

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

Andriele Fatima da Silva Santos

**Impacto de Contaminações por Bactérias Láticas em Processos
Produtivos de Etanol e Métodos de Controle Microbiológico**

São Carlos/SP

2026

Andriele Fatima da Silva Santos

Impacto de Contaminações por Bactérias Láticas em Processos
Produtivos de Etanol e Métodos de Controle Microbiológico

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Departamento
de Química da Universidade
Federal de São Carlos, para
obtenção do título de Bacharel
em Química Tecnológica.

Orientador: Prof. Dr. Diego
Andrade Lemos

Coorientador: Prof. Dr. Edson
Rodrigues Filho

São Carlos/SP

2026



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA (DQ)**

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 8/2026/DQ/CCET

Graduação: Defesa Pública de Trabalho de Conclusão de Curso

Folha Aprovação

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANDRIELE FATIMA DA SILVA SANTOS

**IMPACTO DE CONTAMINAÇÕES POR BACTÉRIAS LÁTICAS EM PROCESSOS PRODUTIVOS DE ETANOL E
MÉTODOS DE CONTROLE MICROBIOLÓGICO**

Trabalho de Conclusão de Curso

Universidade Federal de São Carlos – Campus São Carlos

São Carlos, 15 de junho de 2026

ASSINATURAS E CIÊNCIAS

Cargo/Função	Nome Completo
Orientador	Prof. Dr. Diego Andrade Lemos
Membro da Banca 1	Profa. Dra. Natalia Alvarez Rodrigues
Membro da Banca 2	Dr. Maurício Augusto Alves



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Samuel Schwab, Professor(a)**, em 25/06/2026, às 10:27, 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 **2330645** e o código CRC **C6E8E919**.

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

SEI nº 2330645

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus e a Nossa Senhora, por terem me dado forças nos momentos difíceis, guiado meus passos ao longo dessa caminhada e mostrado que sonhos podem, sim, se tornar realidade.

Aos meus pais, Karina e Marcelo, deixo minha mais profunda gratidão por todo o amor, apoio e incentivo ao longo da minha vida. Obrigada pelos conselhos, pela paciência, pelas conversas e por nunca terem deixado que eu desistisse dos meus objetivos. Vocês são minha base, meu maior exemplo e a razão de muitas das minhas conquistas. Amo vocês imensamente.

Agradeço aos professores do Departamento de Química e do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, especialmente ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho, pela oportunidade de desenvolvimento científico durante os dois anos de iniciação científica, pelos ensinamentos, apoio e confiança depositada em mim ao longo dessa trajetória.

Ao Prof. Dr. Diego Andrade Lemos, agradeço pela orientação, dedicação, paciência e pelas contribuições fundamentais para a realização deste trabalho e para minha formação acadêmica.

Aos meus amigos de graduação — Bianca Andre, Bruno Campana, Débora Martins, Guilherme Couto, Isaque Felix, Maiara Medeiros, Maria Clara Zanetti e Mariana Guimarães — obrigada por todo o companheirismo, apoio, acolhimento e pelos momentos compartilhados ao longo dessa trajetória. A caminhada se tornou muito mais leve e especial ao lado de vocês.

A todos que cruzaram meu caminho durante essa trajetória e contribuíram, de alguma forma, para a realização deste sonho, deixo minha mais sincera gratidão. Nada disso teria sido possível sem o apoio, os ensinamentos e o carinho recebidos ao longo desses anos.

Com gratidão, encerro esta importante etapa da minha vida.

Resumo

A produção de etanol no Brasil ocorre predominantemente pela fermentação alcoólica, com destaque para o processo Melle-Boinot, que se baseia na reutilização de leveduras entre ciclos fermentativos, contribuindo para maior eficiência produtiva. Entretanto, devido à operação em larga escala e à ausência de condições totalmente assépticas, o processo torna-se suscetível a contaminações microbiológicas, sendo as bactérias láticas um dos principais fatores de interferência, pois competem com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* pelos açúcares do mosto e produzem metabólitos indesejáveis, como ácidos orgânicos, que comprometem a viabilidade celular e o rendimento em etanol. Nesse contexto, o monitoramento microbiológico é essencial para a detecção precoce de desvios, embora os métodos convencionais apresentem limitações relacionadas à precisão e à execução manual. Paralelamente, estratégias tradicionais de controle, como o tratamento ácido e o uso de antibióticos, apesar de eficazes, atuam predominantemente de forma corretiva e apresentam desvantagens associadas a impactos ambientais, riscos operacionais e ao desenvolvimento de resistência microbiana. Nesse contexto, o sistema CIP (*Cleaning-in-Place*) destaca-se como uma abordagem preventiva de higienização, permitindo a limpeza de equipamentos industriais sem a necessidade de desmontagem, contribuindo para a redução da carga microbiana, a prevenção de contaminações recorrentes e a maior estabilidade do processo fermentativo. Este trabalho teve como objetivo analisar o impacto das bactérias láticas na produção de etanol, discutir métodos de monitoramento e controle microbiológico e avaliar o papel do sistema CIP como estratégia preventiva, por meio de uma revisão bibliográfica de caráter exploratório baseada em artigos científicos, livros e documentos técnicos. Dessa forma, conclui-se que a integração entre monitoramento microbiológico e o uso adequado do sistema CIP favorece o controle das contaminações, promovendo melhorias no desempenho industrial, na produtividade e na sustentabilidade da produção de etanol.

Palavras-chaves: Fermentação alcoólica; Etanol; Contaminação microbiana; Bactérias láticas; CIP.

Abstract

Ethanol production in Brazil occurs predominantly through alcoholic fermentation, with the Melle-Boinot process being particularly noteworthy. This process relies on the reuse of yeast between fermentation cycles, contributing to greater production efficiency. However, due to large-scale operation and the absence of completely aseptic conditions, the process becomes susceptible to microbiological contamination. Lactic acid bacteria are one of the main interfering factors, as they compete with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for the sugars in the must and produce undesirable metabolites, such as organic acids, which compromise cell viability and ethanol yield. In this context, microbiological monitoring is essential for the early detection of deviations, although conventional methods have limitations related to precision and manual execution. In parallel, traditional control strategies, such as acid treatment and the use of antibiotics, while effective, act predominantly in a corrective manner and present disadvantages associated with environmental impacts, operational risks, and the development of microbial resistance. In this context, the CIP (*Cleaning-in-Place*) system stands out as a preventive hygiene approach, allowing the cleaning of industrial equipment without the need for disassembly, contributing to the reduction of microbial load, the prevention of recurrent contamination, and greater stability of the fermentation process. This work aimed to analyze the impact of lactic acid bacteria on ethanol production, discuss methods of microbiological monitoring and control, and evaluate the role of the CIP system as a preventive strategy, through an exploratory literature review based on scientific articles, books, and technical documents. Therefore, it is concluded that the integration between microbiological monitoring and the proper use of the CIP system favors the control of contamination, promoting improvements in industrial performance, productivity, and the sustainability of ethanol production.

Keywords: Alcoholic fermentation; Ethanol; Microbial contamination; Lactic bacteria; CIP.

Lista de Figuras

Figura 1: Representação esquemática do processo da fotossíntese.	21
Figura 2: Organização estrutural da biomassa lignocelulósica.	22
Figura 3: Esquema representativo das etapas de conversão de açúcares a etanol, CO ₂ e glicerol que ocorrem no citoplasma das células de leveduras.	25
Figura 4: Fluxograma representando o processo de produção do açúcar e etanol a partir da cana-de-açúcar.	27
Figura 5: (A) Esquema simplificado do processo de fermentação Melle-Boinot (batelada alimentada). (B) Esquema do processo de fermentação contínua para produção de álcool.	30
Figura 6: Leveduras e lactobacilos em suspensão. (A) durante a fermentação etanólica (B) em estado floculado	36
Figura 7: Metabolismo das bactérias lácticas homofermentativas (Azul) e heterofermentativas (Vermelho).	38
Figura 8: Representação do transporte de ácido láctico do ambiente extracelular para o interior da levedura, onde ocorre sua dissociação em íon lactato.	39
Figura 9: Etapas da formação de biofilme microbiano.	40
Figura 10: Câmara de Neubauer.	41
Figura 11: Equipamento lactímetro.	42
Figura 12: Esquema do procedimento da coloração de Gram.	43
Figura 13: Estrutura da parede celular das bactérias (A) Gram-positivas e (B) Gram-negativas.	44
Figura 14: Esquema do procedimento da diluição seriada e plaqueamento.	45

Figura 15: Representação esquemática de um sistema CIP com reutilização aplicado à limpeza de um fermentador em ambiente industrial.

52

Lista de Equações

Equação 1: Hidrólise da Sacarose	24
Equação 2: Fermentação Alcoólica da Glicose	24

Lista de Tabelas

Tabela 1: Rendimento teórico de álcool absoluto em massa a partir de monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos.	25
Tabela 2: Principais compostos com potencial inibitório presente no mosto e seus efeitos na fermentação alcoólica.	33
Tabela 3: Principais produtos químicos utilizados em sistemas CIP na indústria de etanol.	50
Tabela 4: Principais pontos de aplicação do sistema CIP, materiais e tipos de incrustações no processo de produção de etanol.	53
Tabela 5: Comparação entre os dispositivos de limpeza dos tanques utilizados em sistemas CIP na indústria de etanol.	54
Tabela 6: Resumo das estratégias convencionais para o controle de contaminações bacterianas.	55

Lista de Siglas e Abreviações

ADP - Adenosina Difosfato
AR - Açúcares Redutores
ART - Açúcares Redutores Totais
ATP - Adenosina Trifosfato
ATR - Açúcar Total Recuperável
BAL - Bactérias Láticas
°C - Grau Celsius
C₂H₅OH - Etanol
CIP - Cleaning-in-Place
CO₂ - Dióxido de carbono
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
E1G - Etanol de Primeira Geração
E2G - Etanol de Segunda Geração
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EMP - Embden–Meyerhof–Parnas
EPS - Substâncias Poliméricas Extracelulares
HMF - Hidroximetil-furfural
INPM - Instituto Nacional de Pesos Medidas
Kg - Quilograma
LPS - Lipopolissacarídeo
NAD⁺ - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NaOH - Hidróxido de Sódio
O₂ - Oxigênio
pH - Potencial hidrogeniônico
P_i - Fosfato Inorgânico
pKa - Logaritmo Negativo da Constante de Dissociação Ácida
Proálcool - Programa Nacional do Alcool
RJH - Rotary Jet Head
RNA - Ácido ribonucleico
RSH - Rotary Spray Head
SSB - Static Spray Ball

UFC - Unidade Formadora de Colônia

Sumário

1. Introdução	14
2. Objetivos	18
3. Metodologia	19
4. Revisão Bibliográfica	20
4.1 Etanol	20
4.2 Produção de Etanol	23
4.2.1 Mecanismos Bioquímicos da Fermentação Alcoólica pela Levedura <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	23
4.2.2 Processo Produtivo do Etanol a Partir da Cana-de-açúcar	26
4.2.3 Modos de Classificação dos Processos da Fermentação Alcoólica	28
4.3 Fatores que Afetam a Fermentação Alcoólica	31
4.4 Contaminações Bacterianas no Processo Fermentativo	34
4.5 Métodos Convencionais de Detecção e Monitoramento Microbiológico	40
4.6 Métodos de Controle de Contaminações Bacterianas	46
4.6.1 Tratamento Ácido	46
4.6.2 Antibióticos	46
4.6.3 Sistema CIP (<i>Cleaning-in-Place</i>)	48
5. Considerações Finais	57
6. Referências	59

1. Introdução

Um dos principais desafios globais consiste na busca por fontes de energia alternativas ao petróleo. Nesse contexto, o desenvolvimento e a adoção de combustíveis renováveis surgem como estratégias essenciais para reduzir a dependência de recursos não renováveis e minimizar os impactos ambientais associados ao uso de derivados do petróleo (Salvato, 2010). Entre os biocombustíveis disponíveis, o etanol, o mais comum atualmente, se destaca como uma alternativa sustentável aos combustíveis fósseis, sendo obtido principalmente a partir da cana-de-açúcar, rica em sacarose, e do milho, fonte de amido (Reis, 2024).

Uma característica vantajosa dos biocombustíveis é a possibilidade de produção em diferentes regiões do mundo, utilizando matérias-primas locais e tecnologias acessíveis. O Brasil, por exemplo, é reconhecido pela produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, já os Estados Unidos utilizam predominantemente o milho, assim como o Canadá, que faz uso do milho e do trigo como matérias-primas, enquanto países como a Malásia e a Indonésia produzem etanol a partir do óleo de palma, a Suécia, o Reino Unido e a Áustria utilizam madeira para a produção de combustíveis (Herrera, 2006). Porém, a utilização de diferentes matérias-primas nos processos fermentativos exige adaptações importantes nas condições operacionais, incluindo ajustes nutricionais e um controle mais preciso do ambiente de fermentação (Sonego, 2016).

No Brasil, o etanol começou a receber maior atenção a partir da primeira crise mundial do petróleo em 1973, que expôs a vulnerabilidade do país diante da dependência energética externa (Michellon; Santos; Rodrigues, 2008). Como resposta, foi instituído o Programa Nacional do Álcool (Proálcool) em 1975, criado com o objetivo de reduzir a dependência do país em relação às importações do petróleo (Lopes et al., 2016). Antes dessa iniciativa, o etanol era considerado apenas um subproduto da indústria canavieira, sem expressão significativa no cenário energético nacional.

Após o lançamento do Proálcool, o setor sucroenergético passou por forte expansão. Já na década de 1990, o governo brasileiro iniciou um processo de desregulamentação do setor sucroenergético, o que incluiu a liberação das exportações de açúcar e a redução da intervenção estatal nos preços e na produção. Essa abertura promoveu a competitividade internacional do Brasil, resultando em um expressivo aumento das exportações promovendo a integração entre as usinas de açúcar e as destilarias de álcool, o que impulsionou o crescimento e a modernização do setor sucroenergético nacional, que se mantém até os dias atuais (Dias et al., 2015).

Com a incorporação da geração de energia a partir da biomassa, especialmente do bagaço da cana-de-açúcar, o setor sucroalcooleiro passou a ser reconhecido como setor sucroenergético, refletindo a ampliação e diversificação de seu processo produtivo. Esse movimento fortaleceu o papel estratégico do setor na matriz energética e na economia nacional, impulsionado pela capacidade de produzir etanol como biocombustível e de gerar bioeletricidade a partir de resíduos agroindustriais. Dessa forma, unidades industriais que antes eram voltadas exclusivamente para a produção de açúcar passaram a adotar modelos integrados, incorporando também a produção de etanol e, posteriormente, a geração de energia elétrica por meio do aproveitamento do bagaço, consolidando a transição para um sistema produtivo mais sustentável e eficiente (Milanez; Souza; Mancuso, 2017; Silva, 2024). Essa diversificação ampliou a complexidade tecnológica do setor e permitiu sua atuação simultânea em mercados complementares, agregando valor à cadeia da cana-de-açúcar. Além disso, novas etapas foram incorporadas ao processo industrial, especialmente no pós-processamento, reforçando o papel estratégico do setor sucroenergético tanto na matriz energética quanto no desenvolvimento econômico sustentável do país.

Esse fortalecimento estrutural e tecnológico contribuiu para consolidar o Brasil como um dos principais produtores mundiais de etanol, ocupando a segunda posição no cenário global, atrás apenas dos Estados Unidos (Alternative Fuels Data Center, [s.d.]). A produção de etanol combustível fundamenta-se predominantemente na fermentação alcoólica, processo bioquímico em que açúcares monossacarídeos, como glicose e frutose, são metabolizados por microrganismos, resultando na formação de etanol e dióxido de carbono (CO₂). Entre os agentes biológicos empregados, destacam-se as leveduras do gênero *Saccharomyces*, amplamente utilizadas devido à sua elevada eficiência fermentativa e tolerância às condições industriais.

No contexto industrial, a fermentação alcoólica é conduzida sob condições operacionais controladas, com o objetivo de maximizar o rendimento em etanol e garantir a estabilidade do processo. Para isso, as usinas adotam estratégias tecnológicas específicas voltadas ao reaproveitamento celular, ao controle microbiológico e à otimização dos ciclos fermentativos. Nas usinas brasileiras, a produção de etanol pode ocorrer por meio de processos contínuos, descontínuos (ou em batelada) e em batelada alimentada, nos quais a reciclagem de leveduras constitui uma prática recorrente. Essa estratégia permite manter elevada a densidade celular nas dornas de fermentação, favorecendo o desempenho do processo (Bai; Anderson; Moo-Young, 2008).

Nesse contexto, as destilarias brasileiras utilizam o processo fermentativo Melle-

Boinot, que apresenta diversas vantagens, entre elas uma alta produtividade e ciclos rápidos de fermentação, no entanto, trata-se de um processo sensível a variações nas condições físico-químicas do meio e a contaminação de microrganismos indesejáveis (Ceccato-Antonini, 2022). A eficiência fermentativa depende de fatores como temperatura, pH, composição do mosto e, especialmente, da qualidade microbiológica do processo.

Em processos industriais de produção de etanol, a contaminação microbiológica constitui um dos principais fatores que comprometem a eficiência fermentativa e a estabilidade operacional. Entre os contaminantes mais recorrentes destacam-se as bactérias lácticas (BAL) e as leveduras selvagens, capazes de competir com a *Saccharomyces cerevisiae* pelos açúcares disponíveis no mosto, alteram o pH do meio e produzem ácidos orgânicos e compostos inibitórios, resultando em perda de rendimento do processo fermentativo, redução na viabilidade celular e aumento do custo de produção (Ceccato-Antonini, 2017).

