

## **Curso de Tecnologia em Biocombustíveis**

### **BIOCIDAS NO CONTROLE DE CONTAMINANTES EM FERMENTAÇÃO A PARTIR DE MOSTO DE MELAÇO**

**GINO BOSSA RODA JUNIOR**

**Orientador: Prof. Dr. Leonardo Lucas Madaleno  
Coorientadora: Profa. Dra. Mariana Carina  
Frigieri**

**Trabalho apresentado a Faculdade de Tecnologia  
de Jaboticabal - Fatec, para obtenção do título de  
Tecnólogo em Biocombustíveis.**

Roda Junior, Gino Bossa

R685b Biocidas no Controle de Contaminantes em Fermentação a partir de Mosto de Melaço/ Gino Bossa Roda Junior.— Jaboticabal : Fatec, 2012.  
54f.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Lucas Madaleno  
Coorientadora: Profa. Dra. Mariana Carina Frigieri

Trabalho (graduação) – Apresentado ao Curso de Tecnologia em Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, 2012.

1. Antibióticos Naturais. 2. Extrato de Lúpulo. 3. Kamoran. 4. Óleo Essencial de Orégano (OEO). I. Madaleno, Leonardo Lucas. II. Título.

CDU 663.52

# **Curso de Tecnologia em Biocombustíveis**

## **CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO: BIOCIDAS NO CONTROLE DE CONTAMINANTES EM  
FERMENTAÇÃO A PARTIR DE MOSTO DE MELAÇO**

**AUTOR: GINO BOSSA RODA JUNIOR**

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. Leonardo Lucas Madaleno

**COORIENTADORA:** Profa. Dra. Mariana Carina Frigieri

Trabalho de Graduação aprovado pela Banca Examinadora como parte das exigências para conclusão do Curso Superior de Tecnologia em Biocombustíveis, apresentado à FATEC-JB para a obtenção do título de Tecnólogo.

**LEONARDO LUCAS MADALENO**

**MARCIO ROBERTO DE CARVALHO**

**JULIANA PELEGRINI ROVIERO**

Data da apresentação: 20 de Dezembro de 2012.

---

Leonardo Lucas Madaleno

## Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus amados pais, Gino Jose  
Roda e Maria Elza Bossa Roda, que suportaram a saudade  
e não me deixaram desistir mesmo nos momentos mais  
difíceis.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por terem me guiado pelo caminho certo e iluminado meus passos.

Aos meus pais Gino e Maria Elza e minhas irmãs Djeine e Caroline, pela educação, pelo exemplo de pessoas e por sempre me incentivarem a seguir em frente independente dos obstáculos no caminho.

As minhas avós pelo amor oferecido e por sempre me colocarem em suas orações.

Aos professores Leonardo Lucas Madaleno e Mariana Carina Frigieri pela dedicação, paciência e contribuição na construção desse trabalho.

A todos os professores da FATEC de Jaboticabal pela contribuição em minha formação.

Aos auxiliares de docente Flávia Roberta de Annunzio e Marcio Roberto de Carvalho, pela amizade e imprescindível suporte na fase experimental deste trabalho.

A todos os funcionários que colaboraram de alguma forma em minha formação.

A todos os amigos e amigas que acompanharam todo meu caminho para chegar até aqui.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.

Marthin Luther King

## RESUMO

### **BIOCIDAS NO CONTROLE DE CONTAMINANTES EM FERMENTAÇÃO A PARTIR DE MOSTO DE MELAÇO**

Durante o processo fermentativo realizado nas usinas sucroenergéticas é comum que ocorra o desenvolvimento de diferentes tipos de microrganismos contaminantes, levando a um comprometimento do processo. Essa contaminação ocorre desde a colheita até a preparação do mosto. Com objetivo de evitar grandes perdas, o controle microbiológico se faz necessário. Atualmente o controle de contaminação desses processos está baseado na utilização de antibióticos químicos, os quais podem se tornar um problema para o setor sucroenergético, gerando altos custos, deixando resíduos e podendo contribuir para o desenvolvimento da resistência bacteriana. Com isso, surge a necessidade de se encontrar novos meios de controle de contaminação bacteriana durante todo o processo de produção do bioetanol. Perante a atual situação, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação biocida de dois antibióticos naturais (Extrato de Lúpulo e Óleo Essencial de Orégano) diretamente na fermentação etanólica, como uma alternativa ao uso de antibióticos químicos. A aplicação de Extrato de Lúpulo na dosagem 10mg/L neste estudo foi suficiente para reduzir a contaminação final da fermentação e diminuir a acidez do vinho fermentado com mosto de melaço. Ademais, o Óleo Essencial de Orégano e o Extrato de Lúpulo eliminaram a espuma formada durante a fermentação do mosto de melaço.

**Palavras-Chave:** Antibióticos Naturais. Extrato de Lúpulo. Kamoran. Óleo Essencial de Orégano (OEO).

## **ABSTRACT**

### ***BIOCIDES IN CONTROL OF CONTAMINANTS IN FERMENTATION FROM THE WORT OF MOLASSES***

*During the fermentative process accomplished by the sugarcane industry it's common to develop different types of contaminant microorganisms, which can compromise the role process. This contamination occurs from the harvest until the preparation of the mash. Within the goal to avoid great losses the microbiological control is necessary. Currently, the control of the contamination of the process is based on the use of chemical antibiotics which can be a problem to the sugarcane sector because of its high cost, waste production and it can contribute to the development of bacterial resistance. Therefore rises the need for finding new ways to control bacterial contamination of the whole process of bioethanol production. Given the current condition, the aim of the present work was to evaluate the biocide action of two natural antibiotics (Hop Extract and Essential Oil of Oregano) used directly during the alcoholic fermentation as an alternative for the use of the chemical antibiotics. The treatment with Hop Extract at the dose of 10mg/l used in this study was sufficient to reduce the final contamination of the fermentation and diminishes the acidity of the wine produced with the fermentation process of the molasses from the mash. Moreover, the Essential Oil of Oregano and the Hop Extract eliminated the foam formatted during the fermentation process of the wort of molasses.*

*Keywords: Natural antibiotics. Hop Extract. Kamoran. Essential Oil of Oregano.*

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Setor Sucroenergético – Mapa da Produção .....	17
FIGURA 2 - Processo Melle-Boinot de fermentação.....	19
FIGURA 3 - Esquema do processo de fermentação continua para a produção do Bioetanol .	20
FIGURA 4 - Extrato de Lúpulo, Kamoran e Óleo Essencial de Orégano.....	28
FIGURA 5 - Placas Petrifilm™ - 3M-6400.....	31
FIGURA 6 - Incubadora Shaker – Cientec-CT-712.....	30
FIGURA 7 - Brix do mosto de melão para os dias de Fermentação. ....	32
FIGURA 8 - pH do mosto de melão para os dias de Fermentação antes da correção.....	33
FIGURA 9 - pH corrigido do mosto de melão para os dias de Fermentação. ....	33
FIGURA 10 - Acidez do mosto de melão para os dias de fermentação .....	33
FIGURA 11 - ART do mosto de melão para os dias de fermentação. ....	34
FIGURA 12 - Efeitos dos tratamentos Biocidas para o Brix Final do vinho. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). ....	36
FIGURA 13 - Efeito dos tratamentos Biocidas para Acidez Final do vinho. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). ....	36
FIGURA 14 - Efeito dos dias de fermentação sobre a quantidade de Brix Final do vinho. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). ....	37
FIGURA 15 - Efeitos dos dias de fermentacao sobre a quantidade de ARRT do vinho. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). ....	38
FIGURA 16 - Efeito dos dias de fermentacao sobre o pH do vinho. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). ....	38
FIGURA 17 - Efeito dos dias de fermentacao sobre o Teor Alcoólico do vinho. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). ....	39
FIGURA 18 - Efeito dos dias de fermentacao sobre a quantidade de Álcool produzido no vinho. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). ....	40
FIGURA 19 - Efeito dos dias de fermentacao na Eficiência Fermentativa. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). ....	40
FIGURA 20 - Efeito dos tratamentos Biocidas para a Contaminacao Final do vinho. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). ....	43
FIGURA 21 - Efeito dos dias de fermentação sobre a Contaminação Inicial. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). ....	43

FIGURA 22 - Formação de espuma no tratamento Testemunha .....	44
FIGURA 23 - Formação de espuma no tratamento Kamoran® .....	45
FIGURA 24 - Formação de espuma no tratamento Orégano .....	45
FIGURA 25 - Formação de espuma no tratamento Lúpulo.....	46

## LISTA DE ABREVIACÕES

ART	Açúcar Redutor Total.
ARRT	Açúcar Redutor Residual Total.
Brix	Porcentagem em massa de sólidos solúveis contidos em uma solução de sacarose.
CTC	Centro de Tecnologia Canavieira.
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido Sulfúrico.
IAA	Instituto do Açúcar e do Alcool.
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
OEO	Óleo Essencial de Orégano.
pH	Potencial de hidrogênio.
Proálcool	Programa Nacional do Alcool.

