reprodutibilidade quando o número de bastonetes da amostra está acima de 10^6 bastonetes/mL, porém, a depender do tempo entre uma análise e outra, a detecção da contaminação pode ser tardia e levar a perdas produtivas e econômicas. Além disso, como a técnica envolve uma série de manipulações, erros de diluição ou manipulação podem aumentar o tempo da análise. A implementação da espectroscopia de infravermelho próximo no monitoramento do processo pode contribuir muito para o controle da contaminação e para a automação do processo, por analisar diversos parâmetros em tempo real. No entanto, os equipamentos indicados para monitoramento *online* do processo (NIR industrial) não são portáteis, são caros e exigem pessoal capacitado para sua calibração e operação. A utilização de equipamentos mais baratos e fáceis de portar, como é o caso do lactímetro, é uma excelente alternativa para os casos onde se necessita rastrear possíveis pontos de contaminação. Por ser portátil, o equipamento pode ser utilizado em todos os setores da indústria sucroalcooleira, e tem capacidade de fornecer informações sobre a concentração de ácido láctico nos caldos (moenda, caldo caleado, caldo clarificado e caldo filtrado), no xarope, nos méis, no mosto e no vinho, podendo ser uma tecnologia complementar a outras.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, H. *et al.* **Fermentação Alcoólica: ciência e tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 2005. 434 p.

AMORIM, H. V. *et al.* **Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage**. The alcohol textbook. Nottingham: University press, 2009. p. 39-46.

AMORIM, H.V. *et al.* **Scientific challenges of bioethanol production in Brazil.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 91, n. 5, p. 1267-1275, set. 2011.

BARRETO, T. **Etanol, o combustível do Brasil.** *Ciência & Trópico*, 2011.

BASÍLIO, A. C. M. *et al.* **Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process.** *Current Microbiology*, v. 56, p. 322-326, 2008.

BASSO, T. O. *et al.* **Homo and Heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation.** *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 105, n. 1, p. 169-177, jan. 2014.

BECKNER, M. *et al.* **Microbial contamination of fuel ethanol fermentations.** *Letters in applied microbiology*, v. 53, n. 4, p. 387-394, 2011.

BNDES. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável.** 1^a ed, Rio de Janeiro, Novembro, 2008.

BORTOLI, D. A. S. *et al.* **Multiplicação de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) cervejeiras utilizando meios de cultura a base de açúcar mascavo.** *Bioenergia em Revista: Diálogos* (ISSN: 2236-9171), v. 3, n. 2, p. 50-68, 2013.

BOSCHIERO, B. N. **Etanol de milho no Brasil: 3 razões que impulsionam o crescimento.** *Agroadvance*, abril, 2022. Disponível em: <https://agroadvance.com.br/blog-etanol-de-milho-no-brasil-crescimento/>.

CECCATO-ANTONINI, S. R. **Microbiologia da fermentação etanólica: fundamentos, avanços e perspectivas.** São Carlos, EdUFScar, 2021.

CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA. **Manual de métodos analíticos controle química da fermentação.** 2005. Disponível em: <https://toaz.info/doc-view-3>.

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica.** 2003. Tese (Doutorado em agronomia) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CNPEN. **Etanol: estudo aponta que as emissões de biocombustível brasileiro são menores.** Julho 2021. Disponível em: <https://cnpem.br/etanol-estudo-aponta-que-emissoes-do-biocombustivel-brasileiro-sao-menores/>.

COSTA M. G. *et al.* **Desempenho produtivo de vacas leiteiras alimentadas com diferentes proporções de cana-de-açúcar e concentrado ou silagem de milho na dieta.** *Revista Brasileira de Zootecnia*, dezembro 2005.

COSTA, M. A. S. **Efeito do sistema de fermentação, da adição de etanol ao tratamento ácido e da contaminação por *Lactobacillus* sp na produção de etanol.** Dissertação de

Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados, UFSCar, 2017.