Dentre os microrganismos contaminantes, as BAL são frequentemente apontadas como as mais problemáticas na produção de etanol, tanto em substratos amiláceos, como o milho, quanto em matérias-primas sacarinas, como a cana-de-açúcar. Esses microrganismos podem produzir compostos como ácido lático e ácido acético, que afetam negativamente o crescimento e a atividade fermentativa das leveduras, podendo, em situações mais severas, levar à queda do desempenho fermentativo e até à interrupção parcial do processo (Rich et al., 2015; Rich et al., 2018). Além disso, a presença crônica desses contaminantes favorece a formação de biofilmes em tanques, tubulações e equipamentos, dificultando a higienização e aumentando os custos operacionais.

A introdução desses contaminantes no processo industrial pode ocorrer por diferentes vias, incluindo a matéria-prima vegetal, o solo, a água utilizada na preparação do mosto e os próprios equipamentos envolvidos nas etapas de produção. Entre as principais estratégias de controle microbiológico empregadas na indústria destacam-se o tratamento ácido da levedura, a higienização sistemática dos equipamentos e, em determinadas situações, o uso de agentes antimicrobianos (Ceccato-Antonini, 2017). Nesse contexto, o sistema *Cleaning-In-Place* (CIP) representa uma ferramenta importante de sanitização industrial, pois permite a limpeza interna de tubulações, tanques e demais equipamentos por meio da circulação de soluções sanitizantes, sem a necessidade de desmontagem dos sistemas (Thomas; Sathian, 2014). Esse método contribui para a redução da carga microbiana, para a prevenção da formação de biofilmes e para a maior padronização das condições operacionais.

Métodos alternativos, como o emprego de produtos naturais com ação bacteriostática, bacteriófagos e melhorias no manejo operacional (como controle rigoroso de pH, temperatura

e fluxo de reciclo de levedura), vêm ganhando destaque como alternativas sustentáveis. A combinação dessas práticas, aliada ao monitoramento constante da qualidade microbiológica do mosto e da levedura reciclada, constitui um conjunto estratégico para reduzir perdas, aumentar o rendimento alcoólico e garantir a estabilidade do processo industrial.

2. Objetivos

a) Objetivo Geral

Realizar uma revisão bibliográfica sobre as contaminações bacterianas que afetam os processos fermentativos na produção de etanol, com ênfase no impacto das bactérias láticas sobre o rendimento e a estabilidade operacional, bem como na importância dos processos de higienização industrial para o controle microbiológico.

b) Objetivos Específicos

- Identificar as principais bactérias contaminantes presentes nos processos fermentativos da produção de etanol;
- Analisar os impactos das bactérias láticas sobre a eficiência da fermentação alcoólica e a qualidade do etanol produzido;
- Descrever os principais métodos de controle microbiológico empregados na indústria sucroenergética;
- Avaliar o método Cleaning-In-Place (CIP) como estratégia de higienização industrial na prevenção e mitigação de contaminações bacterianas;
- Discutir os principais envolvidos no controle sanitário da fermentação, destacando falhas de higienização e condições operacionais que favorecem o desenvolvimento de contaminantes.

3. Metodologia

Este trabalho foi desenvolvido por meio de uma pesquisa bibliográfica, fundamentada na consulta a artigos científicos, livros, documentos técnicos e bases de dados eletrônicas. O levantamento bibliográfico foi realizado principalmente na base de dados Web of Science, sendo complementado por consultas ao Google Scholar, SciELO e PubMed para obtenção de trabalhos de acesso aberto e literatura complementar.

Foram utilizados os termos "clean-in-place", "ethanol", "fermentation", "lactic acid bacteria" e "microbiological control", empregados de forma isolada e em diferentes combinações, visando identificar estudos relacionados às contaminações bacterianas em processos fermentativos, aos métodos de controle microbiológico e às estratégias de higienização industrial na produção de etanol.

Foram priorizados artigos científicos publicados em periódicos indexados, livros e documentos técnicos pertinentes ao tema, com ênfase em publicações recentes, sem excluir estudos clássicos considerados fundamentais para a compreensão dos processos microbiológicos, fermentativos e de higienização abordados. Os critérios de inclusão contemplaram trabalhos relacionados à produção de etanol, contaminações por bactérias lácticas, métodos de controle microbiológico e sistemas Cleaning-In-Place (CIP), sendo excluídos estudos que não apresentavam relação direta com o objetivo da pesquisa.

4. Revisão Bibliográfica

4.1 Etanol

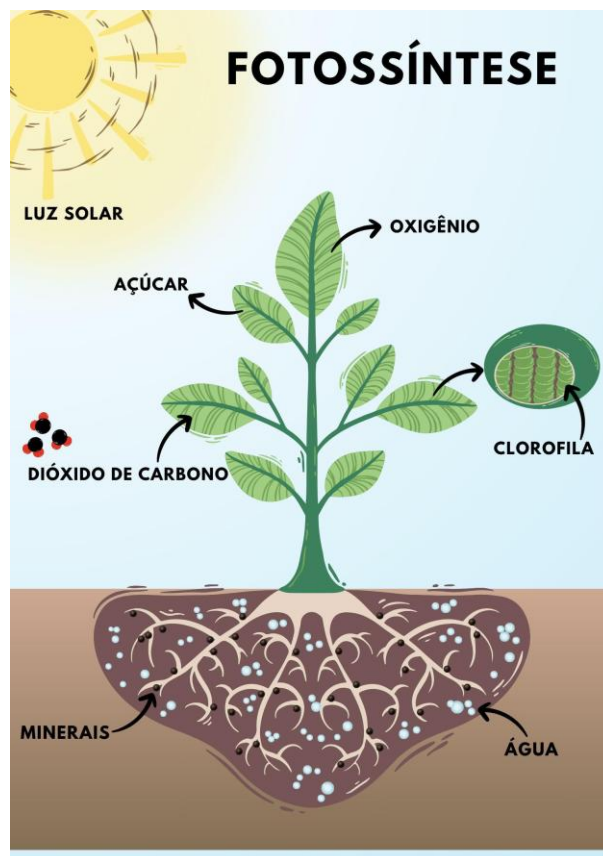
O etanol (C_2H_5OH), também conhecido como álcool etílico, é um composto orgânico pertencente à classe dos álcoois, caracterizado pela presença do grupo hidroxila (-OH) ligado a um átomo de carbono. É um líquido incolor, volátil e inflamável, miscível em água e em diversos solventes orgânicos (Bastos, 2007).

O etanol pode ser obtido por dois processos principais: o microbiológico e o químico. O processo químico envolve a hidratação do etileno, derivado do petróleo, resultando em etanol quimicamente idêntico ao de origem fermentativa. Já o processo microbiológico, também conhecido como fermentação alcoólica, é o mais utilizado no Brasil e se baseia na conversão de açúcares em etanol e dióxido de carbono (CO_2) por microrganismos, principalmente a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Reis, 2011; Ceccato-Antonini, 2022). Essa rota utiliza matérias-primas agrícolas ou resíduos vegetais, como a cana-de-açúcar, o milho e outros substratos ricos em açúcar ou amido (Baptista et al., 2006; Galbe; Zacchi, 2002). No Brasil, a principal matéria-prima utilizada para a produção de etanol é a cana-de-açúcar, enquanto nos Estados Unidos predominam os processos baseados no milho.

O etanol pode ser produzido por meio da fermentação de diversas fontes de açúcares, tanto simples quanto derivados de polissacarídeos. Sendo os mais estudados a sacarose, o amido e as celulosas.

A sacarose, principal componente na cana-de-açúcar madura, é um dissacarídeo de fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_{11}$. Sua formação ocorre durante a fotossíntese, processo no qual a planta utiliza luz solar, água e dióxido de carbono para produzir açúcares (carboidratos) e oxigênio (O_2). O processo ocorre nos cloroplastos, que contêm clorofila, pigmento responsável pela captação da energia luminosa. A água e os minerais são absorvidos pelas raízes, enquanto o dióxido de carbono é captado pelas folhas, resultando na formação de compostos orgânicos que servem de fonte de energia para o crescimento vegetal (Lima, 2019). A representação do processo da fotossíntese pode ser vista na Figura 1.

Figura 1: Representação esquemática do processo da fotossíntese.



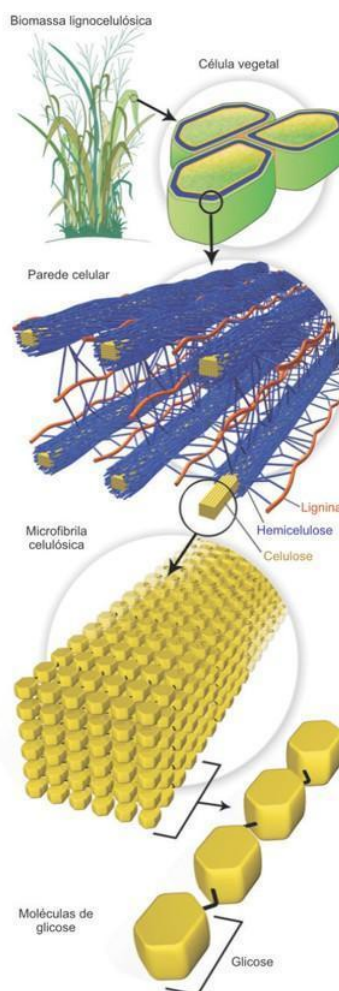
Fonte: Do autor (2025).

Já o amido é um polissacarídeo de reserva amplamente distribuído entre as espécies vegetais, como os cereais, tubérculos, leguminosas e frutas ainda verdes ou imaturas, atuando como a principal forma de armazenamento de energia. Formado nos plastídios das plantas superiores, o amido é sintetizado nas folhas durante o dia, se acumulando nos cloroplastos como uma reserva temporária de energia. À noite, ele é degradado, liberando açúcares solúveis, principalmente a sacarose, que é transportada pelo floema até os órgãos de armazenamento. Durante o processamento industrial, o amido pode ser hidrolisado enzimaticamente ou por ácidos para gerar açúcares fermentescíveis, como a glicose e a maltose, que são amplamente utilizados na produção de etanol. (Denardin; Silva, 2009; Tester; Karkalas; Qi, 2004).

Por fim, a celulose desempenha papel central na produção de etanol de segunda geração (E2G), atuando como a principal fonte de açúcares fermentescíveis provenientes da biomassa lignocelulósica. Essa biomassa é composta majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina (Figura 2). A celulose, em particular, é um polímero de glicose formado por unidades de monossacarídeos ligadas por ligações β -1,4-glicosídicas, que conferem elevada resistência estrutural às paredes celulares vegetais. Para a conversão em

etanol, essas cadeias precisam ser quebradas por meio de processos de pré-tratamento e hidrólise enzimática, liberando glicose que posteriormente é fermentada por microrganismos. Diferentemente do etanol de primeira geração (E1G), que é obtido a partir de açúcares simples ou amido (como a cana-de-açúcar e o milho), o E2G aproveita resíduos agroindustriais como bagaço e palha de cana-de-açúcar, permitindo o uso integral da biomassa vegetal (Santos et al., 2012; Amantes, 2022).

Figura 2: Organização estrutural da biomassa lignocelulósica.



Fonte: Santos et al. (2012).

A produção de etanol pode ser realizada por diferentes rotas tecnológicas, as quais variam conforme a matéria-prima empregada e as etapas envolvidas no processo industrial. Nesse contexto, as distinções entre etanol de primeira e segunda geração estão relacionadas principalmente aos substratos utilizados e à complexidade do processamento, e não necessariamente às características físico-químicas do produto final.

De acordo com o teor alcoólico, o etanol pode ser classificado em hidratado ou anidro. O etanol hidratado apresenta teor alcoólico de aproximadamente 92,6° INPM (Instituto Nacional de Pesos e Medidas), o que corresponde a cerca de 96% v·v⁻¹ de etanol e 4% v·v⁻¹ de água. Esse produto é amplamente utilizado como combustível em veículos do tipo *flex fuel*, podendo ser empregado de forma direta, sem necessidade de mistura com outros combustíveis fósseis. Já o etanol anidro possui teor alcoólico superior a 99,3% v·v⁻¹, sendo obtido por meio de processos adicionais de desidratação aplicados ao etanol hidratado, como peneiras moleculares ou destilação azeotrópica. Sua principal aplicação é como aditivo à gasolina, em proporções estabelecidas pela legislação vigente (Ceccato-Antonini, 2022; Raízen, 2025). Além da nomenclatura anterior, o etanol também pode ser classificado segundo seu teor alcoólico, grau de pureza e finalidade de uso. O etanol hidratado industrial, com grau alcoólico mínimo de 94% (m·m⁻¹) e baixo teor de impurezas, é empregado na fabricação de produtos de limpeza, cosméticos e solventes, enquanto o etanol hidratado neutro, de elevada pureza obtida por hidrosseleção e repasse, é destinado às indústrias farmacêuticas, cosméticas e de bebidas. Há ainda versões especiais, como o etanol hidratado tipo REN e COREIA (24 e 40), voltadas ao mercado internacional e produzidas sob rigorosos padrões de composição. Já o etanol anidro, com menos de 1% de água, pode ser classificado em industrial, utilizado na formulação de tintas, vernizes, aerossóis e desinfetantes, ou neutro, destinado a aplicações que exigem maior grau de pureza. Por fim, o etanol aditivado consiste em uma variação do etanol carburante, com aditivos detergentes e dispersantes adicionados que auxiliam na limpeza do sistema de combustão, reduzindo o acúmulo de resíduos e contribuindo para o melhor desempenho e durabilidade do motor (Raízen, 2025).

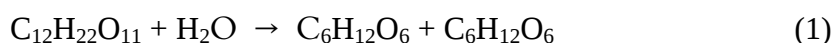
4.2 Produção de Etanol

4.2.1 Mecanismos Bioquímicos da Fermentação Alcoólica pela Levedura *Saccharomyces Cerevisiae*

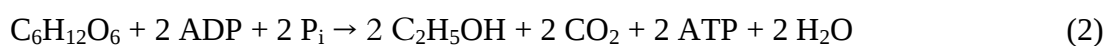
A fermentação alcoólica constitui uma das etapas fundamentais no processo de produção do etanol, sendo responsável pela conversão dos açúcares fermentescíveis em etanol e dióxido de carbono, por ação de microrganismos, principalmente leveduras do gênero *Saccharomyces*. Trata-se de um processo biotecnológico amplamente utilizado na indústria sucroalcooleira, cuja eficiência depende de diversos fatores, como a composição do meio, variação de temperatura nas dornas, valor do pH, concentração de etanol, pressão osmótica, concentração celular e contaminações (Ceccato-Antonini, 2022; Góes-Favoni et al., 2018).

No Brasil, a principal matéria-prima utilizada para a produção do etanol é a cana-de-açúcar. A cana-de-açúcar é composta predominantemente por água, que representa cerca de 80% de sua composição, enquanto os sólidos totais correspondem a aproximadamente 20%. Entre esses sólidos, destacam-se os açúcares, principalmente a sacarose (17%), seguida por pequenas quantidades de glicose (0,4%) e frutose (0,2%), além de pequenas quantidades de cinzas (Góes-Favoni et al., 2018). Os açúcares presentes no caldo da cana-de-açúcar são convertidos em etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esse microrganismo é o mais utilizado nos processos industriais por possuir uma alta tolerância ao etanol, uma alta produtividade e a habilidade de fermentar uma ampla gama de açúcares (Crccato-Antonini, 2022). Essa levedura é classificada como um organismo anaeróbio facultativo (Filho, 2021), capaz de se desenvolver tanto na presença quanto na ausência de oxigênio. Em condições aeróbicas, utiliza a respiração celular para oxidar açúcares, convertendo-os em dióxido de carbono e água, para a geração de energia. Já em condições anaeróbicas, altera seu metabolismo para a fermentação alcoólica, na qual açúcares, principalmente a glicose, são convertidos em etanol e dióxido de carbono, além de subprodutos como ácidos orgânicos e glicerol (Góes-Favoni et al., 2018).

A conversão da sacarose da cana-de-açúcar em etanol e dióxido de carbono ocorre por meio de uma sequência de 15 reações, cada uma sendo catalisada por uma enzima específica, como ilustrado na Figura 3. Inicialmente, a sacarose é hidrolisada em açúcares fermentescíveis pela ação da enzima invertase, produzida pela levedura *S. cerevisiae*, resultando na formação de glicose e frutose. Essa etapa é fundamental, pois apenas monossacarídeos podem ser diretamente metabolizados na via glicolítica, representada pela Equação 1:



Ao final das etapas metabólicas, a fermentação alcoólica pode ser representada pela seguinte estequiometria, representada pela Equação 2:



A partir da equação global apresentada, é possível determinar o rendimento teórico de produção de etanol para diferentes substratos fermentescíveis com base na estequiometria das

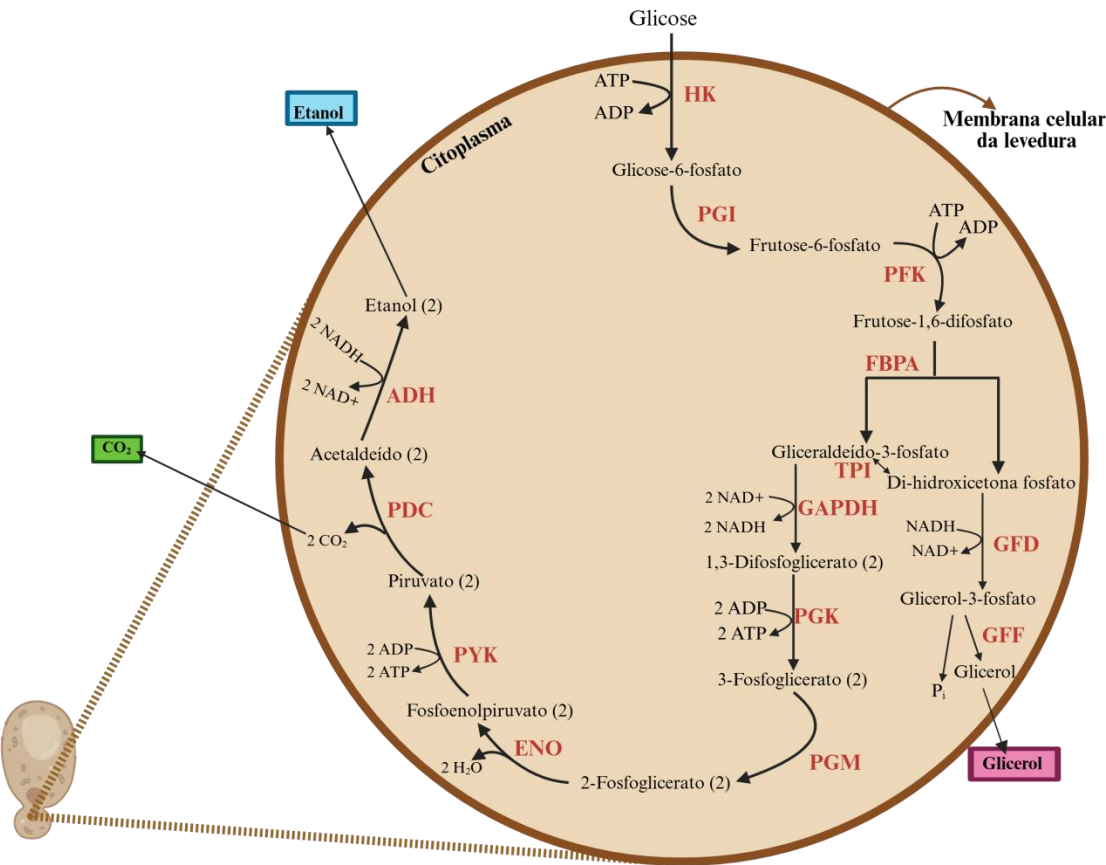
reações de hidrólise e fermentação. A Tabela 1 apresenta esses valores em percentual de massa (% m/m), correspondentes à massa teórica de etanol que pode ser obtida a partir de 100 kg de matéria-prima, considerando a conversão completa dos carboidratos em etanol e dióxido de carbono, sem considerar perdas inerentes ao processo industrial.