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS .....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	16
3.1 O Setor Sucroenergético.....	16
3.2 Obtenção do Bioetanol Combustível .....	18
3.2.1 Processo Fermentativo .....	18
3.2.2 Centrifugação do vinho.....	20
3.2.3 Tratamento do fermento.....	21
3.2.4 Destilação.....	21
3.3 Contaminação .....	22
3.4 A Problemática do Uso de Antibióticos.....	23
3.5 O uso de biocidas como alternativa ao antibiótico.....	24
3.6 Biocidas utilizados neste estudo .....	26
3.6.1 Extrato de Lúpulo .....	26
3.6.2 Kamoran®.....	26
3.6.3 Óleo Essencial de Orégano .....	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
4.1 Preparo do mosto e análises realizadas .....	29
4.2 Processo fermentativo e análises realizadas .....	29
4.3 Análise de Viabilidade e Contaminação .....	30
4.4 Análises no vinho.....	31
4.5 Análise estatística.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1 Características do Mosto Utilizado para Fermentação.....	32
5.2 Aplicação dos Tratamentos Biocidas e a qualidade do vinho produzido.....	34
5.3 Efeitos dos Biocidas sobre a viabilidade celular e contaminação no processo fermentativo.....	40
5.4 Ação dos tratamentos biocidas sobre a formação de espuma durante a fermentação....	43
6 CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS .....	48

# 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de etanol, utilizando como matéria-prima a cana-de-açúcar. Este biocombustível tem se destacado no cenário nacional e internacional por ser renovável e menos poluente que os derivados de petróleo e de custo relativamente baixo (BADIN, 2010). Ainda, segundo esse autor, a produção é realizada através do processo fermentativo, graças à ação biológica das leveduras, que convertem os açúcares presentes no mosto, em etanol, gás carbônico e compostos secundários. Entretanto, a levedura necessita de condições favoráveis do meio para que suas atividades metabólicas sejam adequadas, resultando em processo eficiente, com rendimentos industriais satisfatórios.

Aliado a isso, uma das principais preocupações na indústria sucroenergética é combater os microrganismos contaminantes do processo de produção de álcool, representados por bactérias e leveduras selvagens que se instalam no processo. Estes contaminantes são causadores de problemas como: consumo de açúcar, queda de viabilidade de células de levedura devido às toxinas excretadas no meio, floculação do fermento que acarreta perda de células de levedura pelo fundo de dorna ou na centrífuga e queda no rendimento industrial (AMORIM; OLIVEIRA, 1982). Além disso, a formação de gomas, principalmente a de dextrana, provocada pela contaminação, aumenta a viscosidade do caldo, causando problemas operacionais na fábrica (TILBURY, 1975 *apud* ALCARDE; WALDER, 1997). As leveduras selvagens contaminantes, por serem mais resistentes do que as leveduras inoculadas podem chegar a dominar o processo fermentativo (BASSO *et al.*, 1996 *apud* ALCARDE; WALDER, 1997).

As leveduras e as bactérias contaminantes podem produzir ácido lático e outros ácidos orgânicos, os quais, em quantidades superiores às normais, podem ser responsáveis por uma queda no rendimento da fermentação (AMORIM; OLIVEIRA, 1982). Amorim *et al.* (1981) citam que quando a contaminação bacteriana atinge níveis superiores a  $10^7$  células/ml pode ocorrer uma significativa queda no rendimento alcoólico. Amorim e Oliveira (1982) destacam que o não controle da contaminação bacteriana pode ocasionar indiretamente uma redução no rendimento da fermentação por dois motivos: aumento da viscosidade do vinho ocasionando maior perda do fermento no vinho centrifugado e maior consumo de açúcar, desviando este da produção de açúcar e álcool.

Os antibióticos são compostos orgânicos, naturais ou sintéticos, e são utilizados para controle de contaminantes na fermentação. Os mesmos inibem ou causam a morte de

microrganismos específicos apresentando seletividade quanto aos alvos. Como os alvos são específicos, o uso de antibióticos para o controle de contaminação em indústrias não é recomendado, pois induz à seleção de microrganismos resistentes (EGUCHI, 2007). Além disso, o uso de antibióticos pode deixar resíduos nas leveduras comprometendo seu uso posterior. Outro aspecto importante é que os antibióticos possuem custo elevado para o setor.

Os biocidas naturais estão sendo empregados com amplo sucesso no controle de microrganismos contaminantes da fermentação, mas os resultados são demonstrados de forma isolada. A aplicação das principais formas de controle com biocidas naturais pode auxiliar na tomada de decisão para um tipo de controle que entra em acordo com as exigências atuais de redução de resíduos. Além disso, a utilização de antibióticos no controle microbiológico da produção de etanol é de elevado custo, enquanto o controle exercido pelos biocidas apresenta baixos custos de utilização (CAETANO, 2011), pois a matéria-prima utilizada é natural, não necessitando de elevada tecnologia de produção.

## **2 OBJETIVOS**

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficácia de dois biocidas, aplicando-os diretamente no processo fermentativo: o BETABIO 45, produzido a partir de Extrato de Lúpulo e o Óleo Essencial de Orégano (OEO), utilizando mosto de melação, tendo como parâmetro o Kamoran, antibiótico sintético mais utilizado nas usinas atualmente.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 O Setor Sucroenergético

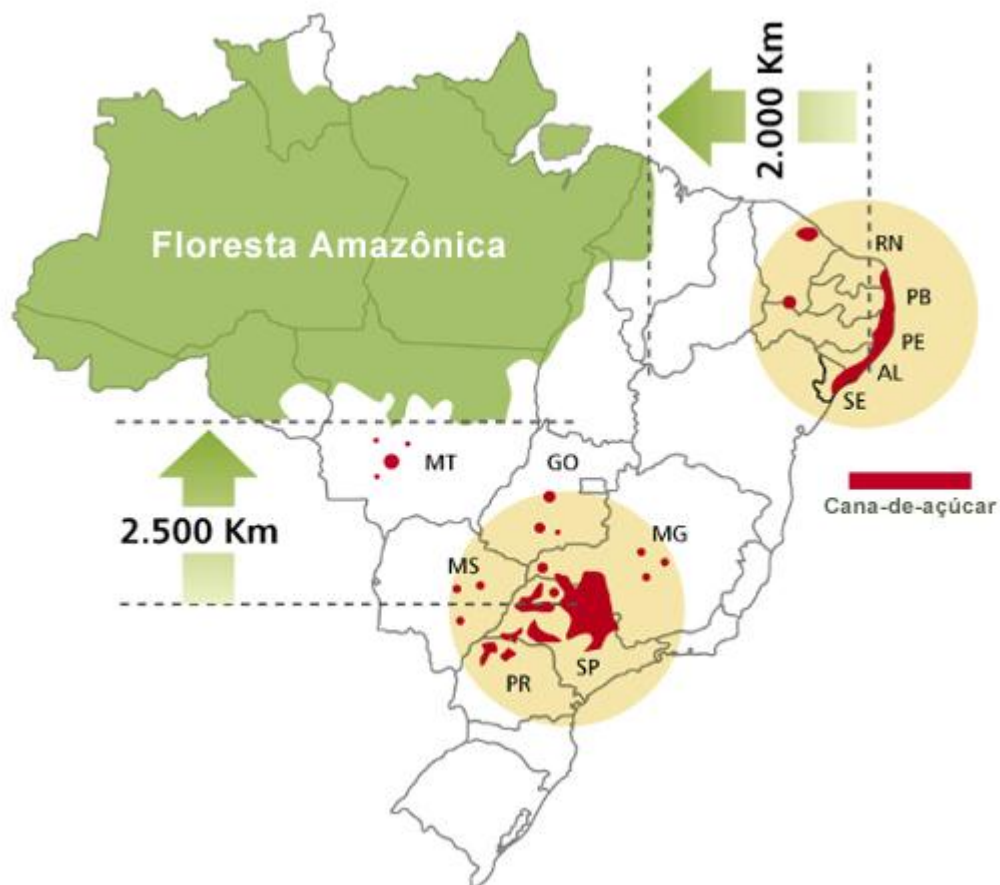
O setor sucroenergético, após a decadência no período colonial, voltou a ser privilegiado nos anos 30, posteriormente à crise de 1929 (Crise do Café), em que o Governo Vargas criou o Instituto do Açúcar e do Alcool (IAA). Este Instituto tinha por função regulamentar o mercado açucareiro do Brasil, principalmente através de leis que normatizavam a produção nacional do açúcar e seus derivados de acordo com o desenvolvimento do mercado consumidor interno e externo, através de cotas de produção. O IAA desenvolveu uma política de rígido controle sobre as exportações, assumindo o monopólio sobre o comércio exterior do açúcar e de seus derivados (CONAMA, 2006). Após a crise do Petróleo na década de 70, o conceito de etanol foi mudado por meio da busca por fontes alternativas de combustíveis. O impulso foi dado após o governo retomar as pesquisas e os investimentos para o desenvolvimento do álcool como combustível (BERTELLI, 1992 *apud* SILVA, 2010).

Em 1975 surgiu o Proálcool – Programa Nacional do Alcool, que visava estimular a produção do álcool, pela oferta de empréstimos a juros favorecidos e a garantia de altos preços de vendas. O estímulo foi estabelecido até a implementação do parque industrial e do alcance da produtividade a níveis consideráveis. Este programa ajudou o Brasil a conquistar uma tecnologia única no mundo para o uso em larga escala de um combustível renovável que não depende do mercado internacional do petróleo (CAVALCANTI, 2007 *apud* SILVA, 2010). Esse programa diversificou a atuação da indústria açucareira com grandes investimentos apoiados pelo Banco Mundial, possibilitando a ampliação da área plantada com cana-de-açúcar e a implantação de destilarias de etanol. A experiência serviu como alternativa para diminuir a vulnerabilidade energética do País, devido à crise mundial do petróleo (UNICA, 2008).

Apesar de o Nordeste, até o momento, apresentar-se como região tradicional do setor sucroenergético, o Centro Sul do Brasil (principalmente, o Estado de São Paulo) também passou a investir nesta área (Figura 1). Segundo CONAMA (2006), isso se deu devido à mudança setorial de investimentos da agropecuária paulista, que deixou as lavouras de café em favorecimento ao cultivo da cana-de-açúcar, aliando-se a condições adequadas de

topografia, localização próxima ao pólo consumidor e a introdução de novas técnicas agrícolas (processo de modernização da agricultura).

FIGURA 1- Setor Sucroenergético – Mapa da Produção (UNICA, 2008)



Fonte: (UNICA, [s.d]).

A produção de cana-de-açúcar se concentra nas regiões Centro-Sul e Nordeste do Brasil. O mapa acima (Figura 1) mostra em vermelho as áreas onde se concentram as plantações e usinas produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade, segundo dados oficiais do IBGE, UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas – SP) e do CTC (Centro de Tecnologia Canavieira) (UNICA, [s.d]).