DUTRA, M. S. **Destilação de mostos da fermentação alcoólica para produção de etanol hidratado**. 2017. Monografia (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

EPE. Cenários de Oferta de Etanol e Demanda do Ciclo Otto: 2020-2030. 2019b. Disponível em: <https://www.epe.gov.br/pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/cenarios-oferta-etanol-e-demanda-ciclo-otto>.

EPE. Plano Decenal de Expansão de Energia 2029. 2020. Disponível em: http://www.mme.gov.br/c/document_library/get_file?uuid=a18d104e-4a3f-31a8-f2cf-382e654dbd20&groupId=36189.

ESCARPMENT LABORATORIES. **Viability assays - erythrosin b vs. methylene blue**. april 13, 2023. Disponível em: <https://knowledge.escarpmentlabs.com/article/302-viability-assays-erythrosin-b-vs-methylene-blue#:~:text=Erythrosin%20B%20is%20our%20preferred,a%20fun%20vibrant%20pink%20colour>.

FERMENTEC. **Controle bacteriano na fermentação alcoólica influencia diretamente na redução dos custos operacionais e perdas dos açúcares**. Disponível em: <https://fermentecnews.com.br/2020/09/04/controle-bacteriano-na-fermentacao-alcoolica-influencia-diretamente-na-reducao-dos-custos-operacionais-e-perdas-dos-acucares/>, 2020.

FERMENTEC. **Domine a microbiologia das fermentações alcoólicas**. Disponível em: <https://cursos.strix.one>, 2023.

FERRAZ, M. N. **Uso de espectrometria para investigação da qualidade da cana-de-açúcar em campo**. Dissertação, USP, Piracicaba, 2015.

GALLO, A. L. *et al.* **Fundamentos de bioquímica para ciências biológicas, ciência dos alimentos, agrônômicas e florestais**. Piracicaba, março 2012.

GÓES-FAVONI, S. P. *et al.* **Fermentação alcoólica na produção de etanol e os fatores determinantes do rendimento**. Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais, v. 9, n. 4, 2018.

HIGGINS, C. **L-lactate and D-lactate - clinical significance of the difference**. Acutecaretesting, october 2011. Disponível em: <https://acutecaretesting.org/en/articles/l-lactate-and-d-lactate-clinical-significance-of-the-difference>.

ILHA, E. C. *et al.* **Rendimento e eficiência da fermentação alcoólica na produção de hidromel**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2008.

JACOB, A. B. *et al.* **Estudo sobre a viabilidade celular da levedura no processo de fermentação em uma usina de álcool e açúcar.** Environmental Science & Technology Innovation, Bauru, v. 1, n.2, p. 108-131, março 2023.

JARDINE, J. G. *et al.* **Indicações de aspectos tecnológicos sobre o bioetanol de matéria-prima amilácea.** Embrapa, novembro 2009.

LIMA, R. P. *et al.* **Fatores que influenciam no rendimento fermentativo na produção de etanol: Um estudo de revisão.** Universidade Paranaense – UNIPAR, 2021.

LIN, L. *et al.* **Emerging heterogeneous catalysts for biomass conversion: Studies of the Emerging mechanism.** Chemical Society Review, v. 50, n.20, p. 11270-11292, 2021.

LOPES *et al.* **Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry.** Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 47, n. 1, p. 64-76, dez. 2016.

MAIORELLA, B. L. *et al.* **Feed component inhibition in ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*.** Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 26, n. 10, p. 1155-1166, 1984b.

MARCONDES, M. S. *et al.* **Sugar Cane (*Saccharum officinarum* L.) analysis through biospeckle and spectroscopy (NIR).** Journal of Agricultural Science and Technology B, v. 7, p. 62-68, 2017.

MILESSI, T. S. S. **Produção de etanol 2G a partir de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando *Saccharomyces cerevisiae* selvagem e geneticamente modificadas.** Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, UFSCar, 2017.

NEVES, F. M. *et al.* **Etanol de Milho, Cenário Atual e Perspectivas para a Cadeia no Brasil.** Sociedade Nacional de Agricultura, 2021.