Tabela 1: Rendimento teórico de etanol absoluto (% m/m) obtido a partir de diferentes substratos fermentescíveis.

Matéria-prima	Rendimento teórico de etanol (% m/m)
Glicose, frutose, açúcar invertido	51,11
Sacarose, maltose	53,80
Amido	56,79

Fonte: Lima (2019). Adaptado.

Figura 3: Esquema representativo das etapas de conversão de açúcares a etanol, CO₂ e glicerol que ocorrem no citoplasma das células de leveduras.



Fonte: Acervo do autor e site BioRender, com base em Ceccato-Antonini (2022); Bai, Anderson, Moo-Young (2008). Abreviações: HK: hexoquinase, PGI: fosfoglicose isomerase, PFK: fosfofrutoquinase-1, FBPA: frutose bifosfato aldolase, TPI: triose fosfato isomerase,

GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, PGK: fosfoglicerato quinase, PGM: fosfoglicerato mutase, ENO: enolase, PYK: piruvato quinase, PDC: piruvato descarboxilase, ADH: álcool desidrogenase, GFD: Glicerol-3-fosfato desidrogenase, GFF: Glicerol-3-fosfato fosfatase.

4.2.2 Processo Produtivo do Etanol a Partir da Cana-de-açúcar

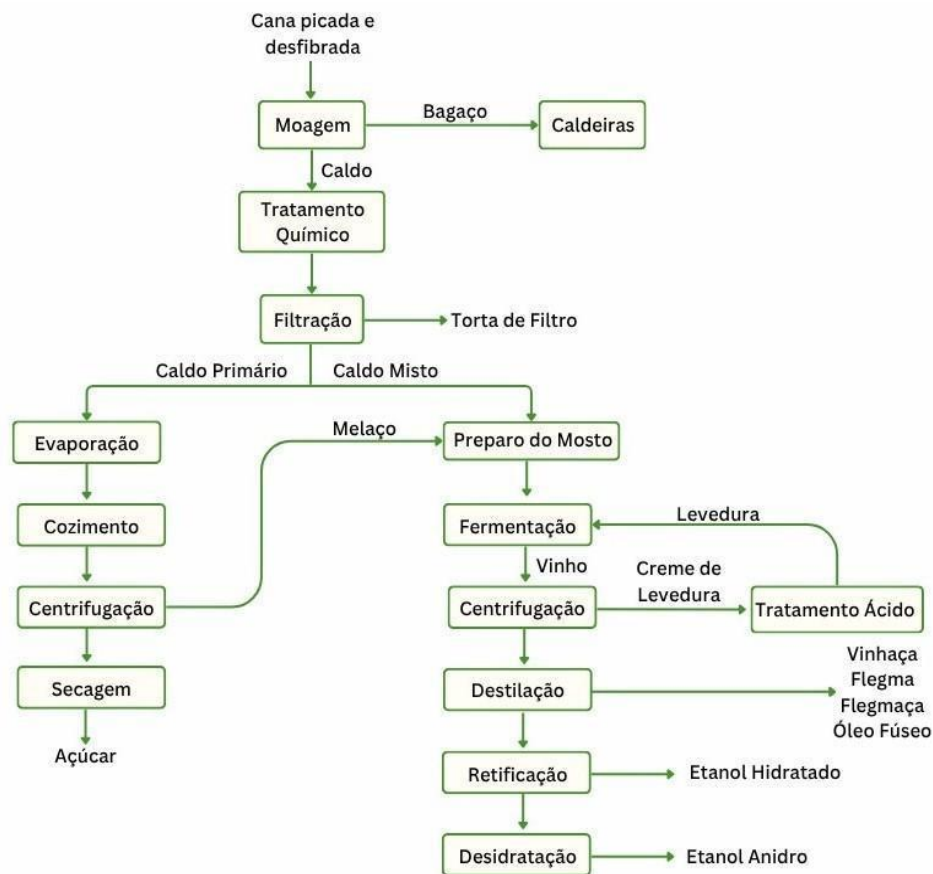
O processo de produção de etanol a partir da cana-de-açúcar inicia-se na moagem, que extrai o caldo rico em sacarose e separa o bagaço, utilizado como biomassa para a caldeira, contribuindo para a geração de vapor e energia elétrica, o que garante a autossuficiência energética da usina. Em seguida, o caldo passa por um tratamento químico com cal e aquecimento para ajuste de pH e remoção de impurezas, seguido de filtração, que gera a torta de filtro (aproveitada como fertilizante) e o caldo clarificado. A destinação dos fluxos pode variar conforme o planejamento industrial e condições de mercado (Dias et al., 2015).

Na etapa de fermentação, o caldo clarificado é conduzido às dornas de fermentação (tanques de fermentação), onde é misturado às leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Essas leveduras metabolizam os açúcares simples (glicose e frutose), formados pela hidrólise da sacarose através da ação da enzima invertase, convertendo em etanol e dióxido de carbono. O produto dessa fase, denominado vinho, é uma mistura que contém etanol, subprodutos da fermentação e leveduras em suspensão. Após a fermentação, o vinho passa por um processo de deleveduração, no qual as células de levedura são separadas e recicladas para uso em novos ciclos fermentativos (Raízen, 2022).

Em seguida, ocorre a destilação com o vinho delevedurado, etapa responsável pela separação do etanol e da água, baseada nas diferenças de volatilidade entre os compostos. O etanol obtido é então purificado na retificação, resultando no etanol hidratado, que apresenta teor alcoólico em torno de 92,6°INPM, de acordo com o Instituto Nacional de Pesos e Medidas (INPM), e é utilizado como combustível automotivo. Quando há necessidade de eliminar completamente a água presente no etanol hidratado, o produto passa por um processo de desidratação obtendo assim o etanol anidro, com teor alcoólico superior a 99,3% INPM, empregado na mistura com a gasolina. Por fim, o etanol produzido é direcionado para tanques de armazenamento, onde permanece até ser transportado, por caminhões, dutos ou ferrovias, às distribuidoras responsáveis pela sua comercialização. Todo esse processo é realizado de forma integrada ao sistema de produção de açúcar, garantindo o máximo aproveitamento da cana-de-açúcar (BNDES, 2008; Ceccato-Antonini, 2022).

A Figura 4 apresenta, de forma simplificada, as etapas do processo de produção integrada do açúcar e do etanol a partir da cana-de-açúcar, com destaque para a etapa de extração do caldo por moagem, método amplamente empregado na indústria sucroenergética para a separação entre a fração líquida açucarada e o bagaço.

Figura 4: Fluxograma representando o processo de produção do açúcar e etanol a partir da cana-de-açúcar.



Fonte: Acervo do autor, com base em BNDES (2008); Ceccato-Antonini (2022).

O monitoramento do processo de produção de etanol tem início já na avaliação da matéria-prima, etapa fundamental para assegurar o desempenho fermentativo (CTC, 2005; Francisco, 2025). Nessa fase, diversos parâmetros da cana-de-açúcar são determinados, incluindo o teor de sacarose no caldo (POL), a porcentagem em massa de sólidos solúveis presentes na solução de sacarose (Brix) e a relação entre sacarose e sólidos solúveis (Pureza, expressa como POL/Brix). Também são avaliadas as impurezas minerais solúveis, como terra e areia, além dos açúcares redutores (AR), representados principalmente por glicose e frutose, e dos açúcares redutores totais (ART). Outro parâmetro relevante é o açúcar total recuperável

(ATR), que corresponde à análise dos açúcares disponíveis para fermentação. O conteúdo de fibra da cana-de-açúcar também é mensurado, pois pode afetar a eficiência da moagem e a extração dos açúcares. Valores elevados de fibra reduzem o ATR, indicando menor disponibilidade de açúcares, o que influencia diretamente o pagamento da matéria-prima aos fornecedores (TECNAL, 2025).

Após essa etapa inicial, procede-se ao preparo do mosto, que é submetido a análises específicas para garantir que o meio ofereça condições adequadas ao metabolismo da levedura. Entre os parâmetros avaliados destacam-se novamente a POL e o Brix, além do pH, que indica a acidez do meio e auxilia no controle do crescimento microbiano e da atividade da levedura. A acidez total é monitorada em função dos ácidos formados no mosto, enquanto o ART fornece informações sobre a disponibilidade de açúcares fermentescíveis. Também são analisados o teor de impurezas, que inclui fibras, sais minerais e proteínas, e o conteúdo de cinzas, indicador da presença de materiais minerais ou resíduos inorgânicos (CTC, 2005; Francisco, 2025).

Durante a fermentação alcoólica, o controle operacional torna-se ainda mais rigoroso, uma vez que essa é a fase mais sensível do processo (CTC, 2005; Francisco, 2025). Nesse estágio, o monitoramento contínuo envolve parâmetros como açúcares redutores (AR), pH, densidade, acidez e teor de etanol produzido, expresso em porcentagem. O acompanhamento sistemático desses indicadores é essencial para garantir a eficiência da conversão dos açúcares em etanol e a estabilidade do processo fermentativo.

4.2.3 Modos de Classificação dos Processos da Fermentação Alcoólica

Os processos fermentativos podem ser classificados de acordo com a forma de alimentação dos substratos e a retirada do produto ao longo da operação. Entre os principais tipos utilizados na produção de etanol estão os sistemas descontínuo (ou em batelada), batelada alimentada e contínuo, que podem operar com ou sem recirculação de células (Lima, 2019).

No processo descontínuo, a levedura é adicionada ao mosto no início do ciclo fermentativo, e a reação prossegue até que a produção de etanol alcance o rendimento máximo, momento em que o processo é encerrado.

Entre esses processos, o processo de batelada alimentada com reciclo de leveduras, conhecido como método Melle-Boinot, é o mais empregado nas destilarias brasileiras (Ferrari, 2013). O método Melle-Boinot, foi patenteado em 1937 por Firmino Boinot da região de

Melle, na França (Ceccato-Antonini, 2017). Este método se inicia com a inoculação do pé-de-cuba nas dornas de fermentação ou com o envio do creme de levedura tratado com ácido para essas dornas. O pé-de-cuba consiste em uma mistura inicial de leveduras ativas com o mosto, utilizada para dar início a um novo ciclo fermentativo, já o creme de levedura tratado com ácido corresponde à biomassa reciclada e desinfetada, preparada para reutilização no processo. Em seguida, o mosto é adicionado aos poucos na dorna de alimentação a uma vazão controlada, evitando o estresse celular causado por choques osmóticos (Júnior, 2014). A exposição da levedura a choques osmóticos provoca uma permeabilização temporária da membrana plasmática, mas permite que sua estrutura e funcionalidade sejam preservadas ao término do processo (Júnior, 2014). O tempo médio de alimentação das dornas varia entre 4 e 5 horas, enquanto o período de finalização da dorna, conhecido como “morte”, pode durar de 4 a 7 horas. Ao final desse período, a fermentação é considerada concluída quando a maior parte dos açúcares fermentescíveis do mosto é consumida pelas leveduras, resultando na estabilização da produção de etanol e na obtenção de um vinho com teor alcoólico, geralmente, entre 7 e 10% (v/v) (Ceccato-Antonini, 2017).

Ao término da fermentação, o mosto fermentado, também conhecido como vinho é encaminhado às centrífugas para separação das células de leveduras e do vinho delevedurado, como resultado da centrifugação, um creme concentrado de leveduras com 60 a 70% ($m \cdot v^{-1}$) de células é obtido. O vinho delevedurado é direcionado às colunas de destilação, enquanto o creme de leveduras concentrado é encaminhado para a diluição com água e tratamento com ácido sulfúrico. Esse tratamento pode variar conforme a unidade produtora, mas geralmente consiste em uma diluição com água, na proporção de 1:1, seguida da adição de ácido sulfúrico até atingir um pH entre 1,8 e 2,5, por um período de uma hora e meia a três horas. Em seguida, esse creme concentrado de leveduras é utilizado para reiniciar a fermentação na dorna com um novo mosto (Lopes et al., 2016; Reis, 2011). A principal finalidade de fazer o tratamento ácido do fermento é reduzir a quantidade de contaminantes bacterianos e promover a desfloculação das células de levedura (Ceccato-Antonini, 2022).

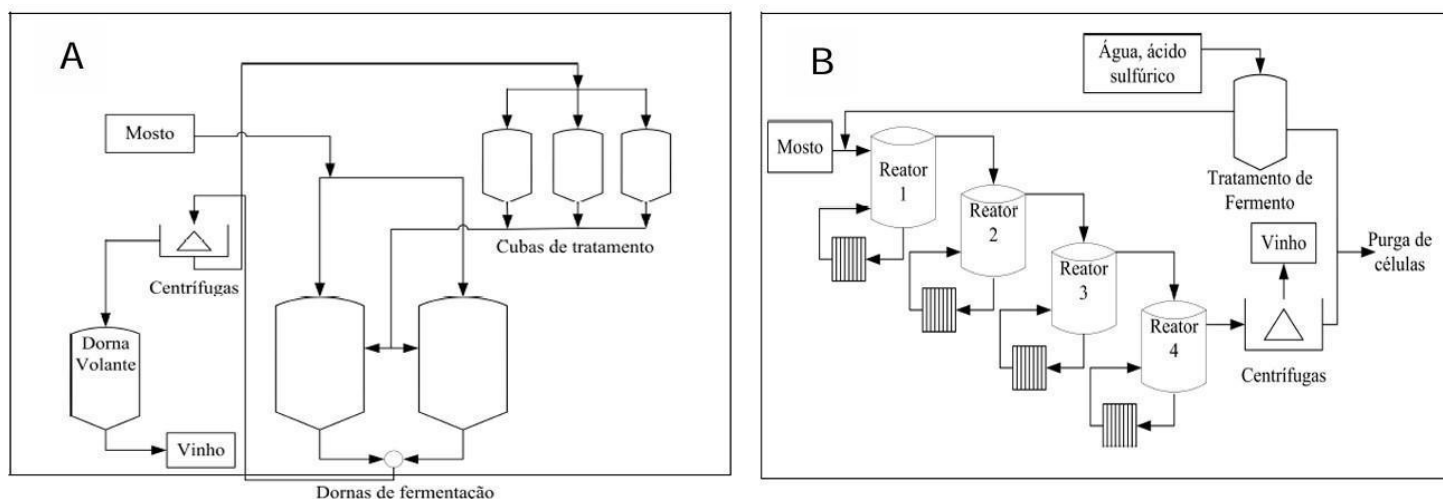
Por fim, o sistema contínuo de fermentação caracteriza-se por ser um processo realizado de forma ininterrupta, no qual o mosto é continuamente alimentado nas dornas de fermentação. Nesse modelo, o mosto inoculado na primeira dorna é parcialmente fermentado e, à medida que ocorre o transbordamento, é direcionado para a segunda dorna, que se mantém sempre cheia. Esse processo se repete sucessivamente até a última dorna, onde a fermentação é concluída e os açúcares residuais são totalmente consumidos (Reis, 2011).

Após essa etapa, o vinho fermentado é enviado para a centrifugação, o fermento separado é então submetido a um tratamento ácido. Em seguida, ele é recirculado para a primeira dorna, reiniciando o ciclo fermentativo juntamente com a nova alimentação de mosto.

Todas as dornas operam de forma simultânea, mantendo um fluxo contínuo de produção. No entanto, por se tratar de um sistema em operação contínuo, as dornas não podem ser lavadas com frequência, o que exige rigoroso controle microbiológico para evitar contaminações e manter a eficiência do processo (CNPEM, 2024).

O esquema simplificado dos processos de fermentação em batelada alimentada e em sistema contínuo é apresentado na Figura 5.

Figura 5: (A) Esquema simplificado do processo de fermentação Melle-Boinot (batelada alimentada). (B) Esquema do processo de fermentação contínua para produção de álcool.



Fonte: Reis (2011).