O Brasil responde por 15 bilhões de litros de álcool de um total de quase 40 bilhões de litros da produção mundial. Presume-se que até 25 bilhões de litros sejam usados para fins energéticos (SILVA, 2010).

## **3.2 Obtenção do Bioetanol Combustível**

### **3.2.1 Processo Fermentativo**

No Brasil, as leveduras são os principais microrganismos responsáveis pela conversão em nível industrial de açúcares em etanol. As células de leveduras fazem uso desta conversão para obterem energia necessária à manutenção de suas atividades vitais quando submetidas a elevadas concentrações de açúcar, sendo o álcool etílico um produto resultante de seu metabolismo (SANTOS, 2008). O processo de fermentação normalmente utilizado é o chamado Melle-Boinot, no qual as células de levedura recuperadas são recirculadas no processo, mantendo elevada a concentração celular, e obtendo-se, assim, aumento do rendimento alcoólico, devido o menor consumo de açúcar para multiplicação e crescimento celular (LOPES, 1989).

Esse processo fermentativo pode ser realizado a partir do caldo extraído da cana. No entanto, nos últimos anos, com o aumento da produção de açúcar pelas indústrias sucroenergéticas, houve incremento da utilização do subproduto melaço. O melaço é o líquido que se obtêm como resíduo de fabricação do açúcar cristalizado ou da refinação do açúcar bruto. O mosto produzido, a partir dessa matéria-prima, precisa ter a concentração de glicose adequada, pois o melaço apresenta quantidade de açúcares muito elevada, o que compromete o processo. É necessária então, a utilização de água para fazer a diluição do melaço. Essa diluição pode elevar a quantidade de microrganismos contaminantes do processo fermentativo. Quanto maior é a quantidade de contaminantes menor é a produção de etanol e, portanto, é necessário que se dê as condições para que a levedura selecionada se sobressaia sobre os demais microrganismos do processo. Ainda, as bactérias e leveduras selvagens competem com a levedura selecionada pelo mesmo substrato.

A fermentação alcoólica consiste na transformação dos açúcares do mosto em etanol, gás carbônico e energia, sob ação catalítica das leveduras. Quando condições de temperatura, acidez, concentração de açúcares, qualidade da cana, higiene, preparação do pé-de-cuba e do mosto são impróprias podem desenvolver-se outros tipos de microrganismos que consomem os açúcares ou então o álcool, produzindo compostos orgânicos indesejáveis para a qualidade final do produto, além de reduzir o rendimento do processo (FREGUGLIA; HORII, 1998).

O processo fermentativo industrial para a produção de etanol pode ser conduzido basicamente de duas maneiras distintas: processo descontínuo (ou em batelada) e processo contínuo. No processo descontínuo, após a conversão do substrato em etanol, o microrganismo é reutilizado, após tratamento adequado em pré-fermentador, em um novo ciclo de fermentação. No processo contínuo, o substrato e o microrganismo agente fluem por reatores em série, ocorrendo a conversão gradativa dos açúcares em álcool. O processo contínuo oferece importantes vantagens econômicas frente ao processo descontínuo, especialmente quando combinado com técnicas de imobilização de células (VERBELEN *et al.*, 2006 *apud* SANTOS, 2008).

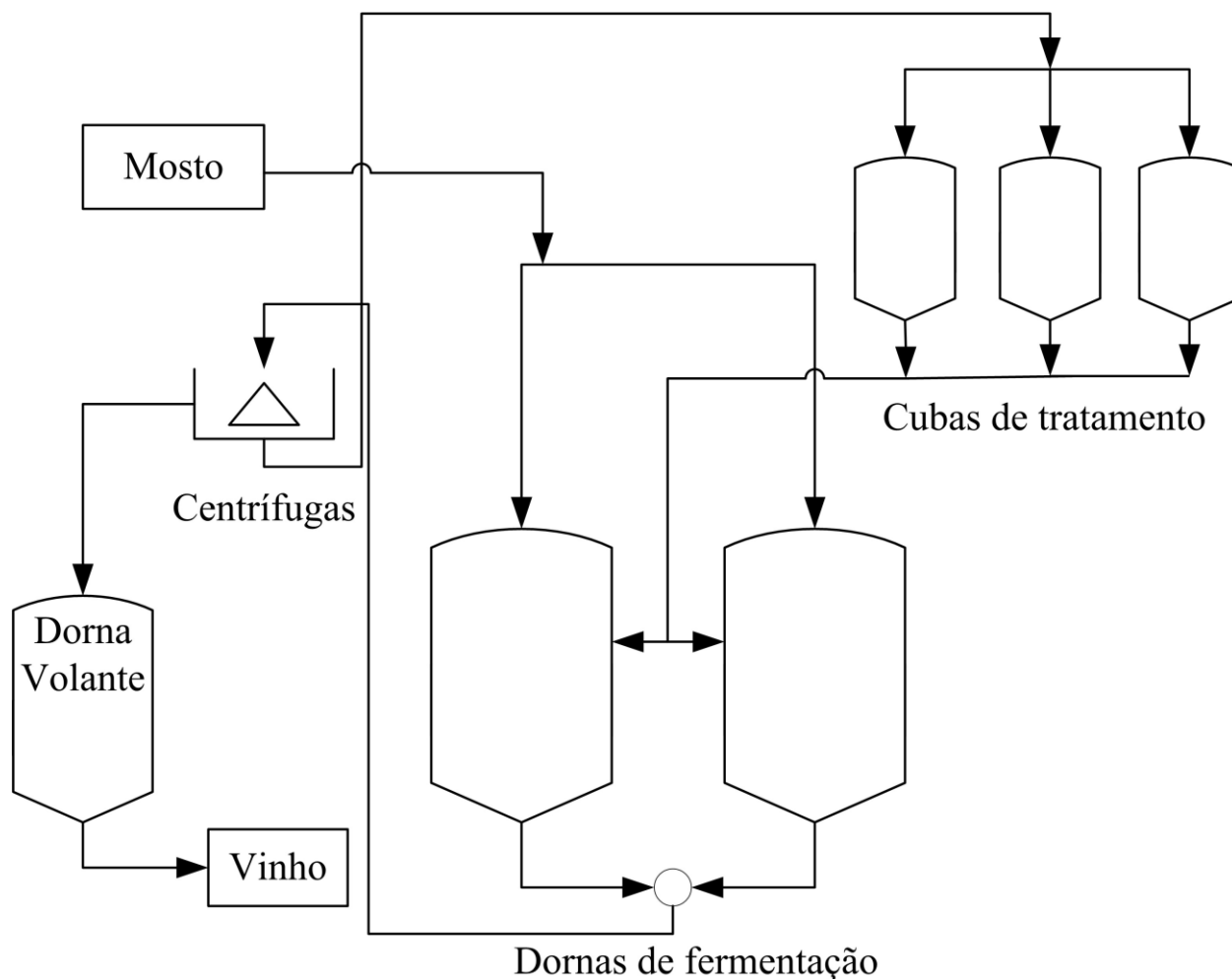
Segundo Carvalho e Sato (2001) *apud* Santos (2008), os processos descontínuos são também conhecidos como processos em batelada. De maneira geral, o modo de operação de um processo descontínuo pode ser descrito da seguinte forma:

- no instante inicial, o meio contendo os nutrientes (mosto) no fermentador, ou dorna, é inoculado com microrganismos;
- inicia-se a fermentação, propiciando-se condições ótimas para o microrganismo agente;
- no decorrer do processo fermentativo, quando necessário, adiciona-se antiespumante, para dispersão imediata de espuma gerada;
- ao fim da fermentação, a dorna (fermentador) é descarregada e o meio fermentado segue para tratamentos finais;
- a dorna é lavada e recarregada com fermento e mosto, dando início a outro ciclo de fermentação.

A Figura 2 mostra o esquema simplificado do processo Melle-Boinot de fermentação.

A fermentação é contínua e agitada, consistindo de 4 estágios em série, composto de três dornas no primeiro estágio, duas dornas no segundo, uma dorna no terceiro e uma dorna no quarto estágio. Com exceção do primeiro, o restante tem agitador mecânico. As dornas tem geralmente capacidade volumétrica de 400.000 litros cada, todas fechadas com recuperação de álcool e do gás carbônico. Durante o processo de fermentação há despreendimento de gás carbônico e calor, portanto, é necessário que as dornas sejam fechadas para recuperar o álcool arrastado pelo gás carbônico e o uso de trocadores de calor para manter a temperatura nas condições ideais para as leveduras. A fermentação é regulada para 28 a 30°C. O mosto fermentado é chamado de vinho. Esse vinho contém cerca de 9,5% de álcool. O tempo de fermentação é, geralmente, de 6 a 8 horas (FILHO e PRESSANHA, 2012).

FIGURA 2- Processo Melle-Boinot de fermentação (batelada).



Fonte: (NAVES, 2012).