NOVACANA. **Propriedades Físico-químicas do etanol.** 2013. Disponível em: <https://www.novacana.com/noticias/propriedades-fisico-quimicas>.

OLIVEIRA, A. J. *et al.* **Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar.** Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ-USP, 1996.

PACHECO, F. T. **Produção de etanol: Primeira ou Segunda Geração?.** Embrapa, Brasília, DF, Abril, 2011.

PASQUINI, C. **Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical aspects and analytical applications.** J. Braz. Chem. Soc., v.14, 198-219, 2003.

PROPEQ (org). **Contínuo ou Batelada: qual processo escolher?** 2020. Disponível em: <https://propeq.com/continuo-ou-batelada/>.

RAÍZEN. **Etanol de segunda geração: potencial e oportunidades**. Fevereiro 2023. Disponível em: <https://www.raizen.com.br/blog/etanol-de-segunda-geracao>.

RAÍZEN. **Etanol: o que é e como é usado no Brasil**. 2022. Disponível em: <https://www.raizen.com.br/blog/etanol>.

RAÍZEN. **Frequência analítica - Qualidade Integrada**. Julho, 2024.

RAÍZEN. **Raízen inaugura o primeiro laboratório 100% automatizado para Pagamento de Cana por Teor de Sacarose**. São Paulo, abril de 2019. Disponível em: <https://www.raizen.com.br/sala-de-imprensa/raizen-inaugura-primeiro-laboratorio-100-automatizado-para-pagamento-de-cana-por-teor-de-sacarose>.

RAÍZEN. **Rastreamento de contaminação**. Protocolo Corporativo, abril 2020.

SANTOS, M. C. **Condução de fermentação etanólica contínua com o uso de antibiótico**. Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2016.

SENIOR. **Produção sucroalcooleira: tudo que você precisa saber**. Dezembro 2024. Disponível em: <https://www.senior.com.br/blog/producao-sucroalcooleira-tudo-o-que-voce-precisa-saber>.

SILVA, A. F. **Caracterização genética de linhagens de *saccharomyces cerevisiae* isoladas de fermentações espontâneas de cachaças de alambique da Bahia**. Dissertação de mestrado. p. 115, 2009.

SÓ BIOLOGIA. **Cissiparidade ou fissão binária**. 2008. Disponível em: <https://www.sobiologia.com.br/conteudos/Reinos/Cissiparidade.php>.

SOLOMON, S. *et al.* **Climate Change 2007: The physical science basis. Contribution of IPCC Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge Univ. Press, USA. 2007.

SONEGO, J. L. S. **Estudo da produção de etanol de sacarose por fermentação extrativa utilizando arraste com dióxido de carbono**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

SOUZA, M. A. C. *et al.* **Floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum* em processos industriais de fermentação alcoólica avaliada por técnica fotométrica**. Ciência e Agrotecnologia. Agosto 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542004000400023>.

TECNAL. **Importância da determinação de fibra em usinas de açúcar e etanol**. Disponível em: https://tecnal.com.br/pt-BR/blog/331_importancia_da_determinacao_de_fibra_em_usinas_de_acucar_e_etanol.

UNICA. **Observatório da Cana: Acompanhamento de Safra**. 2021. Disponível em: <https://observatoriodacana.com.br/>.

VENTURA, R. **Quantificação de ácido lático na fermentação etanólica como parâmetro de monitoramento do processo**. Dissertação (mestrado), UNESP, Rio Claro, 2007.

VIAN, C. E. F. **Qualidade de matéria-prima**. Embrapa, fevereiro 2022. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/cana/pos-producao/gestao-industrial/qualidade-de-materia-prima#:~:text=Pureza:%20%C3%A9%20determinada%20pela%20rela%C3%A7%C3%A3o,%20polissacar%C3%ADdeos%20e%20algumas%20prote%C3%ADnas>.

WANG *et al.* **Well-to-wheels energy use and greenhouse gas emissions of ethanol from corn, sugar-cane and cellulosic biomass for US use**. Environmental Research Letters, v.7, p.1-13, 2012.