De acordo com Lopes et al. (2016), aproximadamente 83% das unidades produtoras de etanol no Brasil utilizam o sistema de batelada alimentada, enquanto cerca de 17% das unidades operam em regime contínuo. A predominância do processo em batelada alimentada decorre de suas vantagens operacionais, como maior controle das contaminações por bactérias e leveduras nativas, melhor rendimento fermentativo, regulação mais precisa do teor alcoólico e redução de choques osmóticos nas células de levedura. Além disso, esse sistema favorece a assepsia das dornas e proporciona maior flexibilidade operacional, fatores essenciais para assegurar a eficiência e a qualidade do processo industrial de fermentação alcoólica.

4.3 Fatores que Afetam a Fermentação Alcoólica

A eficiência da fermentação alcoólica depende de diversos fatores físicos, químicos e biológicos que influenciam diretamente o metabolismo das leveduras e, consequentemente, o rendimento em etanol. Entre os principais fatores estão a temperatura, o pH, a composição do mosto, estresse osmótico, concentração de etanol e as contaminações bacterianas (Ceccato-Antonini, 2022; Góes-Favoni et al., 2018).

A própria acumulação de etanol no meio fermentativo atua como fator inibitório para as células fermentadoras. Dorta et al. (2006) cita que a tolerância da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ao etanol é restritiva, sendo que concentrações acima de aproximadamente 10% ($\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$) já comprometem seu crescimento. Altas concentrações de etanol podem afetar o desempenho celular, levando à redução da viabilidade e da taxa de crescimento das células e, consequentemente, da eficiência do processo. Esse efeito ocorre porque o etanol consegue se inserir na bicamada fosfolipídica, principalmente na região hidrofóbica, ocupando espaços deixados pelas interações entre ácidos graxos insaturados e proteínas (Monteiro, 2016; Góes-Favoni et al., 2018).

A temperatura é também considerada um dos fatores mais importantes no controle da fermentação alcoólica, pois influencia diretamente a atividade enzimática e o metabolismo das leveduras. De modo geral, a faixa operacional normalmente empregada na produção de etanol situa-se entre 26 e 35°C, entretanto, a temperatura ideal depende da cepa de levedura utilizada e das condições do processo. Conforme Chieppe Júnior (2016), temperaturas muito elevadas podem enfraquecer as células de *Saccharomyces cerevisiae*, reduzindo seu crescimento e favorecendo o surgimento de microrganismos contaminantes, além de causar perdas de etanol por evaporação. Já em temperaturas muito baixas, abaixo de 27°C, a levedura apresenta uma redução tanto na taxa de crescimento quanto na produção de etanol. Durante o período de safra, em geral, entre os meses de abril e outubro/novembro, a temperatura ambiente tende a aumentar e, como a fermentação é um processo exotérmico, a temperatura nas dornas pode atingir valores próximos de 38°C, tornando necessário o uso de trocadores de calor para manter o sistema em equilíbrio térmico.

Entre os diversos parâmetros que influenciam a fermentação alcoólica, o pH se destaca por exercer forte impacto sobre a atividade metabólica das leveduras e o rendimento final em etanol. Conforme apontam Sousa e Monteiro (2012), a fermentação pode ocorrer em uma faixa ampla de pH, embora os valores ideais para o crescimento da levedura estejam entre 4,0 e 5,0. No entanto, nas condições industriais, o processo costuma iniciar em valores mais

baixos, entre 2,0 e 3,0, e encerrar entre 3,5 e 4,0. Essa acidez mais elevada é intencional, pois favorece a eficiência fermentativa, reduz a produção de subprodutos como o glicerol e dificulta o crescimento de contaminantes bacterianos (Sousa, Monteiro, 2012; Lima, 2019).

Apesar disso, níveis de pH excessivamente baixos, em torno de 2,0, podem comprometer o desempenho da levedura, já que facilitam a penetração de ácidos orgânicos não ionizados em seu interior, levando à inibição celular. Além disso, condições muito ácidas podem selecionar microrganismos resistentes, como bactérias e leveduras selvagens, o que afeta negativamente o rendimento do etanol (Dorta et al., 2006). Assim, o controle rigoroso do pH é fundamental para manter o equilíbrio entre o crescimento da levedura e a inibição de contaminantes.

O estresse osmótico se destaca como um dos principais limitantes do crescimento celular. Esse tipo de estresse ocorre quando há uma alta concentração de solutos no meio de cultivo, o que provoca a saída de água das células e leva à desidratação intracelular. Como consequência, a taxa de crescimento e a produtividade de etanol podem ser significativamente reduzidas, uma vez que os microrganismos direcionam parte de sua energia para mecanismos de adaptação osmótica, como a síntese de glicerol e outros solutos compatíveis (Júnior, 2014).

A composição do mosto exerce influência direta sobre o desenvolvimento de contaminantes durante o processo fermentativo, uma vez que o caldo de cana e o melaço, também conhecido como mel final, apresentam diferenças significativas em suas características químicas. O caldo de cana, por ser menos concentrado, com maior teor de água e menor quantidade de sais e compostos inibitórios, tende a favorecer o crescimento de bactérias lácticas e outros microrganismos presentes naturalmente na matéria-prima. Já o melaço, com alta concentração de açúcares, elevada osmolaridade e maior teor de minerais, cria um ambiente mais seletivo, favorecendo microrganismos osmófilos que são capazes de sobreviver em altas concentrações de açúcar, por exemplo, e, ao mesmo tempo, podendo causar estresse às leveduras devido à presença de compostos inibitórios. No entanto, quando utilizados em conjunto na preparação do mosto, o caldo e o melaço proporcionam um equilíbrio entre concentração de açúcares, disponibilidade de nutrientes e osmolaridade, criando um ambiente mais favorável ao desempenho fermentativo da levedura e menos propício à proliferação descontrolada de contaminantes (Amorim, Basso, Lopes, 2009; Tosetto, 2008).

A presença de determinados minerais no mosto pode exercer efeitos negativos sobre a multiplicação das leveduras e sobre o desempenho fermentativo, seja pela inibição de enzimas essenciais ao metabolismo celular, ou seja, pela alteração da permeabilidade das membranas

plasmáticas. Esses íons, quando presentes em concentrações acima do tolerado pela levedura, passam a atuar como fatores inibitórios, comprometendo a integridade celular e reduzindo a eficiência da conversão dos açúcares em etanol. Os fatores inibitórios podem ser vistos na Tabela 2.

Além dos minerais, outros compostos também podem exercer ação inibitória durante a fermentação, como ácidos orgânicos, compostos formados na caramelização térmica do melaço e substâncias provenientes da degradação da biomassa lignocelulósica. Esses compostos podem reduzir a viabilidade celular, desacelerar o crescimento da levedura ou induzir estresse fisiológico, criando um ambiente favorável ao surgimento de contaminações e diminuindo o rendimento fermentativo.

Esses fatores de estresse não apenas diminuem o desempenho dos microrganismos desejados, mas também podem criar condições favoráveis para a ocorrência de contaminações. A diminuição da atividade das leveduras abre espaço para o crescimento de microrganismos indesejáveis, como bactérias lácticas e fungos contaminantes, que competem por nutrientes e podem produzir subprodutos que inibem ainda mais a fermentação. Dessa forma, compreender e controlar esses fatores são essenciais, não apenas para otimizar a produtividade, mas também para reduzir o risco de contaminações.

Tabela 2: Principais compostos com potencial inibitório presente no mosto e seus efeitos na fermentação alcoólica.

Inibidor	Origem no Processo	Efeitos na Levedura/Fermentação
Ácidos orgânicos (lático, fórmico, acético), Furfural e HMF	Degradação térmica de açúcares e/ou atividade microbiana contaminante	Podem comprometer o desempenho fermentativo das leveduras, reduzindo a viabilidade celular e a eficiência da fermentação.
Compostos fenólicos	Presentes na matéria-prima vegetal, especialmente na cana-de-açúcar	Em elevadas concentrações, podem comprometer a integridade da parede e da membrana celular. Em menores concentrações, podem interferir na atividade de enzimas essenciais, reduzindo a eficiência fermentativa.
Alumínio (Al^{3+})	Corrosão de equipamentos e água utilizada no processo	Em pH ácido, pode assumir formas mais tóxicas, reduzindo a viabilidade celular e as taxas fermentativas.

Cálcio (Ca^{2+})	Natural do caldo e adicionado durante a clarificação com cal	Pode intensificar a floculação celular, especialmente na presença de bactérias contaminantes, comprometendo o desempenho fermentativo.
Potássio (K^+)	Natural do melaço	Em altas concentrações, pode afetar o metabolismo da levedura, reduzindo rendimento, viabilidade celular e níveis de trealose.
Sulfito (SO_2)	Gerado durante a sulfitação do caldo no processo de produção de açúcar	Pode prejudicar o metabolismo da levedura e reduzir a eficiência fermentativa, apresentando maior toxicidade em pH baixo.

Fonte: Acervo do autor, com base em Ceccato-Antonini (2022); Góes-Favoni et al. (2018); Tosetto (2008); Figueiredo, Santos (2000).

4.4 Contaminações Bacterianas no Processo Fermentativo

A presença de bactérias contaminantes representa um desafio recorrente em processos fermentativos de escala industrial, especialmente na produção de etanol combustível, onde as fermentações são conduzidas com predominância da levedura *S. cerevisiae* em condições não estéreis e de cultura pura (Bischoff et al., 2009). A contaminação bacteriana ocorre quando bactérias indesejadas se desenvolvem durante a fermentação alcoólica, competindo com a levedura *S. cerevisiae*, responsável por converter os açúcares presentes no caldo da cana-de-açúcar em etanol. Essas bactérias consomem os açúcares disponíveis e interferem no processo biológico trazendo efeitos prejudiciais à fermentação, como a floculação, a baixa viabilidade celular e, principalmente, a baixa produção de etanol (Ceccato-Antonini, 2017).

Nesse contexto, observa-se com frequência a presença de gêneros bacterianos como *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Clostridium* e *Leuconostoc* no caldo, os quais acentuam os prejuízos ao processo por produzirem diversos ácidos orgânicos, incluindo os ácidos butílico, acético, fórmico e lático (Prado, 2014).

As contaminações bacterianas no processo fermentativo podem atingir concentrações da ordem de 10^8 a 10^9 células/mL, sendo frequentemente identificadas pela presença elevada de subprodutos metabólicos, como ácidos orgânicos, especialmente ácidos lácticos e acéticos. Esses compostos comprometem o desempenho das leveduras, reduzem o crescimento celular e provocam queda no rendimento fermentativo (Bayrock, Ingledew, 2004). Além disso, tais

contaminações aumentam os custos operacionais, exigindo paradas para limpeza, desinfecção e ajustes no processo industrial. Em sistemas de grande escala, níveis bacterianos acima de 10^8 UFC/mL geralmente resultam em diminuição da eficiência, intensificação da floculação e necessidade de maior consumo de agentes como ácido sulfúrico e antibióticos para controle (Amorim, Basso, Lopes, 2009; Basso et al., 2014).

As bactérias presentes no ambiente de fermentação derivam, em grande parte, da própria cana-de-açúcar. Um estudo sobre a composição das comunidades bacterianas e fúngicas associadas às raízes, caules e folhas dessa planta revelou que a distribuição bacteriana está fortemente ligada ao órgão vegetal em que se encontram. Nas raízes, foram identificadas 89 famílias bacterianas, das quais 19 corresponderam a aproximadamente 44% da abundância relativa total (Souza et al., 2016).

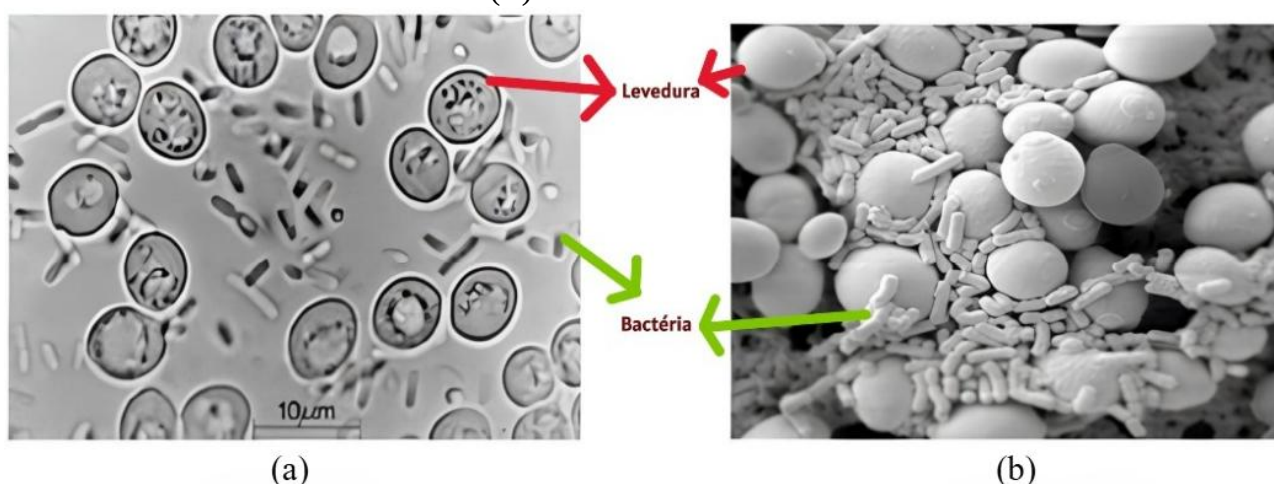
As bactérias produtoras de ácido láctico, são conhecidas como bactérias lácticas ou bactérias de ácido láctico (BAL) e representam o principal grupo responsável por prejuízos na fermentação alcoólica. Esses microrganismos são frequentemente relatados como contaminantes predominantes em usinas de etanol, com destaque especial para o gênero *Lactobacillus* (Lucena et al., 2010; Bonatelli et al., 2017). Esses microrganismos correspondem à maior parte das bactérias gram-positivas presentes no processo, sendo estimado que aproximadamente 98% das gram-positivas detectadas na fermentação sejam lácticas (Gallo, 1990; Bonatelli et al., 2017; Gomes, 2009).

De modo geral, essas bactérias apresentam características marcantes, como serem gram-positivas, anaeróbias facultativas, catalase negativas, citocromo e porfirinas ausentes, não esporuladas e possuem morfologia de cocos ou bastonetes. Quanto ao metabolismo da glicose, podem ser classificadas em homofermentativas, produtoras majoritárias de ácido láctico, e heterofermentativas, que formam ácido láctico acompanhado de CO₂, etanol, manitol e ácido acético (Ceccato-Antonini, 2022).

As bactérias lácticas são amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em alimentos como leite, plantas, queijos, iogurtes e bebidas lácteas, onde atuam de forma benéfica ao converter carboidratos em ácido láctico, contribuindo para características de conservação, sabor e textura (CAarr, Chill, Maida, 2002). Apesar dessa relevância industrial, esses microrganismos também podem causar prejuízos em determinados processos, como na produção de vinho e outras bebidas, elevando a acidez devido à formação de ácidos láctico e acético e interferindo na manutenção de leveduras viáveis, além de estarem associados a problemas como as cáries nos dentes, através da liberação de ácido e pela produção de glucana (Yokoya, Oliva-Neto, 1991; Ventura, 2007).

Os efeitos causados pela contaminação por esses microrganismos são variados, sendo a produção de ácidos orgânicos um dos principais. As bactérias *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus vini* estão entre as mais frequentemente associadas ao fenômeno da floculação, conforme pode ser visto na Figura 6 (Yokoya, Oliva-Neto, 1991). A floculação é um processo reversível e não sexual, no qual células, especialmente leveduras e algumas bactérias, passam a se agrupar, formando flocos que sedimentam mais rapidamente no ambiente fermentativo. Esse processo pode ser classificado como homotípico, quando ocorre entre células do mesmo tipo, como entre leveduras, ou heterotípico, quando envolve células de diferentes tipos, como leveduras e bactérias. No contexto da fermentação alcoólica, esse comportamento pode ser favorecido pela presença de determinadas bactérias, que produzem uma camada superficial rica em proteínas adesivas, conhecidas como floculinas, de caráter gelatinoso, que favorecem o contato e a união entre as células de levedura (Gomes, 2009; Yokoya, Oliva-Neto, 1991; Ventura, 2007). Embora o termo floculação seja amplamente utilizado, o mais adequado seria cofloculação, também denominado de agregação mútua ou floculação mútua. Isso porque o processo, na prática industrial, ocorre de forma heterotípica, envolvendo a interação e o agrupamento entre células de espécies diferentes, como as leveduras e as bactérias contaminantes (Ceccato-Antonini, 2022).

Figura 6: Leveduras e lactobacilos em suspensão. (A) durante a fermentação etanólica (B) em estado floculado.



Fonte: Ventura (2007). Adaptado.

Além de alterar a dinâmica celular no mosto, a presença desses aglomerados compromete o desempenho operacional do processo fermentativo, incluindo o prolongamento do tempo de fermentação. Isso ocorre tanto pela sedimentação prematura das leveduras no

fundo das dornas quanto pela redução da área efetiva de contato entre as células e o meio, diminuindo a eficiência da conversão dos açúcares em etanol (Gomes, 2009). Entre os fatores que podem afetar a floculação estão o pH, a temperatura, a presença de cálcio, a composição do mosto e o número de células de leveduras e bactérias.