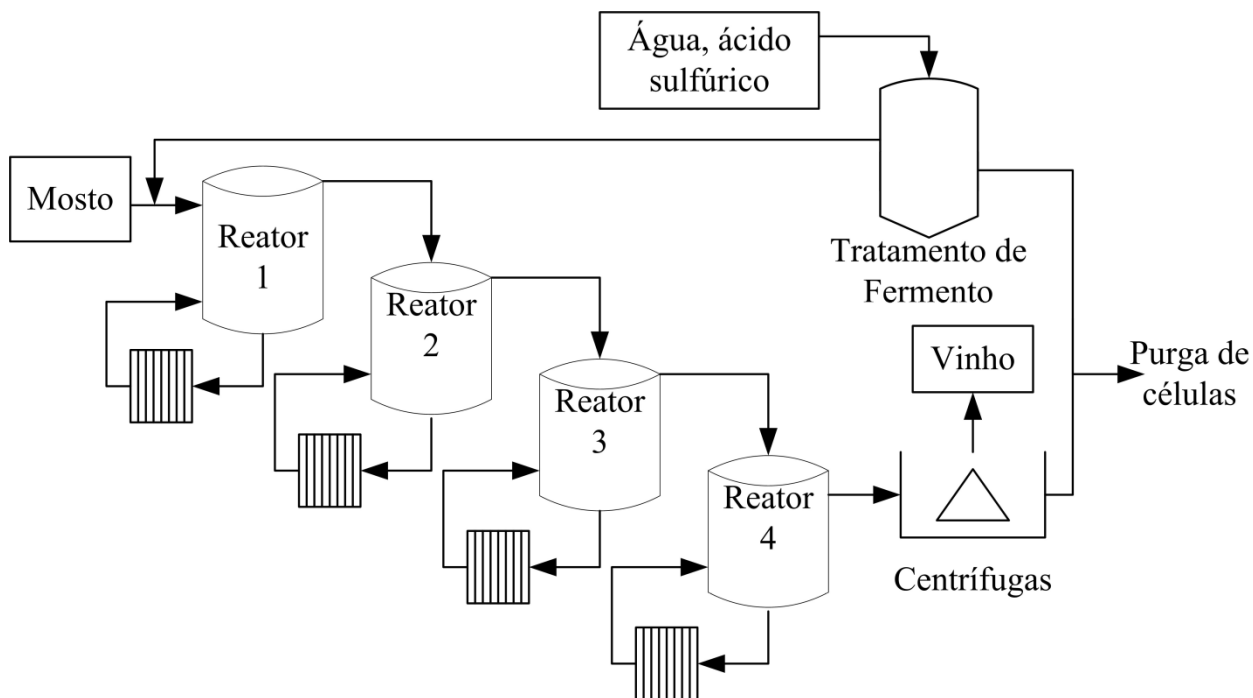
Em sua forma mais simples, a fermentação contínua faz-se alimentando uma dorna com fluxo contínuo de substrato, em concentração adequada ao microrganismo agente, retirando-se dela, de forma contínua e na mesma vazão, o vinho que, após centrifugação, é encaminhado para a destilação (LIMA, 1992 *apud* SANTOS, 2008).

Na Figura 3 é possível verificar o esquema do processo de fermentação contínua para a produção do Bioetanol.

### 3.2.2 Centrifugação do Vinho

Após a fermentação a levedura é recuperada do processo por centrifugação, em separadores que separam o fermento do vinho. O vinho deleiturado irá para os aparelhos de destilação onde o álcool é separado, concentrado e purificado. O fermento, com uma concentração de aproximadamente 60%, é enviado às cubas de tratamento.

FIGURA 3- Esquema do processo de fermentação contínua para a produção do Bioetanol



Fonte: (NAVES, 2012).

### 3.2.3 Tratamento do Fermento

A levedura após o processo de fermentação se desgasta, por ficar exposta a teores alcoólicos elevados. Com a separação do fermento do vinho, o fermento a 60% é diluído a 25% com adição de água. Regula-se o pH em torno de 2,8 a 3,0 adicionando-se ácido sulfúrico que também tem efeito desfloculante e bacteriostático. O tratamento é contínuo e tem um tempo de retenção de aproximadamente uma hora. O fermento tratado volta ao primeiro estágio para começar um novo ciclo fermentativo; eventualmente é usado bactericida para controle da população contaminante (MAFRA *et al.*, 2009).

### 3.2.4 Destilação

O vinho é enviado aos aparelhos de destilação. Na destilação do vinho, resulta um subproduto importante, a vinhaça. A vinhaça, rica em água, matéria orgânica, nitrogênio, potássio e fósforo, é utilizada na lavoura para irrigação da cana, na chamada fertirrigação. Nesse processo é obtido o flegma, enviado ao processo de retificação para a obtenção do etanol hidratado, utilizado nos carros movidos a etanol e subprodutos (álcool bruto, óleo fúsel

e a flegmaça). Em seguida, a mistura hidroalcoólica é submetida ao processo de desidratação, resultando no etanol anidro, usado na mistura com a gasolina para a produção de gasolina comum, melhorando a qualidade do combustível.

### 3.3 Contaminação

Vivemos num mundo dominado por microrganismos. Os mesmos representam cerca de 50% da biomassa da Terra, sendo a outra metade composta de 35% plantas e 15% de animais. Portanto, é muito natural que os microrganismos estejam presentes em todos os locais imagináveis (EGUCHI, 2007).

A contaminação bacteriana é fator relevante no processo industrial do processo de produção do etanol, pois esta é capaz de causar danos como a transformação da matéria-prima da fermentação em outras substâncias indesejáveis e por consumir parte do etanol produzido, o que provoca perdas significativas no rendimento fermentativo (CARDOSO *et al.*, 2010).

O rendimento fermentativo também pode diminuir significativamente pela diminuição do crescimento e da viabilidade da levedura, além de ocasionar problemas de floculação. A contaminação do processo vem desde a colheita da matéria-prima, da própria cana-de-açúcar, do solo, da deterioração da cana, da manipulação durante o carregamento e descarregamento ou junto à água de diluição do mosto. As bactérias também podem se desenvolver em qualquer outro ponto do processo em que haja nutrientes e temperaturas adequadas, podendo ser durante o processamento do caldo em tanques, linhas de transferência e trocadores de calor (BARBOSA, 2012).

Os problemas gerados pela contaminação bacteriana nas reações de fermentação são multifatoriais. Essas bactérias competem diretamente com o fermento de açúcares fermentáveis e convertem os açúcares em ácidos orgânicos em vez de etanol. Se as bactérias alcançarem um número crítico, perdas significativas de etanol são inevitáveis. Por isso, o controle da contaminação bacteriana é uma preocupação séria (WARREN, 2005, *apud* SILVA, 2010).

Durante as etapas de processamento da matéria-prima até sua finalização, a microbiota presente no início do processamento se reduz a poucos gêneros devido ao ambiente altamente seletivo, gerado em função das alterações de pH, temperatura, inibidores

presentes no substrato e condições atmosféricas a que são submetidas (OLIVA NETO, 1995 *apud* BARBOSA, 2012).

O fator mais crítico da contaminação bacteriana para as fermentações, especialmente nas quais se extrai levedura para secagem, é a floculação. Esse fenômeno ocorre quando há interação entre os lactobacilos e a levedura, potencializado por altas concentrações de cálcio no mosto. Tais condições levam as bactérias a se aderirem nas paredes das leveduras, por meio de ligações entre moléculas constituintes da superfície desses microrganismos, fazendo com que toda biomassa se precipite (VENTURA, [s.d.]).

### **3.4 A Problemática do Uso de Antibióticos**

O controle e o monitoramento da fermentação alcoólica são de extrema importância, uma vez que a presença de microrganismos contaminantes provocam diversos transtornos no processo, afetando-o diretamente. A utilização de antibióticos apresenta-se como uma das possibilidades para controle, em virtude de suas propriedades bactericidas e/ou bacteriostáticas. Porém, o uso contínuo destes produtos pode favorecer o desenvolvimento de linhagens resistentes, tornando-as cada vez menos sensíveis à sua ação, gerando elevado custo do processo de produção, além de possibilitar a incorporação de resíduos no produto final obtido.

Segundo Leite (2011), durante a fermentação, a levedura pode estar exposta a vários fatores estressantes. Dentre esses fatores, os mais frequentemente mencionados são os altos teores alcoólicos, temperatura elevada, a acidez do meio, a presença de sulfito, a contaminação bacteriana e, mais raramente documentada, a contaminação com leveduras não *Saccharomyces*.

O controle de contaminação bacteriana no processo de fermentação etanólica é etapa fundamental para assegurar resultados positivos na produção de etanol, e para isso, os antibióticos são bastante utilizados. Os antibióticos são compostos orgânicos, naturais ou sintéticos, que inibem ou destroem microrganismos específicos, apresentando seletividade quanto aos alvos. A aplicação é geralmente em dosagens muito baixas. Como os alvos são específicos, o uso de antibióticos para o controle de contaminação em indústrias não é muito recomendado, pois pode favorecer a seleção de microrganismos resistentes. Oliveira Filho (2010) destaca que o uso contínuo de tais antimicrobianos pode facilitar o desenvolvimento

de linhagens resistentes, tornando as cada vez menos susceptíveis a ação do antibiótico, elevando os custos de produção, além da possibilidade de incorporação de resíduos no produto, podendo comprometer e até desqualificar o produto final obtido.

Os principais antibióticos utilizados são à base de penicilina G, estreptomicina, tetraciclina, virginiamicina, monoensina, ou a mistura destes compostos (NARENDRANATH e INGLEDEW, 2000 *apud* LEITE, 2011). Além de caros, estes antibióticos deixam resíduos químicos nas leveduras, as quais dão margem a questionamentos sobre a utilização destas para o consumo animal e humano. Os países da Europa e os Estados Unidos possuem leis que proíbem o uso de leveduras com algum tipo de resíduo dos antibióticos (ANSELM, 2008). No Brasil, atualmente, os lotes de leveduras secas, provenientes de fermentações que utilizaram antibióticos para controle da contaminação, são incinerados.

### **3.5 O Uso de Biocidas como Alternativa ao Antibiótico**

Leite (2011) destacou os biocidas como rota alternativa aos antibióticos no setor sucroenergético. Produtos naturais que prometem agir como antibióticos, mas sem deixar resíduos na levedura, estão entrando no mercado de insumos químicos para destilarias. Os antibióticos naturais, como são chamados, passaram a ser opção para aquelas usinas que tem interesse na comercialização de leveduras integras, autolisadas ou de extrato de levedura.

Os biocidas são formulações ou produtos específicos utilizados na desinfecção do mosto, tanques e equipamentos utilizados na fermentação. Vários desses produtos atendem as exigências de agências alimentícias de alguns países, embora alguns não sejam regulamentados para uso em alimentos, por não atingirem padrões sanitários mínimos (VENTURA, [s.d.]). O uso de biocida, além de não deixar resíduo, também não provoca a resistência bacteriana, além de apresentar custo menor de produção em relação aos antimicrobianos.

O biocida pode ser definido como qualquer substância que possua um ou mais agentes ativos, geralmente, proveniente de extratos obtidos em plantas, o qual é capaz de prevenir, inibir, diminuir ou eliminar a ação de organismos vivos patogênicos e não patogênicos (CAPELLETTI, 2006). Para exercerem a sua ação os biocidas atacam os componentes celulares funcionais, controlando os microrganismos (PEREIRA, 2001). Os principais

componentes celulares funcionais em que os biocidas agem são, a parede celular, os componentes da membrana citoplasmática e no citoplasma. O acesso a estes alvos é determinado pela composição química e propriedades físico-químicas que possui cada biocida, bem como pelas interações com o material extra celular e morfologia das células (CAPELLETTI, 2006).

Os biocidas podem ser classificados em dois grandes grupos, de acordo com seu caráter químico: oxidantes, como por exemplo, o ozônio, peróxido de hidrogênio, compostos de cloro; e não-oxidantes, como compostos sulfurados, estanho, isotiazolinonas, sais de cobre, aldeídos, sais quaternário de amônio, dentre outros (PEREIRA, 2001; CAPELLETTI, 2006). Embora apresentem diferenças químicas importantes, o modo primário de ação dos biocidas oxidantes consiste em oxidar compostos constituintes das células microbianas, sendo conseqüentemente efetivos contra quase todos os tipos de microrganismos. Os biocidas oxidantes são os mais usados na indústria de alimentos.

Ademais, os biocidas não-oxidantes têm sua atividade antimicrobiana expressada sobre os microrganismos pela interferência no seu metabolismo ou pela desintegração da parede celular (PEREIRA, 2001; CAPELLETTI, 2006). O modo de aplicação do biocida é tão importante quanto à seleção, pois a simples adição do produto poderá reduzir pouco, ou até mesmo não reduzir, as contaminações microbiológicas, podendo com isso agravar os problemas (CAPELLETTI, 2006). Os fatores a considerar quando se aplica um biocida, incluem a quantidade a ser utilizada, a concentração residual que é necessária, o modo de aplicação, a frequência da adição e o ponto de adição (CHAVES, 2004).

## **3.6 Biocidas e Antibiótico Utilizados**

### **3.6.1 Extrato de Lúpulo**

O extrato de lúpulo é antibiótico alternativo, produzido a partir da extração de CO<sub>2</sub> contido na flor feminina do lúpulo. O produto contém predominantemente a fração β-ácidos naturais de extrato de lúpulos dissolvidos em Propileno Glicol de grau alimentício, é fornecido na forma líquida (ALCOOLBRAS, 2007).

Os β-ácidos possuem ação bactericida, agindo no transporte de metabólitos na membrana celular e alterando o pH intracelular. A pronunciada ação bacteriostática sobre bactérias grampositivas parece estar relacionada à interferência do grupo prenil, presente nas cadeias laterais dos β-ácidos, sobre a membrana plasmática das células, inibindo fortemente o seu crescimento (SILVA; FARIA, 2008, *apud* CAETANO, 2011).

### **3.6.2 Kamoran®**

O KAMORAN<sup>®</sup> é um tipo de antibiótico que, seletivamente, age como bactericida ou bacteriostático. A produção é obtida através da fermentação da bactéria *Streptomyces cinnamomensis*. A molécula monensina sódica cristalina, atua no controle de bactérias Gram-positivas (KAMORAN NEWS, 2009).

O KAMORAN<sup>®</sup>, por ser apresentado em embalagem hidrossolúvel, possui a necessidade de pré-diluição com água, adicionando uma proporção de solução hidroalcoólica, ou seja, 50% água e 50% álcool, em seguida para a diluição completa (QUIMICA REAL, 2012).

### **3.6.3 Óleo Essencial de Orégano**

O óleo essencial de orégano (OEO) é 100% natural, prensado a frio, obtido de matéria-prima com procedência garantida das folhas do Orégano - *Origanum Vulgare* - *Labiatae*. Com isso, são conservadas as principais propriedades físico-químicas de cada elemento extraído. O óleo de orégano, de cor esverdeada, é retirado das folhas da planta, sendo rico em substâncias químicas como o carvacrol, timol, terpenos, ácido rosmarínico além de outras substâncias benéficas, incluindo flavonoides, magnésio, cálcio, zinco, ferro, potássio, cobre, boro, manganês, vitaminas A, C, E e niacina (MUNDO dos ÓLEOS, 2012).

O óleo de orégano contém principalmente carvacrol, um composto fenólico conhecido pelas suas propriedades anti-infecciosas de largo espectro, que o tornam agente antiviral, antifúngico, antibacteriano e anti-séptico muito eficaz. Elevado número de estudos *in vitro* mostraram que o óleo de orégano e o carvacrol destroem um vasto leque de bactérias e de fungos (NATUROILS, 2011).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado nos laboratórios da FATEC/Jaboticabal em outubro de 2012. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso aplicando-se os tratamentos biocida: Testemunha (sem aplicação de controle), Kamoran<sup>®</sup> (controle positivo), Extrato de Lúpulo, Óleo Essencial de Orégano, em 5 repetições (Figura 4). O delineamento utilizado foi o em blocos para retirar a influência dos diferentes dias sobre a fermentação.

Para o Kamoran<sup>®</sup> foi utilizado a dosagem de 3 mg/L, recomendado para tratamento do fermento, segundo Química Real, 2012. Para o Extrato de Lúpulo foi utilizado 10 mg/L, segundo Química Real 2012. A dosagem do Óleo Essencial de Orégano (OEO) foi de 0,5%, conforme indicado por Bíscola (2007).

FIGURA 4 – Extrato de Lúpulo, Kamoran e Óleo Essencial de Orégano



## 4.1 Preparo do Mosto e Análises Realizadas

Para a realização do experimento foi necessário o preparo do mosto de melão que foi utilizado no processo fermentativo. Tal preparo foi feito através do uso da Cruz de Cobenze (regra das diluições), a qual teve como objetivo a correção dos sólidos solúveis (SCHENEIDER, 1979) de 85 para 14° Brix no mosto. Foi adicionada a água de diluição (água deionizada), seguindo-se da medição do Brix através do refratômetro ABBE Refractometer Quimis® para confirmação da correção realizada. O melão foi adquirido numa usina na região de Jaboticabal-SP. Foi corrigido também o pH do mosto para 4,5, com a adição de ácido sulfúrico, utilizando-se para verificação o peagômetro (PG 1800 – digital).

Após estas etapas, foi realizada a análise de determinação da Acidez (Ácido Sulfúrico) (CTC, 2005), e verificação da quantidade de ART (açúcares redutores totais), segundo Lane & Eynon (1934).

## 4.2 Processo Fermentativo e Análises Realizadas

Para o processo de fermentação foi utilizada levedura prensada (*Saccharomyces cerevisiae*) na quantidade de 30g/L de mosto. Antes do início da fermentação a levedura prensada foi colocada em quatro béqueres diferentes contendo 50ml de glicose 1%, na quantidade mencionada, permanecendo nesta solução por 1h.

Após este tempo de espera, as leveduras foram transferidas para tubos de plásticos para centrifugação (centrífuga Spencer 80-2B), a 3000rpm por 5min. Em seguida, foi retirado o sobrenadante e as leveduras foram transferidas para erlenmeyer (1L) (que simularam as dorna de fermentação), com lavagem dos tubos da centrífuga com os primeiros 100ml do mosto (primeira alimentação), adicionados para cada tratamento. Logo após, foram realizadas alimentações cronometradas de 15 em 15 minutos com 100ml de mosto até atingir 500mL, para adaptação do fermento ao mosto preparado. Na quinta alimentação, foram acrescentados, nos respectivos erlenmeyers, os tratamentos biocidas. Esperaram-se mais 15 minutos, e em seguida, foram retiradas amostras para as análises de viabilidade e contaminação. Após isso, os erlenmeyers foram colocados em Shaker (Incubadora Shaker de bancada CT-712, Cientec – Figura 5).

FIGURA 5 – Incubadora Shaker – Cientec-CT-712 para realização do processo fermentativo.



A fermentação foi monitorada (contagem de tempo - h) e para indicar o final, foi realizada análise de Brix com a utilização de densímetro. Sempre que os valores eram menores do que 1 se considerava o final da fermentação. Se no processo fosse realizada a medição e o Brix não se modificasse no período de 1 hora, a fermentação era finalizada e os valores, de Brix final e tempo de fermentação, anotados.

### 4.3 Análise de Viabilidade e Contaminação

A análise de viabilidade foi realizada conforme Lee *et al.*, (1981) para o início da fermentação, logo após 15 minutos da última alimentação e para o final, após o Brix medido ser menor do que 1, ou quando não se modificava dentro do prazo de 1h.

Para a contaminação, a determinação ocorreu através da contagem de colônias resultante do plaqueamento pelo sistema Petrifilm, no início e final da fermentação, juntamente com a análise de viabilidade. As placas Petrifilm™ (Figura 6) são sistemas prontos de meio de cultura que contém diferentes tipos de nutrientes, géis hidrossolúveis a frio, corantes e indicadores, adequados à recuperação de cada tipo de microorganismos pesquisados (3M DO BRASIL, 2012). O plaqueamento foi realizado em câmara de fluxo laminar (Pa 50 Pachane), sendo as placas colocadas em estufa (Biopar), favorecendo o crescimento de microorganismos presentes por 48h. Para a contagem das colônias de bactérias,

foi utilizada como ferramenta a lupa (Nova optical Systems XTS -20, Zoom Stereo Microscope).

FIGURA 6 - Placas Petrifilm™ - 3M-6400 para contagem de bactérias.