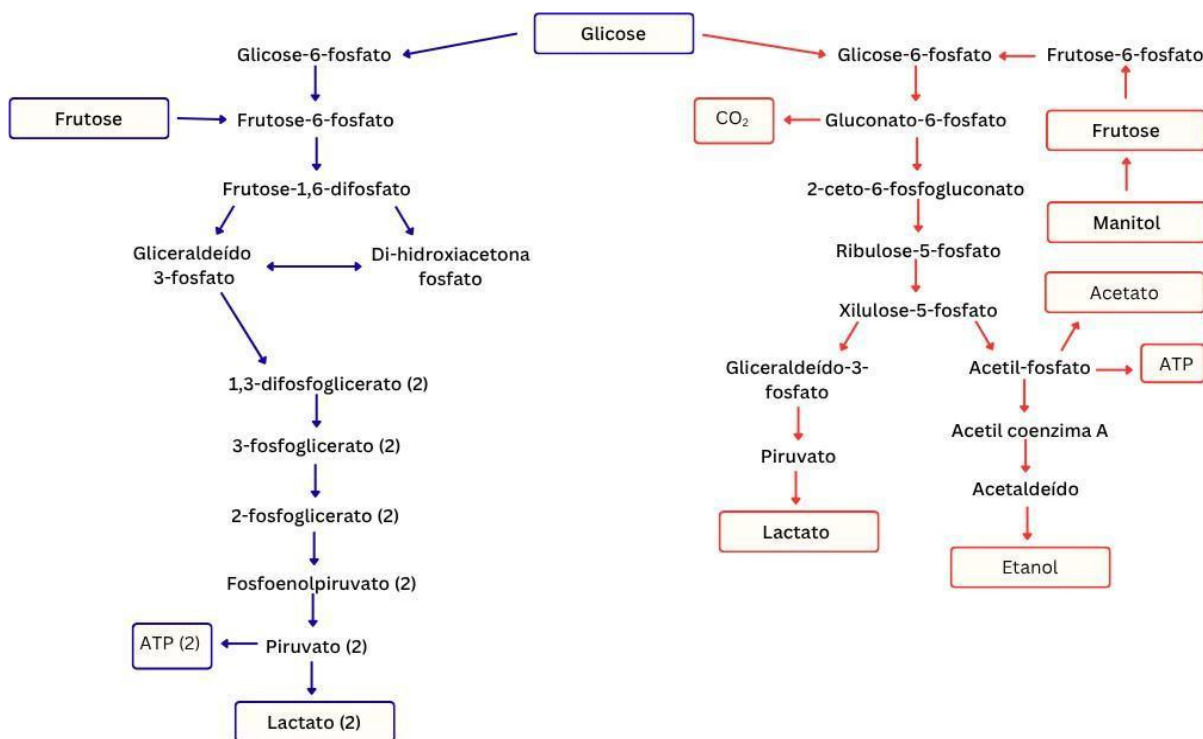
A desfloculação pode ocorrer em condições de pH mais ácido, especialmente em valores inferiores a 3,0, nos quais as interações responsáveis pela agregação celular são enfraquecidas. Por isso, o tratamento ácido aplicado durante o processo de produção de etanol auxilia na desagregação desses flocos. No entanto, quando as leveduras retornam ao ambiente fermentativo, a floculação tende a ocorrer novamente, e de forma rápida, devido ao aumento do pH e à restauração das condições que favorecem a adesão celular. Dessa forma, o tratamento ácido isolado não é suficiente, sendo necessário o emprego de outros métodos antimicrobianos para controlar efetivamente a formação de flocos e a contaminação associada (Ludwig, Oliva-Neto, Angelis, 2001; Souza, Mutton, 2004).

Como já mencionado acima, as bactérias lácticas podem utilizar diferentes rotas metabólicas para converter a glicose durante o processo fermentativo, sendo classificadas em homofermentativas e heterofermentativas, de acordo com os produtos finais gerados. As bactérias lácticas homofermentativas metabolizam as hexoses, como a glicose e a frutose, principalmente pela via Embden–Meyerhof–Parnas (EMP), uma rota metabólica que converte glicose em piruvato, gerando moléculas de ATP e NADH. Como a fermentação alcoólica ocorre em condições predominantemente anaeróbias, praticamente todo o açúcar é convertido em ácido láctico, com mínima formação de subprodutos. Basicamente nesta rota metabólica, 1 mol de hexose é convertido em 2 moles de ácido láctico (lactato) e 2 moles de ATP. Esse processo envolve a clivagem da frutose-1,6-difosfato em duas trioses de três carbonos, que são posteriormente transformadas em duas moléculas de lactato (Figura 7).

Por outro lado, as bactérias lácticas heterofermentativas fazem uso da via fosfocetolase, associada ao metabolismo das pentoses fosfato, produzindo múltiplos compostos a partir da mesma molécula de hexose. Nesse tipo de fermentação, o açúcar é degradado gerando ácido láctico, ácido acético ou etanol, além de manitol, ATP e CO₂. Nessa rota metabólica, as bactérias oxidam a glicose-6-fosfato em gluconato-6-fosfato, que sofre descarboxilação e posteriormente desdobramento da xilulose-5-fosfato em duas moléculas, sendo o gliceraldeído-3-fosfato (3C) e o acetil-fosfato (2C). O gliceraldeído-3-fosfato é convertido a piruvato e depois a lactato, enquanto o acetil-fosfato pode seguir por duas rotas distintas, uma dando origem ao acetato, produzindo uma molécula de ATP adicional, e a outra em etanol. As bactérias heterofermentativas seguem uma rota metabólica que resulta na formação de NADH

excedente. Uma das formas de regenerar esse cofator é pela redução da frutose e manitol, um poliálcool cuja presença pode ser utilizada como indicativo de contaminação por bactérias lácticas (Figura 7).

Figura 7: Metabolismo das bactérias lácticas homofermentativas (Azul) e heterofermentativas (Vermelho).



HOMOFERMENTATIVA

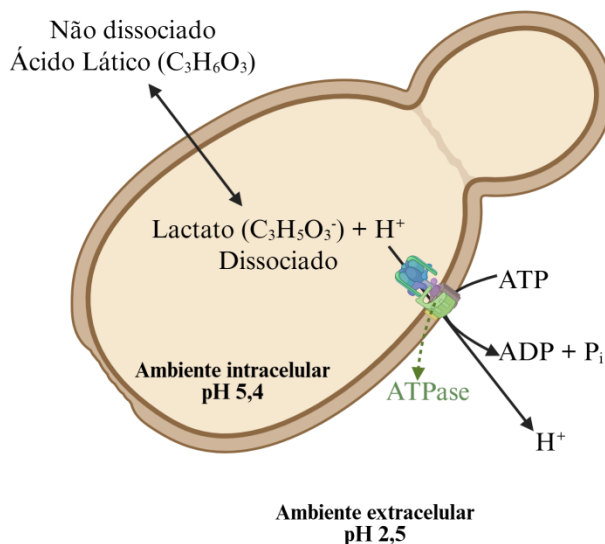
HETEROFERMENTATIVA

Fonte: Ceccato-Antonini (2022) e Ventura (2007). Adaptado.

Os ácidos acético e lático possuem caráter de ácidos fracos, apresentando pKa de 4,76 e 3,86, respectivamente, o que faz com que, em condições de pH reduzido, predominem na forma não dissociada. Nessa conformação, eles atravessam a membrana plasmática das leveduras e alcançam o citoplasma, onde o pH mais próximo da neutralidade promove sua dissociação em prótons e ânions orgânicos. Esse acúmulo de íons no interior celular reduz o pH citosólico e interfere em processos fundamentais, como a atividade enzimática e a síntese de DNA e RNA (Milanez, Souza, Mancuso, 2017; Ceccato-Antonini, 2022; Ventura, 2007). Segundo Ceccato-Antonini (2022), o pH intracelular deve se manter constante, sendo assim,

ocorre o transporte dos prótons através da membrana por meio da atividade da ATPase, elevando o consumo de ATP e comprometendo o metabolismo fermentativo (Figura 8).

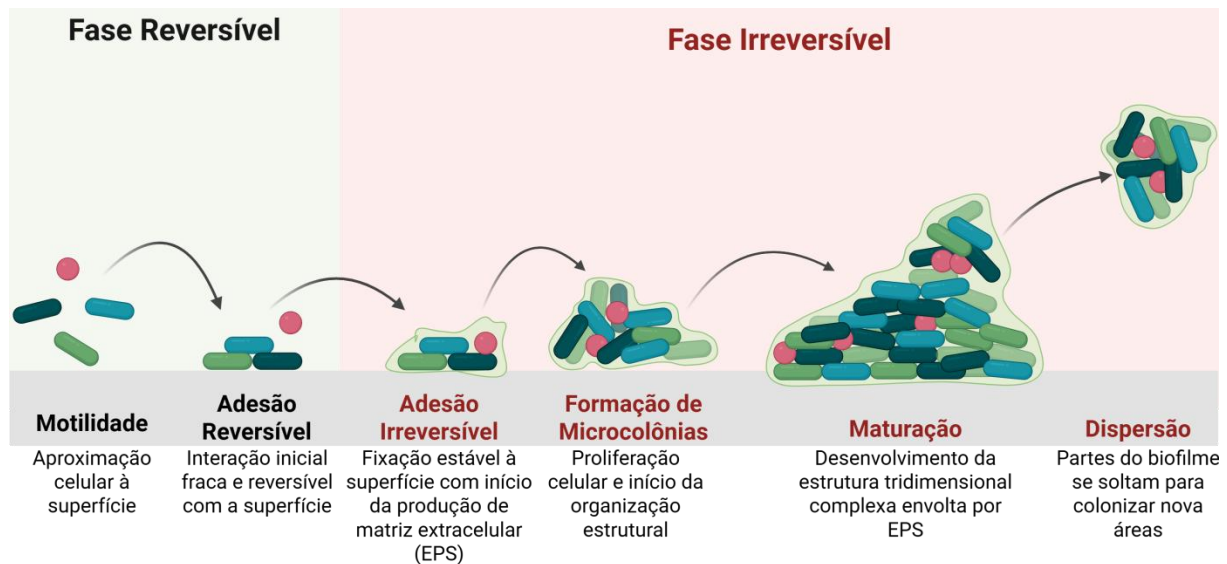
Figura 8: Representação do transporte de ácido láctico do ambiente extracelular para o interior da levedura, onde ocorre sua dissociação em íon lactato.



Fonte: Ventura (2007). Adaptado

No ambiente industrial, espécies dos gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus* são frequentemente relatadas, incluindo *B. coagulans*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *B. stearothermophilus*, *L. plantarum*, *L. animalis* e *L. buchneri*. A elevada incidência dessas bactérias e seu antagonismo sobre as leveduras contribuem diretamente para a queda de rendimento fermentativo, como discutido por Gallo (1990). Essas bactérias podem aparecer em diferentes partes do processo, desde a lavoura com a matéria-prima até os equipamentos como as esteiras, tubulações, em tanques de sacarificação, em dornas, na água utilizada nos processos e, principalmente, no mosto. Isto é possível porque esses microrganismos podem formar biofilmes, que são comunidades microbianas aderidas a superfícies e envoltas em uma matriz de polímeros extracelulares (EPS) que elas mesmas produzem (Figura 9). Essa estrutura protege os microrganismos contra condições adversas, como variações de temperatura, pH e presença de agentes antimicrobianos, tornando-os mais resistentes e dificultando a sua remoção durante a higienização do equipamento. Além disso, a presença de biofilmes pode levar à contaminação persistente, já que são continuamente reintroduzidas no processo, comprometendo a eficiência da fermentação e a qualidade do produto final (Dellas et al., 2018; Khatibi et al., 2014).

Figura 9: Etapas da formação de biofilme microbiano.



Fonte: Acervo do autor e site BioRender, com base em USP (s.d.), 2026.

4.5 Métodos Convencionais de Detecção e Monitoramento Microbiológico

A detecção rápida e precisa de contaminações microbianas é essencial para garantir a eficiência do processo fermentativo e evitar perdas na produção de etanol. Como a fermentação ocorre em ambiente não estéril, a identificação de microrganismos indesejáveis, sejam bactérias ou leveduras não-*Saccharomyces*, permite intervenções rápidas, prevenindo queda no rendimento, floculação e alteração no perfil fisiológico da levedura industrial (Bonatelli, Ienczak, Labate, 2019).

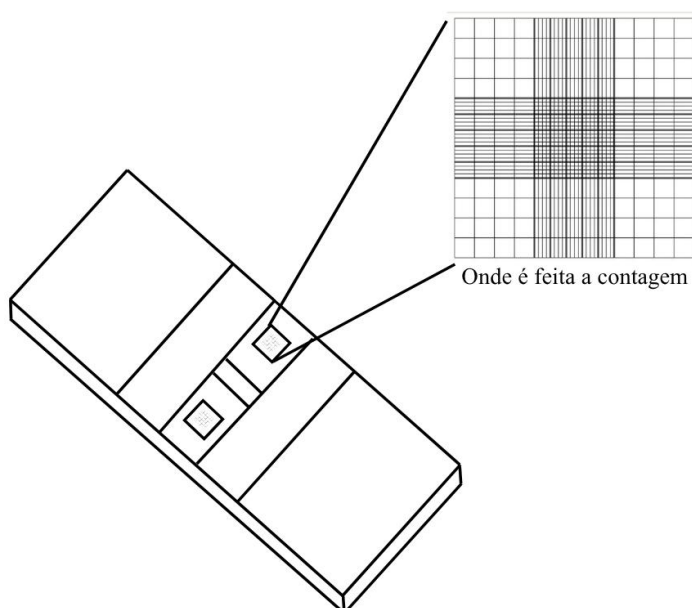
No contexto industrial, o monitoramento microbiológico da fermentação é realizado por diferentes metodologias, que variam desde técnicas simples e de baixo custo até abordagens mais rápidas e sensíveis (Santos, 2022). Entre elas, destacam-se os métodos convencionais de análise, amplamente utilizados nas usinas por sua rapidez, praticidade e aplicabilidade na rotina operacional. Apesar de apresentarem limitações quanto à qualidade e à sensibilidade em algumas situações, essas técnicas continuam sendo ferramentas relevantes para a triagem microbiológica, a avaliação do estado fisiológico da levedura e a identificação de sinais diretos ou indiretos de contaminação bacteriana, contribuindo para um maior controle da fermentação e para a eficiência da produção de etanol.

Entre os métodos mais empregados, destaca-se a contagem direta ao microscópio, amplamente utilizada na avaliação da viabilidade celular da levedura. Essa técnica permite não apenas estimar a população de *S. cerevisiae*, mas também observar simultaneamente a

presença de células bacterianas e fúngicas, eventos de floculação, presença de brotamentos e a carga microbiana total da amostra (Santos, 2022).

Quando associada ao uso de corantes, como azul de metileno ou eritrosina B, em câmara de Neubauer (Figura 10), a contagem microscópica se torna ainda mais informativa, uma vez que possibilita distinguir células viáveis e não-viáveis (Bortoli et al., 2013). Esse recurso fornece informações relevantes sobre o estado fisiológico da levedura e o impacto do ambiente fermentativo sobre sua atividade metabólica. Além disso, a presença de células em brotamento pode ser incluída na avaliação da viabilidade celular, enquanto a observação de bastonetes pode indicar, de forma rápida, aumentos na contaminação bacteriana ao longo da fermentação.

Figura 10: Câmara de Neubauer.



Fonte: Santos (2022). Adaptado.

Para complementar as análises microscópicas, o controle da contaminação no processo fermentativo também pode ser realizado por meio do monitoramento da concentração de ácido láctico, utilizando-se um lactímetro (Figura 11), o que auxilia no acompanhamento global das condições da fermentação (Raízen, 2020). Em muitas situações, o aumento da acidez está associado à atividade metabólica de bactérias contaminantes, especialmente as bactérias lácticas, que produzem ácidos orgânicos como subprodutos de seu crescimento.

Figura 11: Equipamento lactímetro.

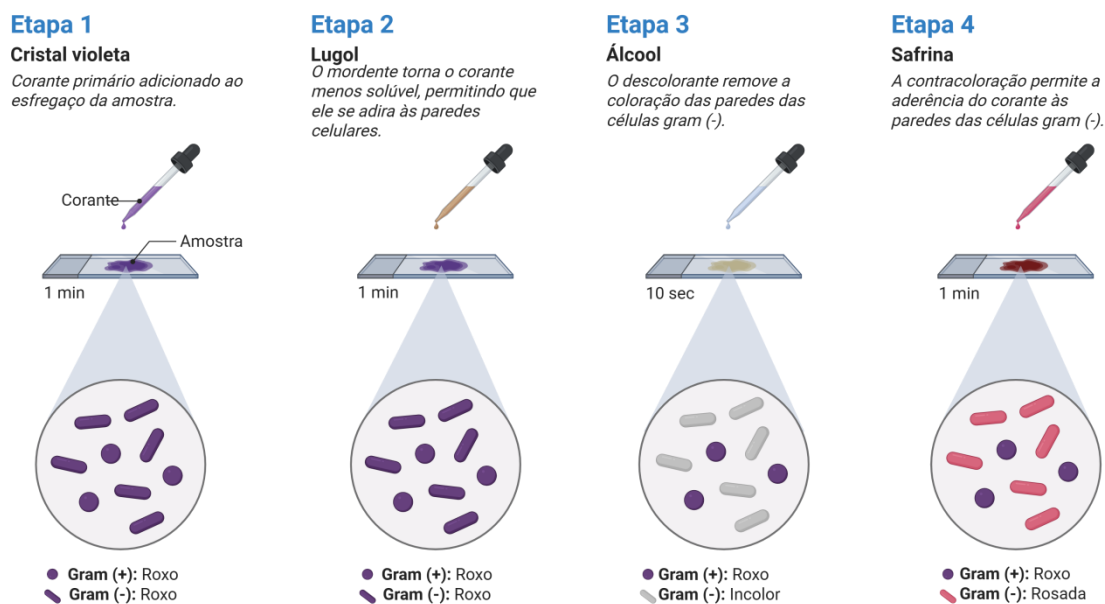


Fonte: HMGDIRECT (2026).