#### **4.4 Análises no Vinho**

A acidez sulfúrica, os Açúcares Redutores Residuais Totais (ARRT) e o teor alcoólico do vinho foram realizados conforme CTC (2005). A quantidade de álcool produzido e a eficiência fermentativa foram calculadas conforme descrito em Fernandes (2006).

#### **4.5 Análise Estatística**

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F e comparação entre médias realizadas pelo teste de Tukey, segundo Banzatto e Kronka, (2006).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Características do Mosto Utilizado para Fermentação

Nas figuras 7 a 11 se verifica através de determinadas análises o perfil inicial da fermentação em função dos dias que se seguiu o experimento. Essas análises, Brix, pH, pH corrigido, Acidez e ART do mosto, mostraram quando o mosto estava pronto para o início da fermentação. Porém, algumas correções, como a do pH e concentração de açúcares, tiveram que ser realizadas. Observa-se também nessas figuras que o mosto estava em boas condições para o início da fermentação. Nota-se que, com exceção da acidez, o resultado das análises se manteve constantes, isso muito provavelmente se deu devido às condições adequadas do preparo do mosto.

FIGURA 7 - Brix do mosto de melaço para os dias de Fermentação.

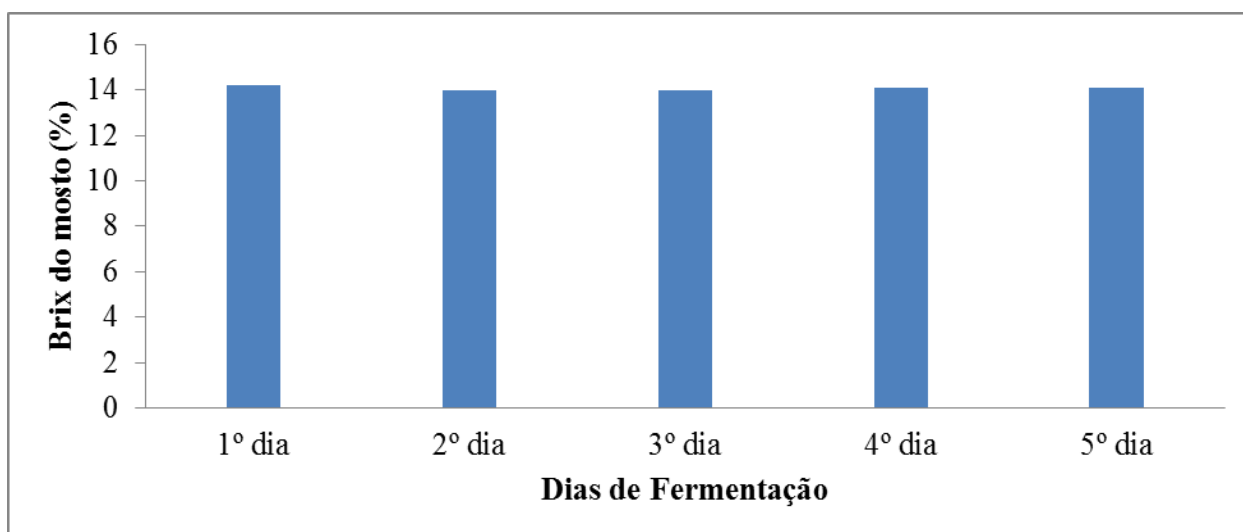


FIGURA 8 – pH do mosto de melão sem correção para os dias de Fermentação antes da correção para o mosto.

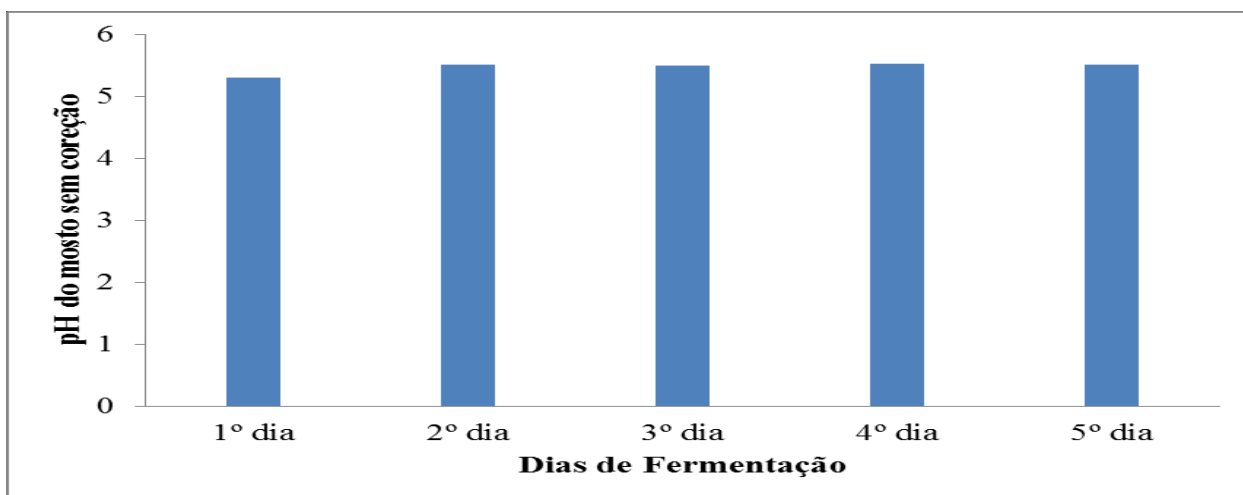


FIGURA 9 – pH corrigido do mosto de melão para os dias de Fermentação.

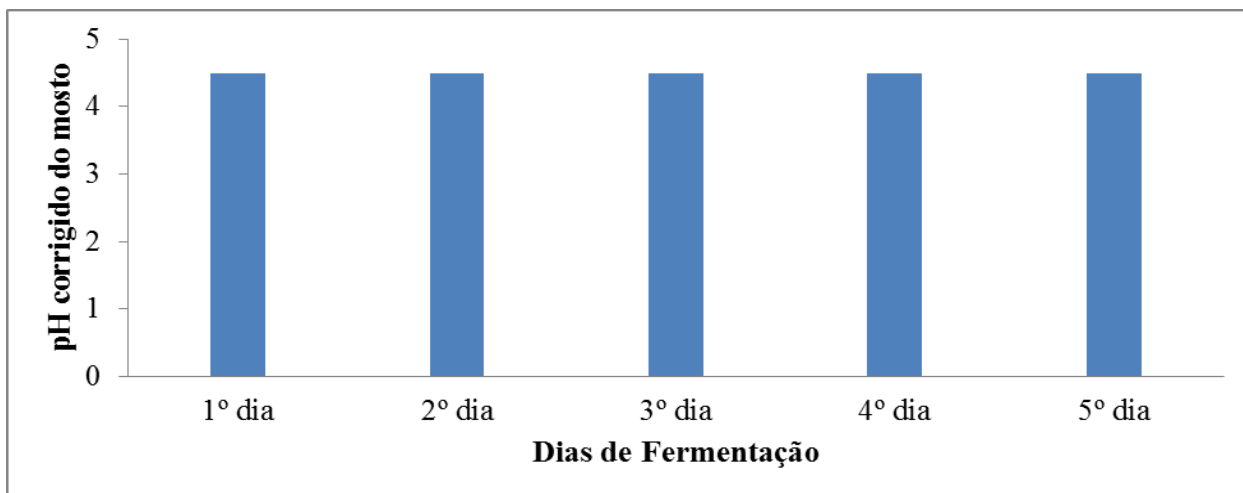


FIGURA 10 – Acidez do mosto de melão para os dias de fermentação.

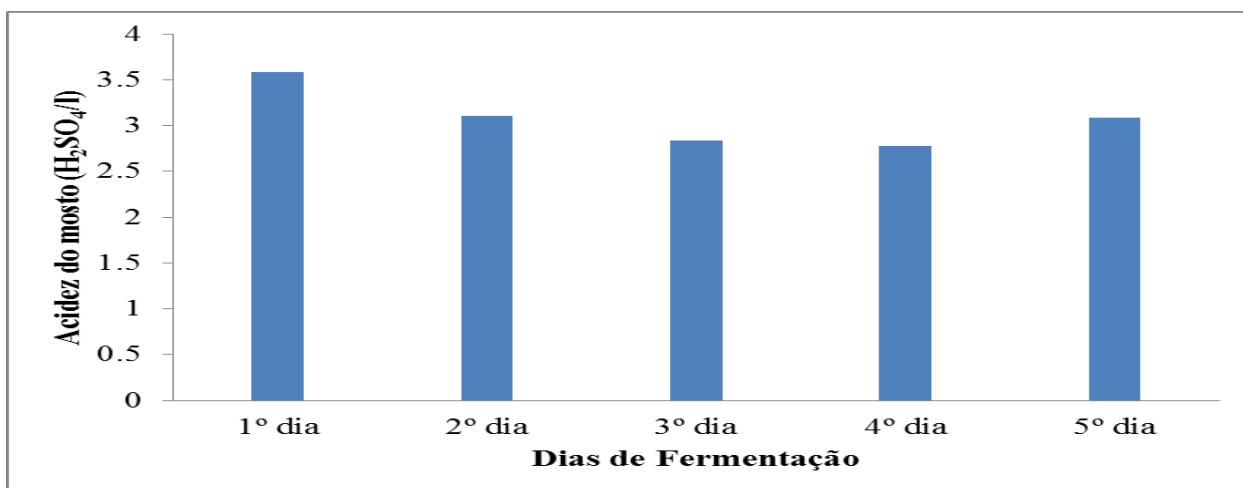
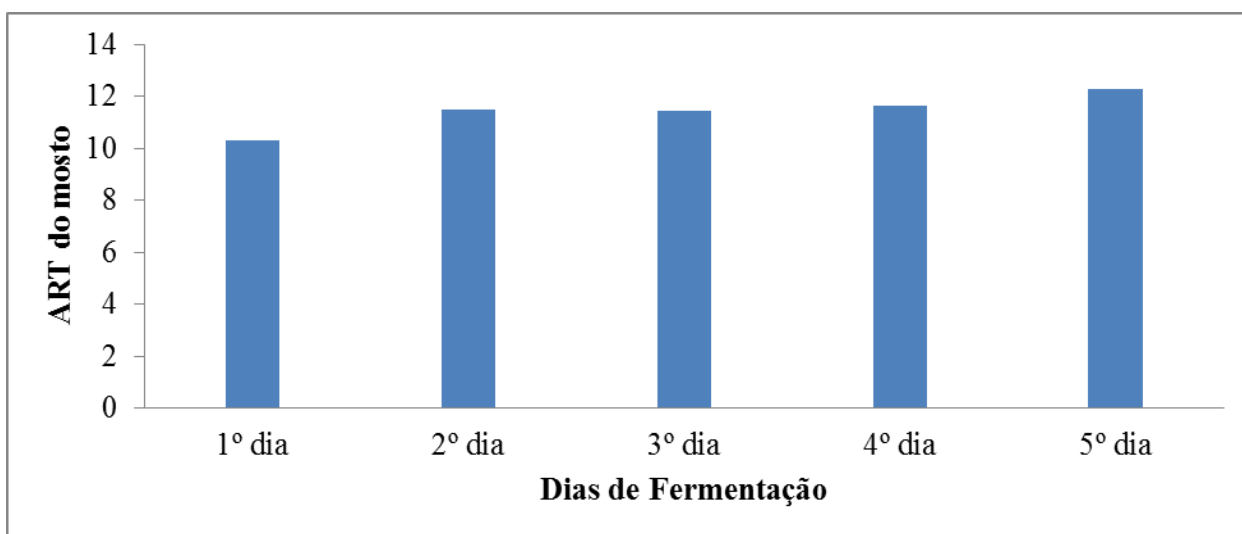


FIGURA 11 – ART do mosto de melação para os dias de fermentação.



## 5.2 Aplicação dos Tratamentos Biocidas e a Qualidade do Vinho Produzido

Na Tabela 1 se verifica o perfil final da fermentação através das análises realizadas no vinho. Foi verificado que houve diferença significativa para os tratamentos biocidas para o Brix final e acidez do vinho. O Brix final era para ser determinado com valores menores do que 1 ao final da fermentação. Entretanto, durante o processo fermentativo, após 8h, se verificou que o Brix apresentava valores sempre maiores do que 1. A medição foi realizada mais de duas vezes, com intervalos de 1h e o Brix final ficou ao redor de 2,5 a 3 e isso se manteve para todos os dias (Figura 12). Portanto, determinou-se que se a fermentação permanece num número abaixo de 4, e que fosse constante por 1h, seria decretado o final do processo fermentativo. Na maioria das usinas que utilizam mosto de melação para a fermentação, o final do processo é determinado quando esse parâmetro é menor do que 4.

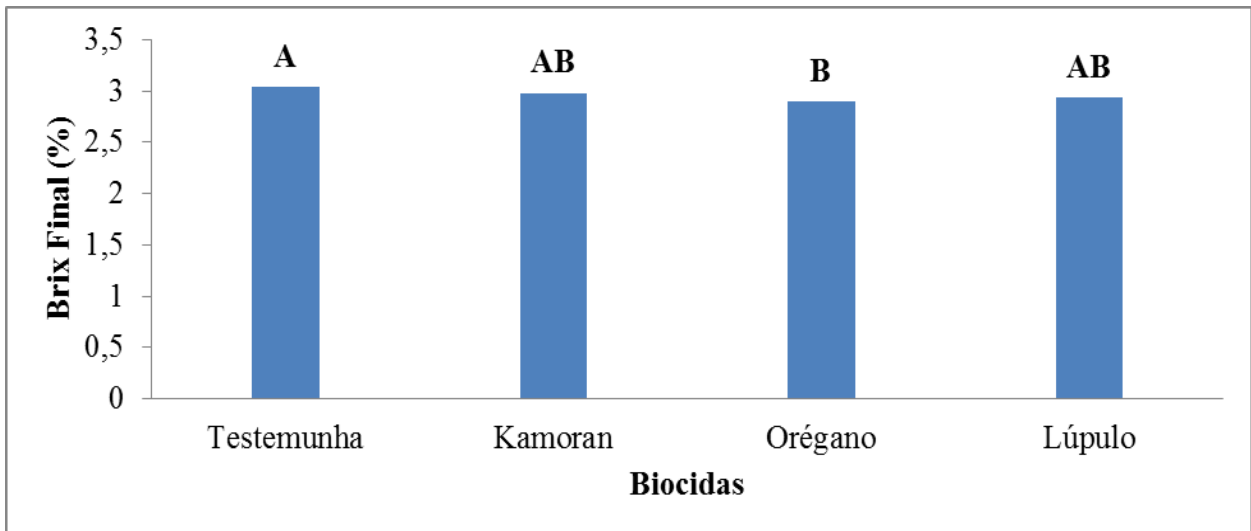
Em todos os dias, o final foi ao mesmo tempo para todos os tratamentos (dentro de 8h) e se observou que o OEO apresentou valores menores que o tratamento testemunha, o que indica maior utilização de açúcar. No entanto, esse dado não foi confirmado pela análise de ARRT que mostrou que a maioria dos açúcares redutores haviam sido consumidos e não houve diferença significativa entre os tratamentos.

TABELA 1 – Análise de variância e teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) para Brix Final (%), ARRT (%), Acidez ( $\text{gH}_2\text{SO}_4/\text{L}$ ), pH do vinho, Teor Alcolóico (%) Álcool Produzido (mL) e Eficiência Fermentativa (%) para os tratamentos Biocidas (Testemunha, Kamoran, Orégano e Lúpulo) empregados na fermentação com mosto de melão em diferentes dias

<b>Causas de variação</b>	<b>Brix Final</b>	<b>ARRT</b>	<b>Acidez</b>	<b>pH</b>	<b>Teor alcóolico</b>	<b>Álcool Produzido</b>	<b>Eficiência</b>
<b>Tratamentos (F)</b>	5,4872 <sup>*</sup>	0,2658 <sup>ns</sup>	7,7574 <sup>**</sup>	2,6041 <sup>ns</sup>	3,0966 <sup>ns</sup>	3,0966 <sup>ns</sup>	3,1297 <sup>ns</sup>
Testemunha	3,04 A	0,44 A	3,81 AB	3,82 A	7,99 A	28,76 A	86,36 A
Kamoran	2,98 AB	0,46 A	3,87 A	3,80 A	8,34 A	30,01 A	90,22 A
Orégano	2,90 B	0,45 A	3,60 BC	3,75 A	8,22 A	29,61 A	89,00 A
Lúpulo	2,94 AB	0,44 A	3,49 C	3,86 A	8,36 A	30,11 A	90,46 A
<b>Blocos (F)</b>	39,4615 <sup>**</sup>	11,7114 <sup>**</sup>	1,5632 <sup>ns</sup>	149,5651 <sup>**</sup>	11,2022 <sup>**</sup>	11,2022 <sup>**</sup>	35,1855 <sup>**</sup>
1	2,78 B	0,37 B	3,75 A	3,88 B	8,07 BC	29,03 BC	96,57 A
2	3,10 A	0,47 A	3,66 A	3,10 C	8,06 BC	29,02 BC	86,46 B
3	3,15 A	0,45 A	3,58 A	4,00 AB	8,53 AB	30,71 AB	91,99 A
4	3,03 A	0,49 A	3,69 A	4,00 AB	8,68 A	31,25 A	91,88 A
5	2,78 B	0,46 A	3,81 A	4,05 A	7,81 C	28,10 C	78,16 C
<b>CV</b>	1,92	5,80	3,84	1,72	2,64	2,64	2,67

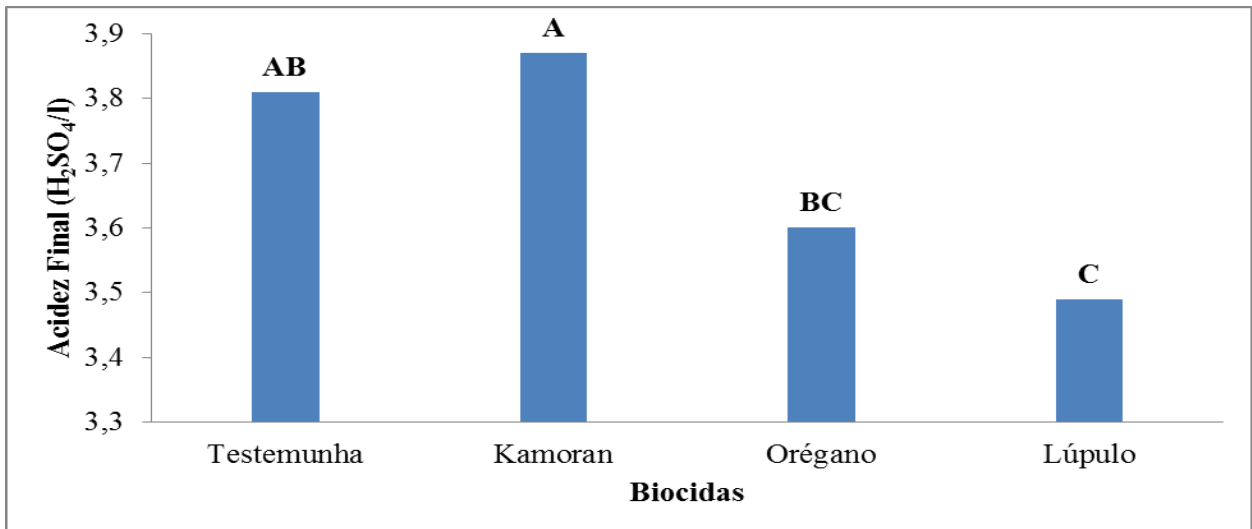
<sup>ns</sup> – não significativo ( $P > 0,05$ ); <sup>\*</sup> Significativo a 5% de probabilidade ( $P \leq 0,05$ ); <sup>\*\*</sup> Significativo a 1% de probabilidade ( $P \leq 0,01$ );

FIGURA 12 – Efeitos dos tratamentos Biocidas para o Brix Final do vinho. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ )



A acidez sulfúrica é parâmetro que indica os efeitos da contaminação. Quanto maior o valor, mais elevada é a quantidade de ácidos produzidos na fermentação pelos microrganismos contaminantes. Na Figura 13 se verifica que o tratamento que utilizou o lúpulo apresentou menores valores de acidez, indicando que esse tratamento foi efetivo para o controle da fermentação comparado aos demais tratamentos. Entretanto, não foi suficiente para aumentar o teor alcoólico do vinho, etanol produzido e a eficiência fermentativa, apesar de os dados apresentarem tendência de aumento de produção para o lúpulo, porém, esse efeito pode ser, segundo a análise estatística, a interferência do acaso nos resultados desse biocida em comparação aos demais tratamentos.