Nesse contexto, a análise por lactímetro pode ser utilizada como um parâmetro operacional indireto no monitoramento da contaminação durante o processo fermentativo. Ainda que não possibilite a identificação específica do microrganismo presente, essa técnica permite inferir alterações no equilíbrio fermentativo a partir do aumento da concentração de ácido láctico, atuando como um indicativo complementar da intensificação da atividade bacteriana. Entre suas principais vantagens destacam-se a rapidez, a simplicidade e a facilidade de aplicação, características que favorecem seu uso no monitoramento de rotina e na identificação precoce de desvios no comportamento da fermentação. Entretanto, essa abordagem apresenta limitações quanto à precisão analítica, visto que o lactímetro foi originalmente desenvolvido para a determinação de lactato em sangue humano, e não para a quantificação de ácido láctico em amostras provenientes do processo fermentativo da produção de etanol (Francisco, 2025).

Os contaminantes bacterianos encontrados durante a fermentação podem ser classificados, de acordo com a coloração de Gram, em espécies Gram-positivas ou Gram-negativas. No contexto da fermentação alcoólica, essa técnica apresenta utilidade especialmente na triagem preliminar de contaminantes, uma vez que muitas bactérias associadas ao processo, como as bactérias lácticas, pertencem ao grupo das Gram-positivas (Carr, Chill, Maida, 2002). Dessa forma, a coloração de Gram pode auxiliar na interpretação inicial do perfil microbiológico da amostra e direcionar análises complementares.

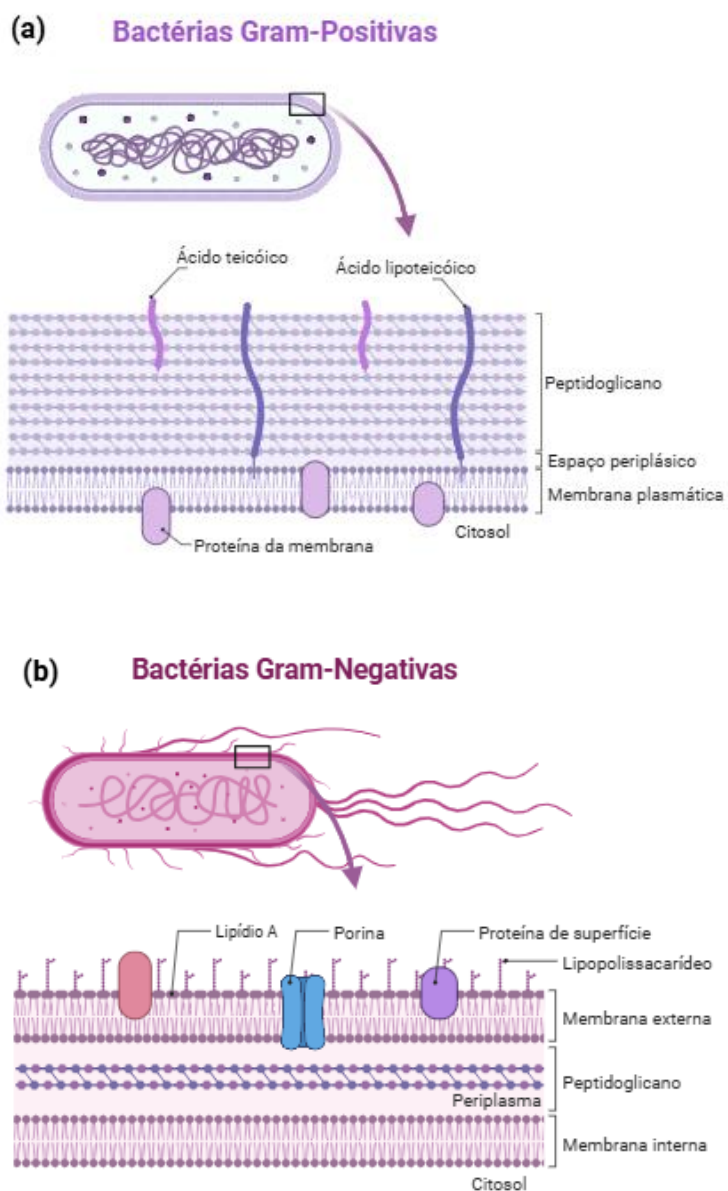
Figura 12: Esquema do procedimento da coloração de Gram.



Fonte: Acervo do autor e site BioRender, 2025.

As bactérias Gram-positivas possuem uma parede celular espessa composta principalmente por peptidoglicano, devido a essa característica, durante a coloração de Gram, as bactérias Gram-positivas retêm o corante cristal violeta, adquirindo uma coloração roxa (Figura 13 (A)). Por outro lado, as bactérias Gram-negativas possuem uma camada de peptidoglicano mais fina na parede celular, além de uma membrana externa composta principalmente por lipopolissacarídeo (LPS). Devido a essa fina camada de peptidoglicano, essas bactérias não conseguem reter o corante cristal violeta após a lavagem com etanol e, quando submetidas à contracoloração com safranina ou fucsina, adquirem coloração rosada (Figura 13 (B)) (Connolly, 1999).

Figura 13: Estrutura da parede celular das bactérias (A) Gram-positivas e (B) Gram-negativas.

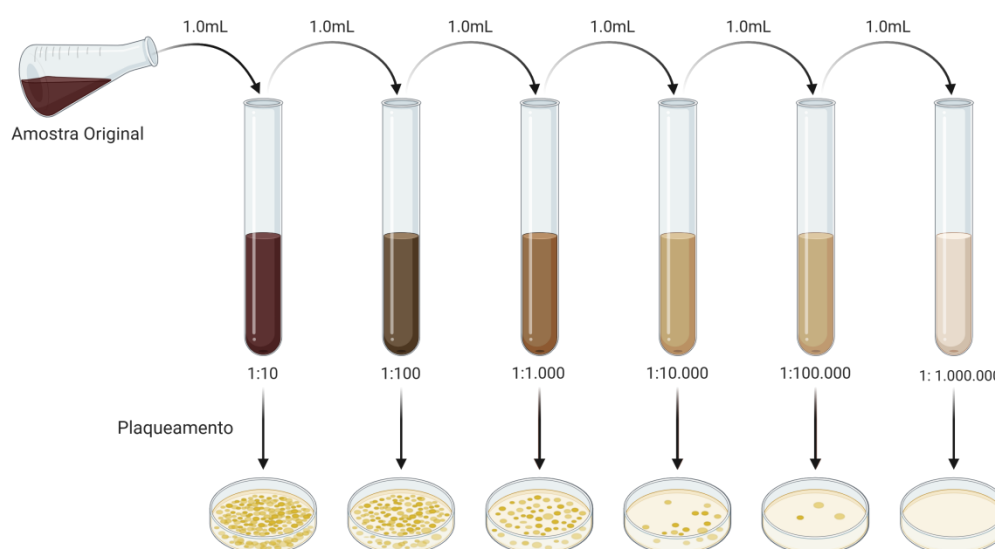


Fonte: Reis (2011). Adaptado.

O plaqueamento em meios de cultura também é amplamente utilizado como método convencional de monitoramento microbiológico por possibilitar o isolamento e a quantificação de microrganismos viáveis presentes na amostra. Essa técnica baseia-se no princípio de que cada colônia formada corresponde a uma unidade formadora de colônia (UFC), originada de uma célula viável ou de um agrupamento celular (Vieira, Fernandes, 2012). Para a determinação da UFC, a amostra é submetida a diluições seriadas, e alíquotas de cada diluição são semeadas em placas contendo meio de cultura adequado (Figura 14). Após a

incubação, as colônias desenvolvidas são contadas, permitindo estimar o número de células viáveis presentes no volume inicial analisado (Santos, 2022). Embora apresente maior qualidade em relação à microscopia direta, especialmente quando associados aos meios seletivos ou diferenciais, o plaqueamento demanda maior tempo de análise, o que pode restringir sua aplicação em decisões imediatas no contexto industrial.

Figura 14: Esquema do procedimento da diluição seriada e plaqueamento.



Fonte: Acervo do autor e site BioRender, 2026.

Apesar da ampla aplicação, os métodos convencionais apresentam vantagens e desvantagens. Entre as principais vantagens desses métodos destacam-se o baixo custo, a rapidez, a praticidade e a ampla aplicabilidade no ambiente industrial. Entretanto, sua execução manual pode introduzir variações analíticas e tornar os resultados mais suscetíveis a erros operacionais. Além disso, a técnica apresenta limitações relacionadas à baixa confiabilidade estatística das estimativas de concentração celular, devido ao número reduzido de células avaliadas por análise, bem como à influência de fatores associados à coleta, preparação e processamento das amostras, que podem comprometer a reprodutibilidade dos resultados (Belini et al., 2017; Santos, 2022).

Ainda assim, esses métodos permanecem altamente relevantes no setor sucroenergético, especialmente por possibilitarem a detecção rápida de desvios fermentativos e favorecerem a adoção de intervenções operacionais precoces. Quando analisados em conjunto com parâmetros do processo, como a redução da viabilidade celular, o aumento da acidez, a ocorrência de floculação e a diminuição do rendimento fermentativo, tornam-se

ferramentas fundamentais para o controle microbiológico e para a identificação de possíveis falhas nos procedimentos de higienização. Ademais, a recorrência desses desvios pode indicar problemas estruturais, como o acúmulo de resíduos orgânicos ou a formação de biofilmes em equipamentos e tubulações, evidenciando a importância da implementação de estratégias preventivas de sanitização, como o sistema CIP (*Cleaning-in-Place* ou, em português, Limpeza no Local), no controle da contaminação ao longo do processo fermentativo.

4.6 Métodos de Controle de Contaminações Bacterianas

Conforme discutido anteriormente no tópico 3.2.3 - Modos de Classificação dos Processos da Fermentação Alcoólica, o controle das bactérias contaminantes é realizado principalmente durante o tratamento do fermento entre os ciclos fermentativos. Esse tratamento constitui um dos métodos convencionais mais importantes para reduzir a carga microbiana antes de reutilizar a levedura no processo. Nesse contexto, diferentes abordagens podem ser empregadas, incluindo o tratamento ácido, o uso de antibióticos e a adoção de sistemas de higienização industrial, como o CIP.

4.6.1 Tratamento Ácido

Entre os procedimentos tradicionalmente empregados, destaca-se o uso de ácido sulfúrico, que atua como agente bactericida ao promover a redução do pH e causar estresse celular nas bactérias presentes no creme de levedura (Gallo, 1990). Esse tratamento é amplamente utilizado na indústria sucroenergética como etapa de controle microbiológico entre os ciclos fermentativos, uma vez que apresenta maior efeito sobre as bactérias do que sobre as células de levedura. No entanto, quando submetidas a condições mais severas de acidez, as células de levedura podem ter sua atividade reduzida ou até mesmo sofrer morte celular (Amorim et al. 2011).

Apesar da sua eficácia na redução da carga bacteriana, o tratamento ácido apresenta limitações, uma vez que sua ação é predominantemente temporária e não atua diretamente na eliminação das fontes de contaminação ao longo do processo (Amorim et al. 2011). Além disso, sua aplicação pode selecionar microrganismos mais tolerantes ao estresse ácido e impactar negativamente a viabilidade da levedura, influenciando o desempenho fermentativo.

4.6.2 Antibióticos

Além da acidificação, o uso de antibióticos também é empregado como estratégia de controle microbiológico. Os antibióticos são compostos de origem natural ou sintética, produzidos por microrganismos como fungos e bactérias, que apresentam atividade

bactericida (Prado, 2014). Em processos fermentativos, os antibióticos são utilizados desde a década de 1940, com o uso da tirotricina e da polimixina B (Ceccato-Antonini, 2022). Os antibióticos são aplicados, de forma geral, durante a etapa de fermentação, diretamente nas dornas, quando a contaminação bacteriana atinge níveis capazes de comprometer o desempenho do processo fermentativo. Atualmente, essa abordagem é direcionada principalmente ao controle de bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*, que interferem diretamente na fermentação alcoólica (Ceccato-Antonini, 2022).

Os antibióticos empregados são geralmente moléculas de espectro restrito, desenvolvidas para atuar principalmente contra bactérias Gram-positivas, que são predominantes nesse tipo de contaminação. Entre os mais utilizados encontram-se as penicilinas, tetraciclina, virginiamicina, monensina e estreptomicina. No caso da penicilina, sua aplicação requer concentrações mais elevadas, devido a sua instabilidade em condições de pH abaixo de 5,0 e é inativa à temperatura de 35°C, condições essas que ocorrem com frequência no processo de fermentação, além de ser considerada a mais vantajosa economicamente (Bregagnoli, 2006).

Esses compostos atuam inibindo processos essenciais ao metabolismo bacteriano, como a síntese de parede celular, síntese proteica ou transporte de íons (Prado, 2014). Quando aplicados adequadamente, pode reduzir de forma rápida a população bacteriana, contribuindo para a manutenção da estabilidade do processo fermentativo.

Embora sejam eficientes, os antibióticos apresentam limitações importantes. Seu uso contínuo favorece o surgimento de cepas bacterianas resistentes, reduzindo gradualmente a eficácia do tratamento e exigindo doses cada vez maiores. Além disso, resíduos desses compostos podem permanecer na biomassa de levedura destinada à alimentação animal, contribuindo para a disseminação de resistência antimicrobiana. Esse fenômeno representa um problema de saúde pública, uma vez que já foram identificados casos de pessoas com níveis elevados de resistência a diversos antibióticos (Prado, 2014). Por essas razões, o uso de antibióticos vem sendo gradualmente substituído ou complementado por estratégias mais seguras e sustentáveis, como o controle de pH, o tratamento ácido e, principalmente, a adoção de sistemas de higienização industrial, como o CIP, que atuam de forma preventiva na redução das fontes de contaminação ao longo do processo fermentativo.

4.6.3 Sistema CIP (*Cleaning-in-Place*)

4.6.3.1 Conceito e Importância do Sistema CIP

O sistema CIP (*Cleaning-in-Place* ou, em português, Limpeza no Local) consiste em um conjunto de procedimentos de limpeza e higienização realizados sem a necessidade de desmontagem dos equipamentos e com pouca ou nenhuma intervenção manual dos operadores, sendo amplamente utilizado nas indústrias de alimentos, bebidas e bioprocessos, incluindo usinas de etanol. Seu principal objetivo é promover a remoção de incrustações, resíduos orgânicos e inorgânicos e microrganismos das superfícies internas de tanques, tubulações, trocadores de calor e demais linhas de processo, garantindo a segurança microbiológica e a eficiência operacional. Quando adequadamente aplicado, o CIP possibilita elevada redução da carga microbiana, além da eliminação de resíduos de agentes de limpeza, contribuindo para a estabilidade do processo fermentativo (Thomas, Sathian, 2014; Yang, 2018).

Nesse contexto, o sistema CIP apresenta papel fundamental na prevenção da formação de biofilmes, estruturas que dificultam a ação de sanitizantes (Thomas, Sathian, 2014). Ao atuar diretamente na remoção de resíduos aderidos às superfícies, o CIP reduz a disponibilidade de substratos para a fixação microbiana, interrompendo etapas iniciais da formação de biofilmes e contribuindo para o controle microbiológico de forma preventiva.

Historicamente, os primeiros sistemas CIP aplicados na indústria de alimentos tiveram origem na década de 1940, sendo aplicado em sistemas de ordenha por tubulação, e eram baseados em ciclos com múltiplas etapas químicas (Seiberling, 2007). Até a década de 1970, o processo CIP era composto por três fases químicas principais, sendo uma etapa alcalina, seguida por uma etapa ácida e, por fim, uma nova etapa alcalina, intercaladas por etapas de enxágue destinadas à remoção de resíduos de produto e agentes de limpeza. Posteriormente, com o objetivo de reduzir o tempo de processo e o consumo de insumos, a etapa alcalina final deixou de ser aplicada com frequência, tornando o processo mais eficiente em termos de tempo e recursos (Van Asselt et al., 2025).

A partir da década de 1980, foi observado o desenvolvimento de formulações químicas mais complexas, permitindo a adoção de sistemas de limpeza monofásicos baseados em detergentes formulados. Essas soluções, embora mais eficientes em determinadas aplicações, apresentam custo mais elevado quando comparadas ao uso de agentes químicos convencionais, como soluções de hidróxido de sódio e ácidos minerais (Van Asselt et al., 2025).

4.6.3.2 Etapas do Processo de Limpeza e Agentes Químicos Utilizados no Sistema CIP

Embora os protocolos possam variar entre as unidades industriais, um ciclo típico de CIP envolve uma sequência de etapas interdependentes. Inicialmente, realiza-se o pré-enxágue com água, geralmente aquecida, com a finalidade de remover resíduos solúveis e preparar as superfícies para as etapas subsequentes. Em seguida, realiza-se a limpeza com detergentes alcalinos, sendo o hidróxido de sódio (NaOH) o agente mais utilizado, devido ao seu baixo custo e alta eficiência na solubilização de compostos orgânicos, como açúcares caramelizados, proteínas, carboidratos, lipídios e outros materiais aderidos às superfícies, ele é complementado com aditivos para aumentar a sua capacidade de remoção de incrustações (Bremer, Seale, 2009; Thomas, Sathian, 2014; Yang, 2018). Em alguns casos, agentes sequestrantes, como o EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético), são incorporados às soluções alcalinas para complexar íons metálicos, como o cálcio e o magnésio, potencializando a remoção de incrustações minerais e permitindo a remoção simultânea de resíduos orgânicos e inorgânicos (Muthuraman, Palmer, Flint, 2025a). No entanto, observa-se uma tendência crescente à restrição do uso de certos compostos, incluindo o EDTA e alguns surfactantes, devido a potenciais impactos ambientais e riscos associados à sua persistência, ou seja, à capacidade desses compostos de permanecerem no ambiente por longos períodos sem degradação significativa, além da sua toxicidade. De forma complementar, os surfactantes podem ser incorporados a formulações alcalinas e ácidas, com o objetivo de evitar a formação de espumas. Os surfactantes são adicionados especialmente em aplicações envolvendo membranas, por aumentarem a solubilização de compostos hidrofóbicos e facilitarem a remoção de incrustações e bioincrustações das superfícies (Van Asselt et al., 2025; Rajendran et al., 2025).

Após a etapa de limpeza alcalina, realiza-se o primeiro enxágue intermediário com o objetivo de remover os resíduos da solução de limpeza alcalina e evitar reações de neutralização com os agentes utilizados na etapa de limpeza ácida. Na sequência, procede-se à limpeza com detergentes ácidos, geralmente com ácido cítrico, fosfórico ou nítrico, cuja função principal é a remoção de incrustações minerais, como depósitos de cálcio e magnésio, além de remover quaisquer vestígios de resíduos alcalinos da superfície dos equipamentos. Em alguns casos, ácidos mais fortes, como o sulfúrico e o clorídrico, podem ser utilizados de forma pontual, conforme a necessidade do processo (Thomas, Sathian, 2014; Yang, 2018).

Após a etapa de limpeza ácida, ocorre um segundo enxágue intermediário com o objetivo de remover os resíduos da solução de limpeza ácida e evitar reações indesejadas com

os agentes utilizados na etapa seguinte. Em seguida, realiza-se a etapa de sanitização, considerada uma etapa opcional, sendo aplicada quando há necessidade de um ambiente estéril ou asséptico para os processos subsequentes (Yang, 2018). O principal objetivo é a redução da carga microbiana a níveis seguros, sendo comumente realizada com soluções oxidantes, como hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio, ozônio ou ácido peracético, e soluções não oxidantes à base de surfactantes (Tamime, 2009). Entre esses, o hipoclorito de sódio se destaca por sua ampla ação antimicrobiana, no entanto, seu uso deve ser cuidadosamente controlado devido ao seu potencial corrosivo e a sua toxicidade (Thomas, Sathian, 2014). Já compostos como o ácido peracético e o peróxido de hidrogênio apresentam vantagens adicionais, como menor formação de resíduos e maior compatibilidade com processos industriais contínuos, já que não se decompõem facilmente em água e oxigênio (Thomas, Sathian, 2014; Bremer, Seale, 2009; Yang, 2018). Por fim, é realizado o enxágue final, etapa essencial para a remoção de resíduos químicos que poderiam interferir negativamente na atividade da levedura durante a fermentação. A Tabela 3 apresenta os principais agentes químicos empregados nos sistemas CIP na indústria de etanol, bem como suas funções e parâmetros operacionais típicos.

Tabela 3: Principais produtos químicos utilizados em sistemas CIP na indústria de etanol.

Tipo	Produtos Químicos Mais Utilizados	Parâmetros de Operação	Função Principal
Detergentes Alcalinos	Hidróxido de sódio; Carbonato de sódio; Silicato de sódio; Hidróxido de Potássio	Soluções entre 0,15–1,0%, normalmente a 70–80 °C por 10–30 minutos, dependendo do grau de incrustação	Remoção de matéria orgânica, como açúcares caramelizados, proteínas, gorduras e biofilmes iniciais. A saponificação de gorduras facilita a remoção por enxágue.
Detergentes Ácidos	Ácido nítrico; Ácido fosfórico; Ácido cítrico; Ácido sulfúrico; Ácido clorídrico	Soluções entre 0,5–1,0%, geralmente a 55–80 °C por 5–20 minutos, conforme o nível de incrustação mineral	Remoção de incrustações minerais, neutralização de resíduos alcalinos e dissolução de depósitos inorgânicos
Sanitizantes	Hipoclorito de sódio; Ácido peracético; Peróxido de hidrogênio; Ozônio	A concentração, temperatura e tempo variam conforme o agente químico e as exigências do processo. Normalmente aplicados em temperatura ambiente por 5–20 minutos	Eliminação de microrganismos residuais, incluindo bactérias, leveduras e esporos; Prevenção da formação de biofilmes

Fonte: Do autor, baseado em Pant et al. (2023); Muthuraman, Palmer, Flint (2025b); Bremer, Fillery, Mcquillan (2006); Bremer, Seale (2009); Thomas, Sathian (2014).

A seleção adequada dos agentes químicos, bem como o controle dos parâmetros operacionais, é fundamental para a eficiência do processo de limpeza e para a prevenção da formação de biofilmes. A duração média de um ciclo de limpeza CIP situa-se, em geral, entre 1,5 e 2 horas, variando de acordo com a complexidade do sistema, o grau de incrustação e o tipo de produto processado (Van Asselt et al., 2025). A frequência de execução do CIP depende do grau de contaminação e das condições operacionais, podendo variar de uma aplicação diária a até três vezes por semana. Técnicas de acabamento superficial, como o polimento e o alisamento de superfícies em aço inoxidável, podem reduzir a formação de incrustações e biofilmes, diminuindo a frequência e a intensidade dos ciclos de limpeza, embora essa prática ainda não seja amplamente difundida na indústria (Tamime, 2009; Holah, Lelieveld, Gabric, 2016; Van Asselt et al., 2025).

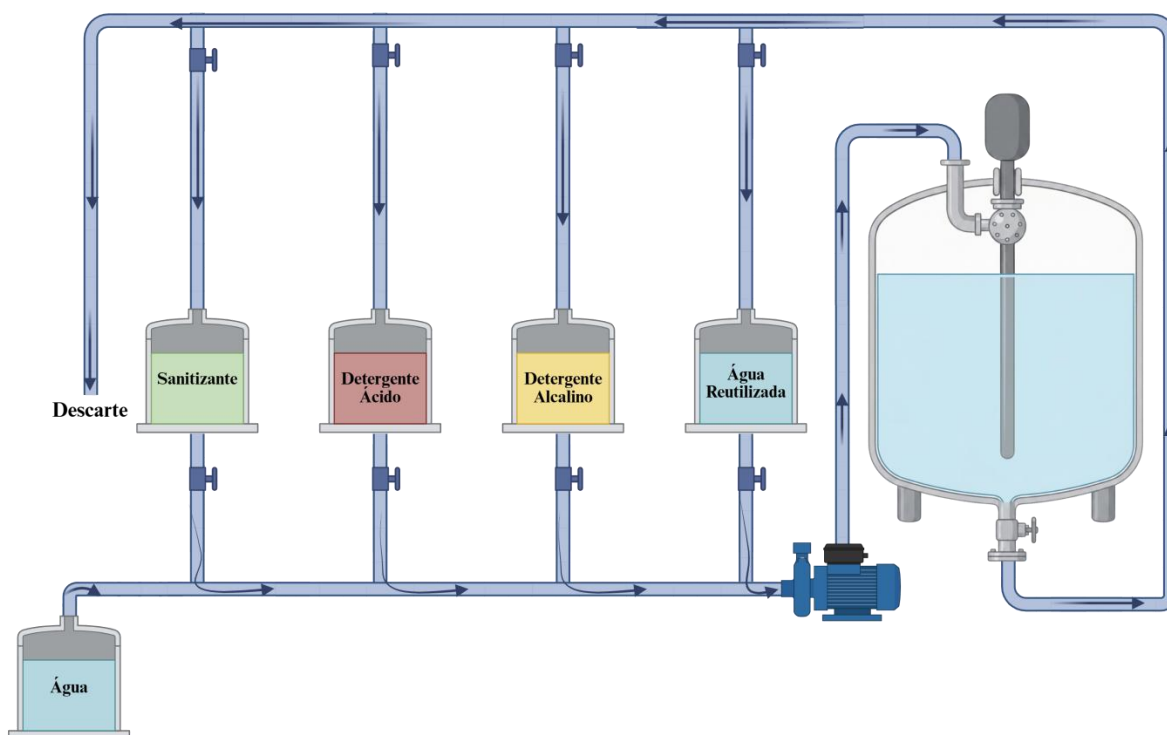
4.6.3.3 Tipos de Sistemas CIP

Após a definição das etapas operacionais, os sistemas CIP podem ser classificados, de modo geral, em sistemas de uso único e sistemas com reutilização das soluções de limpeza (Tamime, 2009). Nos sistemas de uso único, as soluções são preparadas no momento da aplicação e descartadas após sua passagem pelos equipamentos e tubulações. Esse arranjo reduz o risco de contaminação cruzada e a possível formação de esporos, sendo considerado mais higiênico e operacionalmente flexível. No entanto, apresenta maior custo operacional devido ao elevado consumo de água, energia e produtos químicos (Tamime, 2009; Yang, 2018).

Por outro lado, os sistemas com reutilização permitem a recuperação parcial ou total das soluções de limpeza, que podem ser armazenadas e reutilizadas em ciclos subsequentes. Nos sistemas de recuperação parcial, a solução é direcionada para tanques intermediários e reaproveitada em etapas como pré-enxágue ou limpeza inicial. Já nos sistemas de recuperação total, o fluido retorna ao tanque de suprimento, podendo ser reutilizado de forma mais ampla no processo. Esses sistemas geralmente incluem tanques de armazenamento, circuitos de recirculação e linhas dedicadas, permitindo a higienização simultânea de diferentes equipamentos, como tanques e tubulações, sem interrupções significativas no processo (Tamime, 2009; Yang, 2018; Hill, 2025).

Devido à redução no consumo de água, energia e insumos químicos, os sistemas com reutilização são amplamente empregados na indústria de alimentos e bioprocessos, incluindo a produção de etanol. Em contrapartida, sistemas de uso único tendem a ser aplicados em processos que exigem níveis mais rigorosos de higiene.

Figura 15: Representação esquemática de um sistema CIP com reutilização aplicado à limpeza de um fermentador em ambiente industrial.



Fonte: Acervo do autor e site BioRender, com base em Yang 2018.

4.6.3.4 Aplicação do Sistema CIP na Indústria de Etanol

Na produção de etanol, o CIP é empregado em diferentes etapas do processo, com destaque para os equipamentos que apresentam maior acúmulo de resíduos orgânicos e maior suscetibilidade à formação de biofilmes. Entre os principais pontos de aplicação, destacam-se os tanques de preparo do mosto, as dornas de fermentação, as tubulações e linhas de transferência de mosto e vinho, os trocadores de calor, as centrífugas e os tanques de armazenamento intermediário. A Tabela 4 apresenta os principais pontos de aplicação do sistema CIP ao longo do processo de produção de etanol, destacando os tipos de incrustações. Os tipos de incrustações variam de 1 a 3, sendo:

- Tipo 1: Baixa incrustação, predominando os resíduos leves e facilmente removíveis;

- Tipo 2: Incrustação moderada, com presença de biomassa e início de formação de biofilmes;
- Tipo 3: Incrustação severa, com depósitos minerais fortemente aderidos.

Tabela 4: Principais pontos de aplicação do sistema CIP, materiais e tipos de incrustações no processo de produção de etanol.

Equipamento / Etapa do Processo	Materiais de Incrustação	Tipo de Incrustações
Tanques de preparo de mosto	Açúcares, compostos orgânicos, sólidos em suspensão	Tipo 1
Dornas de fermentação	Biomassa de levedura, bactérias, biofilmes, proteínas	Tipo 2
Tubulações e linhas de transferência (mosto/vinho)	Açúcares residuais, células microbianas, biofilmes	Tipo 2
Trocadores de calor	Sais minerais, compostos orgânicos	Tipo 3
Centrífugas	Leveduras, resíduos orgânicos, biofilmes	Tipo 2
Tanques de armazenamento intermediário	Resíduos de fermentação, leveduras, compostos orgânicos	Tipo 1

Fonte: Do autor, baseado em Goode (2012)

As dornas de fermentação constituem um dos principais pontos críticos de contaminação, em função da elevada carga orgânica, da presença contínua de leveduras e da possível proliferação de bactérias, favorecendo a formação e o acúmulo de biofilmes, que podem comprometer o desempenho fermentativo. De forma semelhante, as tubulações e linhas de transferência podem atuar como reservatórios de contaminantes, devido à presença de açúcares residuais e microrganismos, contribuindo para a recontaminação do sistema. Nos trocadores de calor, destacam-se as incrustações de sais minerais, que reduzem a eficiência térmica, por isso são considerados os mais críticos. Já as centrífugas apresentam acúmulo moderado de biomassa e resíduos, sendo essenciais práticas adequadas de CIP para evitar contaminação cruzada e garantir a estabilidade do processo (Goode, 2012).

A limpeza dos tanques, especialmente as dornas de fermentação, é mais comum nas indústrias de etanol e é frequentemente realizada com o auxílio de dispositivos específicos de aspersão, responsáveis por distribuir uniformemente as soluções de limpeza nas superfícies internas. Existem três principais dispositivos utilizados, a esfera de pulverização estática (SSB, ou em inglês, *Static Spray Ball*) que operam com alto volume e baixa pressão. Em contrapartida, os cabeçotes de pulverização rotativo de eixo único (RSH, ou em inglês, *Rotary Spray Head*) promovem a dispersão do fluido por meio de movimento rotacional, aumentando a área de cobertura. Já os cabeçotes de jato rotativo (RJH, ou em inglês, *Rotary Jet Head*) utilizam múltiplos bicos que giram simultaneamente em torno dos eixos vertical e horizontal, proporcionando maior energia de impacto e cobertura mais uniforme das superfícies internas dos tanques (Yang, 2018; John Brooks Company, 2026a; John Brooks Company, 2026b).

Tabela 5: Comparação entre os dispositivos de limpeza dos tanques utilizados em sistemas CIP na indústria de etanol.

Dispositivo	Esfera de Pulverização Estática	Cabeçote de Pulverização Rotativo de Eixo Único	Cabeçote de Jato Rotativo
Imagem			
Rotação	Não possui rotação	Rotação em um eixo	Rotação em dois eixos
Modo de Atuação	Distribuição do líquido em pontos fixos e formação de película descendente	Distribuição do líquido por movimento rotacional	Limpeza por jatos de altos impactos direcionados
Impacto Mecânico	Baixo	Média	Alto
Vazão de Operação	Alta	Média	Baixa
Custo Operacional	Alto	Médio	Baixo

Aplicações	Tanques pequenos; baixas incrustações (Tipo 1); menor exigência sanitária	Tanques de médio porte; incrustações moderadas (Tipo 2)	Tanques de grande porte; alta carga orgânica, incrustações de sais minerais e biofilmes (Tipo 2 e 3); maior exigência sanitária
-------------------	---	---	---

Fonte: Yang (2018); Crane Engineering (2026); John Brooks Company (2026a); John Brooks Company (2026b). Adaptado.

A eficiência da limpeza está fortemente associada à dinâmica dos jatos de líquido. Durante sua propagação, os jatos tendem a sofrer instabilidades devido à interação com o ar, o que pode levar à sua fragmentação em gotículas após determinada distância (Lin, Reitz, 1998). Dessa forma, a limpeza eficaz dos tanques requer não apenas a adequada distribuição do líquido, mas também a geração de impacto suficiente para promover a desagregação das incrustações.

Portanto, o sistema CIP se destaca por sua atuação preventiva no controle da contaminação microbiológica, diferentemente de métodos corretivos, como o tratamento ácido e o uso de antibióticos, que atuam predominantemente após o estabelecimento da contaminação. Para facilitar a comparação entre as diferentes estratégias de controle microbiológico, apresenta-se, a seguir, a Tabela 6, que resume as principais vantagens e limitações dos métodos convencionais empregados no processo fermentativo, permitindo uma visualização integrada de sua aplicabilidade e eficiência no contexto industrial.

Tabela 6: Resumo das estratégias convencionais para o controle de contaminações bacterianas.

Estratégias	Vantagens	Desvantagens
Tratamento ácido	Método simples, de baixo custo e geralmente eficaz na redução da carga bacteriana; quando aplicado corretamente, não compromete significativamente a viabilidade da levedura.	Pode oferecer riscos operacionais e à saúde; geração de efluentes que requerem tratamento; não atua de forma preventiva.
Antibióticos	Alta eficácia no controle de bactérias, especialmente Gram-positivas como <i>Lactobacillus</i> ; ação rápida na redução da contaminação.	Favorece o surgimento de linhagens resistentes; possibilidade de resíduos na biomassa destinada à alimentação animal; uso cada vez mais restrito.

CIP (Cleaning-in-Place)	Atua de forma preventiva, reduzindo a carga microbiana e evitando a formação de biofilmes; padroniza a higienização e aumenta a estabilidade do processo fermentativo.	Requer controle rigoroso dos parâmetros operacionais; demanda maior consumo de água e produtos químicos; pode ser ineficiente se mal executado.
--	--	---

Fonte: Ceccato-Antonini (2022). Adaptado.

A partir dessa análise comparativa, torna-se evidente que a adoção de estratégias preventivas, como o CIP, contribui de forma mais consistente para a estabilidade do processo fermentativo, reduzindo a ocorrência de contaminações recorrentes, a dependência de intervenções corretivas e os impactos negativos sobre o desempenho da levedura e o rendimento em etanol.

5. Considerações Finais

O controle da contaminação por bactérias láticas na produção de etanol representa um dos principais desafios da indústria sucroenergética, impactando diretamente o rendimento, a viabilidade da levedura e os custos operacionais. Nesse contexto, o monitoramento microbiológico torna-se indispensável, especialmente em ambientes industriais nos quais não é possível manter condições totalmente assépticas. Sua aplicação permite a detecção precoce de desvios e a adoção de medidas corretivas e preventivas ao longo do processo.

Embora os métodos convencionais de detecção e monitoramento microbiológico sejam amplamente utilizados devido ao baixo custo e à praticidade, eles apresentam limitações relacionadas à precisão, reprodutibilidade e suscetibilidade a erros operacionais, decorrentes principalmente das etapas manuais envolvidas. Ainda assim, permitem a identificação rápida de desvios no processo fermentativo, contribuindo para intervenções no tempo certo. Diante dessas limitações, destaca-se a necessidade de incorporação de tecnologias mais avançadas de monitoramento, baseadas em análises contínuas e em tempo real, que proporcionam maior confiabilidade dos dados, agilidade na tomada de decisão e melhoria no controle microbiológico, contribuindo para a eficiência e sustentabilidade do processo.

Os métodos de controle de contaminação microbiana, como o tratamento ácido e o uso de antibióticos, embora eficazes na redução da carga microbiana, apresentam limitações relevantes. Além de atuarem predominantemente de forma corretiva, podem gerar impactos ambientais, riscos operacionais e favorecer o desenvolvimento de resistência microbiana.

Entre as estratégias disponíveis, o sistema CIP se destaca como uma ferramenta importante, por permitir a higienização eficiente de equipamentos sem a necessidade de desmontagem, atuando na remoção de resíduos, incrustações e biofilmes. No entanto, seus efluentes não são apenas água de lavagem, mas contêm uma mistura de compostos químicos como detergentes, sanitizantes e agentes oxidantes, no qual ocorrem uma variação extrema de pH, que podem impactar o desempenho das estações de tratamento de efluentes. Mesmo com sistemas de equalização, essas cargas podem causar instabilidades no sistema biológico.

Em comparação, o tratamento ácido tende a gerar impactos mais intensos, pois gera efluentes com pH extremamente baixo e alta carga de sais, exigindo correções químicas adicionais, maior consumo de insumos e aumento na geração de lodo. Já o uso de antibióticos é ainda mais crítico, pois esses compostos podem entrar no sistema de forma indireta, sendo parcialmente eliminados por animais e alcançando os efluentes industriais. Sua baixa remoção nas estações de tratamento pode comprometer a microbiota responsável pelo tratamento

biológico e contribuir para a disseminação da resistência antimicrobiana, configurando não apenas um impacto ambiental, mas também um risco à saúde pública.

Assim, embora o sistema CIP também apresente impactos que exigem controle, estes tendem a ser menos severos quando comparados a essas alternativas. Quando o CIP é tratado como parte do processo, e não como descarte, a indústria ganha eficiência operacional, estabilidade e sustentabilidade real. Dessa forma, seu uso permanece viável, desde que associado a estratégias de monitoramento e gestão que minimizem seus impactos no tratamento de efluentes.

Dessa forma, conclui-se que a integração entre monitoramento microbiológico e práticas adequadas de higienização, com destaque para o uso controlado do sistema CIP, é essencial para o controle eficiente de bactérias lácticas na produção de etanol. Essa abordagem não apenas reduz perdas produtivas e otimiza o processo, mas também contribui para a sustentabilidade ambiental e para a mitigação de impactos sociais, especialmente aqueles relacionados à resistência microbiana e à saúde pública. Além disso, reforça a importância de investimentos contínuos em tecnologias e estratégias que promovam maior segurança, eficiência e responsabilidade no setor sucroenergético.

6. Referências

- ALTERNATIVE FUELS DATA CENTER (AFDC). **Global ethanol production by country or region**. Washington, DC: U.S. Department of Energy, [s.d.]. Disponível em: <https://afdc.energy.gov/data/10331>. Acesso em: 30 mar. 2026.
- AMANTES, N. T. **Análise de viabilidade da utilização de resíduos da cana-de-açúcar na produção brasileira de etanol de segunda geração (e2g)**. 2022.
- AMORIM, H. V. d.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage. In: **The Alcohol Textbook: A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries**. Nottingham: Nottingham University Press, 2009. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- AMORIM, Henrique V. et al. **Scientific challenges of bioethanol production in Brazil**. Applied microbiology and biotechnology, v. 91, n. 5, p. 1267-1275, 2011.
- BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. **Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks**. Biotechnology Advances, v. 26, n. 1, p. 89–105, jan. 2008.
- BAPTISTA, C. et al. **Natural immobilisation of microorganisms for continuous ethanol production**. Enzyme and Microbial technology, Elsevier, v. 40, n. 1, p. 127–131, 2006.
- BASSO, T. O. et al. **Homo-and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation**. Antonie Van Leeuwenhoek, Springer, v. 105, n. 1, p. 169–177, 2014.
- BASTOS, V. D. **Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias**. Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social, 2007.
- BAYROCK, D. P.; INGLEDEW, W. M. Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: nutrient depletion and/or acid toxicity? **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Oxford University Press, v. 31, n. 8, p. 362–368, 2004.
- BELINI, Valdinei Luís et al. Fermentação de cana-de-açúcar por levedura para produção de etanol: pode ser monitorada por meio de microscopia in situ? **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, p. 949-959, 2017.
- BISCHOFF, K. M. et al. Modeling bacterial contamination of fuel ethanol fermentation. **Biotechnology and bioengineering**, Wiley Online Library, v. 103, n. 1, p. 117–122, 2009.
- BNDES, C. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. **BNDES**. Rio de Janeiro, 2008.
- BONATELLI, M. L. et al. Characterization of the contaminant bacterial communities in sugarcane first-generation industrial ethanol production. **FEMS microbiology letters**, Oxford University Press, v. 364, n. 17, p. fnx159, 2017.
- BONATELLI, Maria Letícia; IENCZAK, Jaciane Lutz; LABATE, Carlos Alberto. Fermentação em batelada alimentada de mosto de cana-de-açúcar por *Saccharomyces*

cerevisiae: impacto do mosto de cana-de-açúcar esterilizado e não esterilizado. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 112, n. 8, p. 1177-1187, 2019.

BORTOLI, D. A. 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.

BREGAGNOLI, Flávia Cecílio Ribeiro. **Comportamento fisiológico de microrganismos submetidos a biocidas convencional e natural na produção de cachaça orgânica**. 2006.

BREMER, Philip J.; FILLERY, Suzanne; MCQUILLAN, A. James. Estudos de limpeza no local (CIP) em escala laboratorial sobre a eficácia de diferentes etapas de lavagem cáustica e ácida na remoção de biofilmes em laticínios. **International journal of food microbiology**, v. 106, n. 3, p. 254-262, 2006.

BREMER, P. J.; SEALE, R. B. Clean-in-place (cip). **Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology**, Wiley Online Library, p. 1–8, 2009.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical reviews in microbiology**, Taylor & Francis, v. 28, n. 4, p. 281–370, 2002.

CECCATO-ANTONINI, S. R. **Microbiologia da fermentação alcoólica: a importância do monitoramento microbiológico em destilarias**. 2017.

CECCATO-ANTONINI, S. R. **Microbiologia da fermentação etanólica: Fundamentos, avanços e perspectivas**. [S.l.]: EdUFSCar, 2022.

Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). **Fermentação contínua ou em batelada**. 2024. Acesso em: 4 nov. 2025. Disponível em: <https://cnpem.br/fermentacao-continua-ou-em-batelada/>.

CHIEPPE JÚNIOR, João Baptista. Tecnologia e fabricação do álcool. **Inhumas: IFG**, 2016.

CONNOLLY, C. Bacterial contaminants and their effects on alcohol production. **The alcohol textbook**, Nottingham University Press Nottingham, UK, v. 3, 1999.

CRANE ENGINEERING. **Sani-Matic Rotating Spray Balls – TANKO® RB**. Disponível em: <https://www.craneengineering.net/product/sani-matic-rotating-spray-balls-tanko-rb>. Acesso em: 22 abr. 2026.

(CTC), C. de T. C. **Manual de métodos analíticos – Controle químico da fermentação**. 2005. <https://toaz.info/doc-view-3>. Acesso em: 15 nov. 2025.

DELLIAS, M. d. T. F. et al. Biofilm formation and antimicrobial sensitivity of lactobacilli contaminants from sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Springer, v. 111, n. 9, p. 1631–1644, 2018.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. d. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, SciELO Brasil, v. 39, p. 945–954, 2009.

DIAS, M. O. de S. et al. Sugarcane processing for ethanol and sugar in brazil. **Environmental Development**, Elsevier, v. 15, p. 35–51, 2015.

DORTA, C. et al. Synergism among lactic acid, sulfite, ph and ethanol in alcoholic fermentation of *saccharomyces cerevisiae* (pe-2 and m-26). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Springer, v. 22, n. 2, p. 177–182, 2006.

FERRARI, F. C. d. S. **Fatores operacionais e cinética do processo fermentativo para otimização da produção de etanol em escala industrial**. Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2013.

FIGUEIREDO, J. M. D.; SANTOS, M. M. G. D. **Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo**. 2000.

FILHO, W. G. V. **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. [S.l.]: Editora Blucher, 2021. v.1.

FRANCISCO, S. S. Trabalho de Conclusão de Curso, **Fermentação alcoólica: contaminação bacteriana e métodos para sua detecção**. São Carlos: [s.n.], 2025. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/server/api/core/bitstreams/2e75ca14-a9d6-41b0-b6f0-6b5ebe1e316c/content>.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied microbiology and biotechnology**, Springer, v. 59, n. 6, p. 618–628, 2002.

GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas na fermentação alcoólica**. Tese (Doutorado) — [sn], 1990.

GÓES-FAVONI, S. P. de et al. Fermentação alcoólica na produção de etanol e os fatores determinantes do rendimento. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 9, n. 4, p. 285–296, 2018.

GOMES, F. S. **Antagonismo entre leveduras e bactérias lácticas na fermentação alcoólica**. Tese (Doutorado) — Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”(USP ..., 2009.

GOODE, Kylee Rebecca. **Characterising the cleaning behaviour of brewery foulants-to minimise the cost of cleaning in place operations**. 2012. Tese de Doutorado. University of Birmingham.

HERRERA, S. Bonkers about biofuels. **Nature Biotechnology**, Nature Publishing Group US New York, v. 24, n. 7, p. 755–760, 2006.

HILL, Annie (Ed.). **Brewing microbiology: Managing microbes, ensuring quality and valorising waste**. Elsevier, 2025.

HMGDIRECT. **Accutrend Plus Analyser**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.hmgdirect.com.au/products/accutrend-plus-analyser>. Acesso em: 8 abr. 2026.

HOLAH, John; LELIEVELD, H. L. M.; GABRIC, Domagoj (Ed.). **Handbook of hygiene control in the food industry**. Woodhead Publishing, 2016.

JOHN BROOKS COMPANY. **Alfa Laval TJ40G Rotary Jet Heads**. Disponível em: <https://www.johnbrooks.ca/product/alfa-laval-tj40g-rotary-jet-heads>. Acesso em: 22 abr. 2026a.

JOHN BROOKS COMPANY. **Alfa Laval MultiMidget Rotary Spray Heads**. Disponível

em: <https://www.johnbrooks.ca/product/alfa-laval-multimidget-rotary-spray-heads>. Acesso em: 22 abr. 2026b.

JÚNIOR, A. d. A. C. **Microencapsulação de fisetina em células de levedura (*saccharomyces cerevisiae*) através de choque osmótico**. Dissertação (Mestrado) — Brasil, 2014.

KHATIBI, P. A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* expressing bacteriophage endolysins reduce lactobacillus contamination during fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, Springer, v. 7, n. 1, p. 104, 2014.

LIMA, U. de A. **Biotecnologia Industrial, v. 3: processos fermentativos e enzimáticos**. [S.l.]: Editora Blucher, 2019. v. 3.

LIN, Sung P.; REITZ, Rolf D. Drop and spray formation from a liquid jet. **Annual review of fluid mechanics**, v. 30, n. 1, p. 85-105, 1998.

LOPES, M. L. et al. Ethanol production in brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian journal of microbiology**, SciELO Brasil, v. 47, p. 64–76, 2016.

LUCENA, Brigida TL et al. Diversidade de bactérias do ácido láctico no processo de bioetanol. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 298, 2010.

LUDWIG, K.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D. D. Quantificação da floculação de *saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Food Science and Technology**, SciELO Brasil, v. 21, p. 63–66, 2001.

MICHELLON, E.; SANTOS, A. A. L.; RODRIGUES, J. R. A. **Breve descrição do proálcool e perspectivas futuras para o etanol produzido no brasil**. 2008.

MILANEZ, A. Y.; SOUZA, J. A. P. d.; MANCUSO, R. V. **Panoramas setoriais 2030: sucroenergético**. Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social, 2017.

MONTEIRO, B. M. d. S. **Produção de etanol combustível: efeitos da suplementação nitrogenada na fermentação de mosto de caldo de cana com alta concentração de açúcar**. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2016.

MUTHURAMAN, Srinithi; PALMER, Jon; FLINT, Steve. **Extracellular polymeric substances: the real target in the eradication of *Pseudomonas* biofilms**. *Food Bioscience*, p. 107330, 2025a.

MUTHURAMAN, Srinithi; PALMER, Jon; FLINT, Steve. ***Pseudomonas* biofilm formation at the air–liquid interface and the impact of conventional cleaning-in-place (CIP) on biofilm removal**. *Food Research International*, p. 118215, 2025b.

PANT, Karan J. et al. Towards sustainable Cleaning-in-Place (CIP) in dairy processing: Exploring enzyme-based approaches to cleaning in the Cheese industry. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 22, n. 5, p. 3602-3619, 2023.

PRADO, J. L. **Uso de antibióticos convencionais e antimicrobianos a base de lúpulo no controle da infecção bacteriana em fermentação alcoólica**. Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2014.

- RAÍZEN. **Rastreamento de contaminação**. Protocolo Corporativo, abril 2020.
- RAÍZEN. **Etanol: o que é, como é produzido e quais seus benefícios?**. [S. l.], 18 fev. 2022. Disponível em: <https://www.raizen.com.br/blog/etanol>. Acesso em: 1 abr. 2026.
- RAÍZEN. **Etanol**. 2025. Acessado em: 07 nov. 2025. Disponível em: <<https://www.raizen.com.br/blog/etanol>>.
- RAJENDRAN, Devi Sri et al. Avanços recentes em diversas estratégias de limpeza para controlar a incrustação de membranas: uma revisão abrangente. **Clean Technologies and Environmental Policy** , v. 27, n. 2, p. 649-664, 2025.
- REIS, Lucas Leonardo Ciaramella. **Mercado de biodiesel e etanol no Brasil: uma abordagem de ciência de dados**. 2024.
- REIS, V. R. Caracterização de linhagens selvagens de *saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para produção de etanol. **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidad de Sao Paulo. Piracicaba**, 2011.
- RICH, Joseph O. et al. Formação de biofilme e inibição do etanol por contaminantes bacterianos da fermentação de biocombustíveis. **Bioresource technology** , v. 196, p. 347-354, 2015.
- Rich JO, Bischoff KM, Leathers TD, Anderson AM, Liu S, Skory CD. Resolving bacterial contamination of fuel ethanol fermentations with beneficial bacteria - An alternative to antibiotic treatment. *Bioresour Technol.* 2018 Jan;247:357-362. doi: 10.1016/j.biortech.2017.09.067. Epub 2017 Sep 14. PMID: 28954248.
- SALVATO, F. **Fermentação de mosto industrial por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e sobreexpressão de invertase interna: estudo comparativo com linhagens com alta e baixa atividade de invertase externa**. 94 p. Dissertação (Mestrado) — Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil, Jul 2010. Dissertação de Mestrado em Ciências – Microbiologia Agrícola.
- SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química nova**, SciELO Brasil, v. 35, p. 1004–1010, 2012.
- SANTOS, Fernanda Correia. **Métodos de Monitoramento de Fermentação Alcoólica**. 2022. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos.
- SEIBERLING, Dale A. **Limpeza no local para processos biofarmacêuticos** . CRC Press, 2007.
- SILVA, Y. N. d. S. F. **A presença digital da marca empregadora da raízen**. 2024.
- SONEGO, J. L. S. **Estudo da produção de etanol de sacarose por fermentação extrativa**

utilizando arraste com dióxido de carbono. 2016.

SOUSA, J. d.; MONTEIRO, R. Fatores interferentes na fermentação alcoólica para a produção de etanol. **FAZU em Revista**, v. 2, p. 100–107, 2012.

SOUZA, M. A. d. C.; MUTTON, M. J. R. Flocculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum* em processos industriais de fermentação alcoólica avaliada por técnica fotométrica. **Ciência e Agrotecnologia**, SciELO Brasil, v. 28, p. 893–898, 2004.

SOUZA, R. S. C. de et al. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Scientific Reports**, Nature Publishing Group UK London, v. 6, n. 1, p. 28774, 2016.

TAMIME, Adnan Y. (Ed.). **Limpeza no local: operações de laticínios, alimentos e bebidas**. John Wiley & Sons, 2009.

TECNAL. **Importância da determinação de fibra em usinas de açúcar e etanol.** 2025. https://tecnal.com.br/pt-BR/blog/331_importancia_da_determinacao_de_fibra_em_usinas_de_acucar_e_etanol. Acesso em: 15 nov. 2025.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch—composition, fine structure and architecture. **Journal of cereal science**, Elsevier, v. 39, n. 2, p. 151–165, 2004.

THOMAS, A.; SATHIAN, C. Cleaning-in-place (cip) system in dairy plant-review. **IOSR J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol**, v. 8, p. 41–44, 2014.

TOSETTO, G. M. **Comportamento de linhagens industriais de *Saccharomyces* frente a compostos inibitórios presentes no melaço de cana-de-açúcar na produção de bioetanol.** Tese (Doutorado) — [sn], 2008.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP). Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Biofilmes bacterianos: vivendo em comunidade. São Paulo, [s. d.]. Disponível em: <https://microbiologia.icb.usp.br/cultura-e-extensao/textos-de-divulgacao/bacteriologia/bacteriologia-oral/biofilmes-bacterianos-vivendo-em-comunidade/>. Acesso em: 8 abr. 2026.

VAN ASSELT, Arjan J. et al. A limpeza no local (CIP) está preparada para o futuro? - Uma avaliação crítica. **Processamento de Alimentos e Bioprodutos**, 2025

VENTURA, R. **Quantificação do ácido láctico na fermentação etanólica como parâmetro de monitoramento do processo.** Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2007.

VIEIRA, D. A. P.; FERNANDES, N. Q. **Microbiologia Aplicada. Rede e-Tec Brasil.** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, Inhumas, 2012

YANG, Jifeng. **Estratégias inovadoras para operações de limpeza no local.** 2018.

YOKOYA, F.; OLIVA-NETO, P. Características da flocculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. **Rev Microbiol**, v. 22, n. 1, p. 12–16, 1991.