FIGURA 13 – Efeito dos tratamentos Biocidas para Acidez Final do vinho. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ )



Para os dias de fermentação se verifica que no primeiro e no quinto dia o Brix final do vinho (Figura 14) foi menor indicado que nesses dias a fermentação terminou com Brix menores. Entretanto, somente no primeiro dia a quantidade de ARRT (Figura 15) foi menor do que nos outros. O primeiro dia se esperou mais tempo para que se confirmasse o final da fermentação. Foram 3h a mais do que os outros dias para verificar se o Brix se alterava ou não. O tempo maior de fermentação no primeiro dia favoreceu o maior consumo de ARRT.

FIGURA 14 – Efeito dos dias de fermentação sobre a quantidade de Brix Final do vinho. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ )

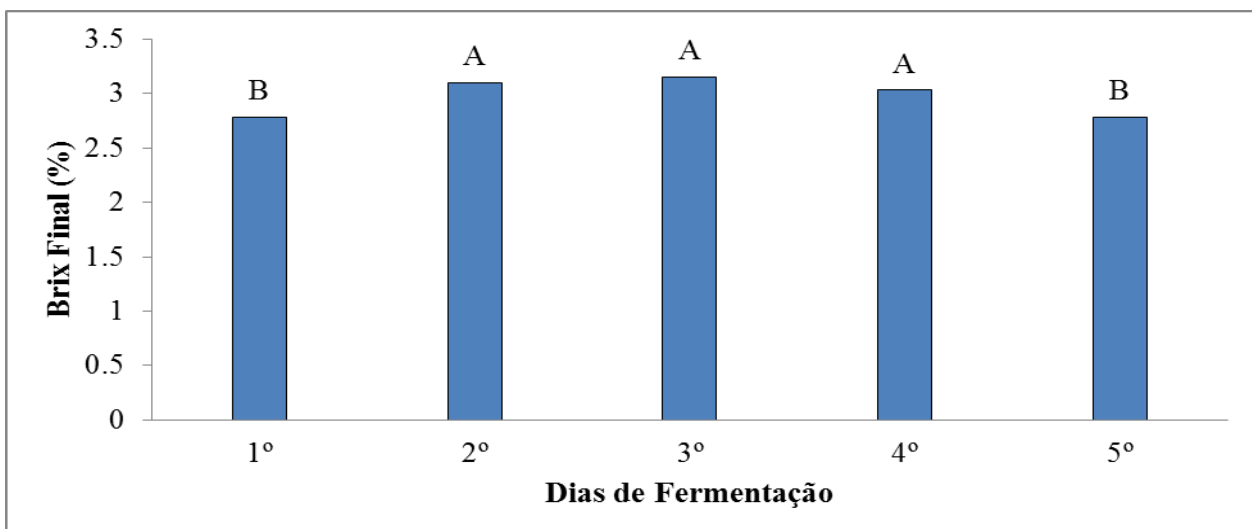
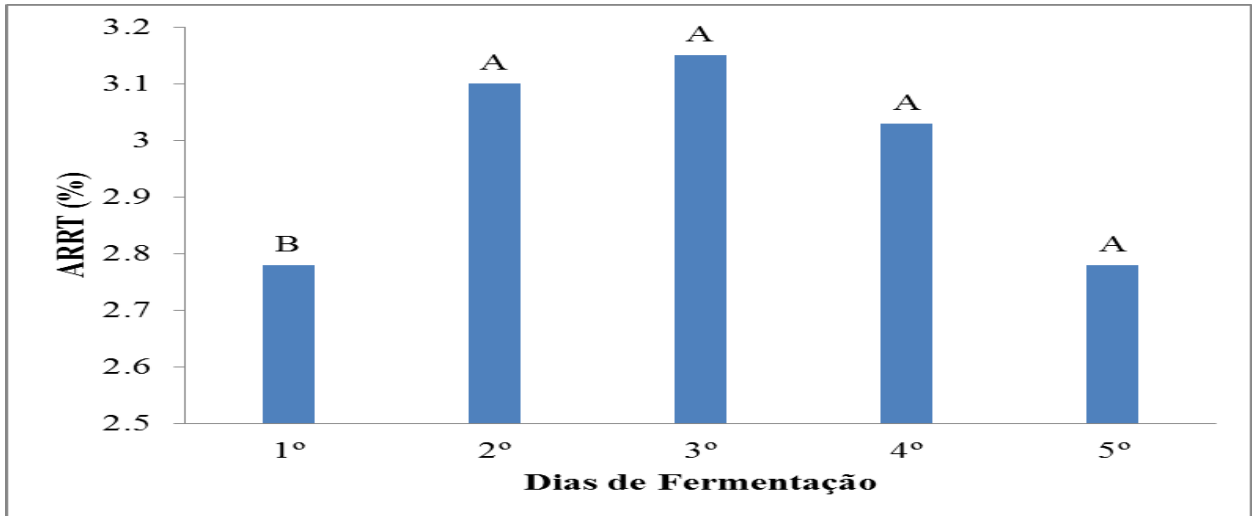
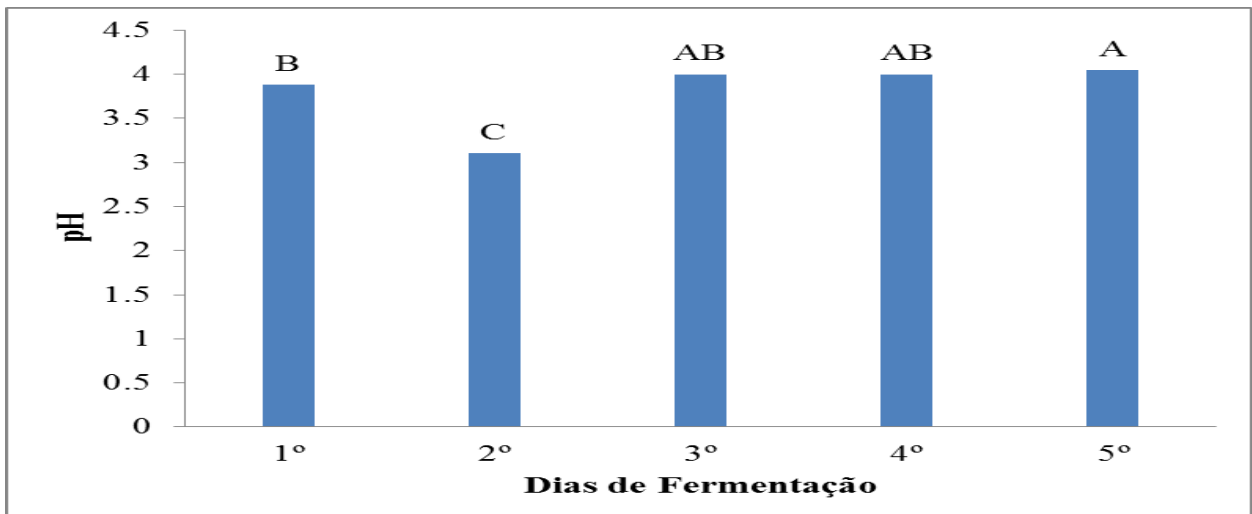


FIGURA 15 – Efeitos dos dias de fermentação sobre a quantidade de ARRT do vinho. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ )



O pH do vinho (Figura 16) se apresentou menor no segundo dia em relação ao quinto dia, embora os valores de acidez permanecessem os mesmos durante o período experimental. O pH do segundo dia (pH=3,10) está dentro da faixa aceitável de valores a encontrar após a fermentação. O mosto tem o pH diminuído para 4,5 e durante o processo fermentativo são produzidos ácidos, tanto pelas leveduras do processo quanto pelos contaminantes, o que faz aumentar a concentração de hidrogênio na solução. Quanto maior o pH ao final do processo, melhor é a qualidade da fermentação.

FIGURA 16 – Efeito dos dias de fermentação sobre o pH do vinho. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ )



Embora se utilizou sempre a mesma matéria-prima (o melão foi o mesmo para todos os dias) a fermentação se mostrou diferente para a produção de etanol. Para o teor alcoólico (Figura 17) e álcool produzido (Figura 18) foi observado que o quarto dia de fermentação apresentou maior produção em relação ao quinto. Sendo que no último dia a eficiência fermentativa (Figura 19) foi a menor. Isso indica acerto em separar em blocos os dias de fermentação, pois mesmo utilizando matéria-primas semelhantes a fermentação é sujeita a vários fatores que podem interferir nos resultados avaliados nos biocidas, e os blocos impedem a influência desses fatores na ação dos biocidas, de modo que essa ação encontrada no estudo sobre o Brix final, acidez do vinho e contaminações seja somente ao efeito dos biocidas.

FIGURA 17 – Efeito dos dias de fermentação sobre o Teor Alcoólico do vinho. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ )

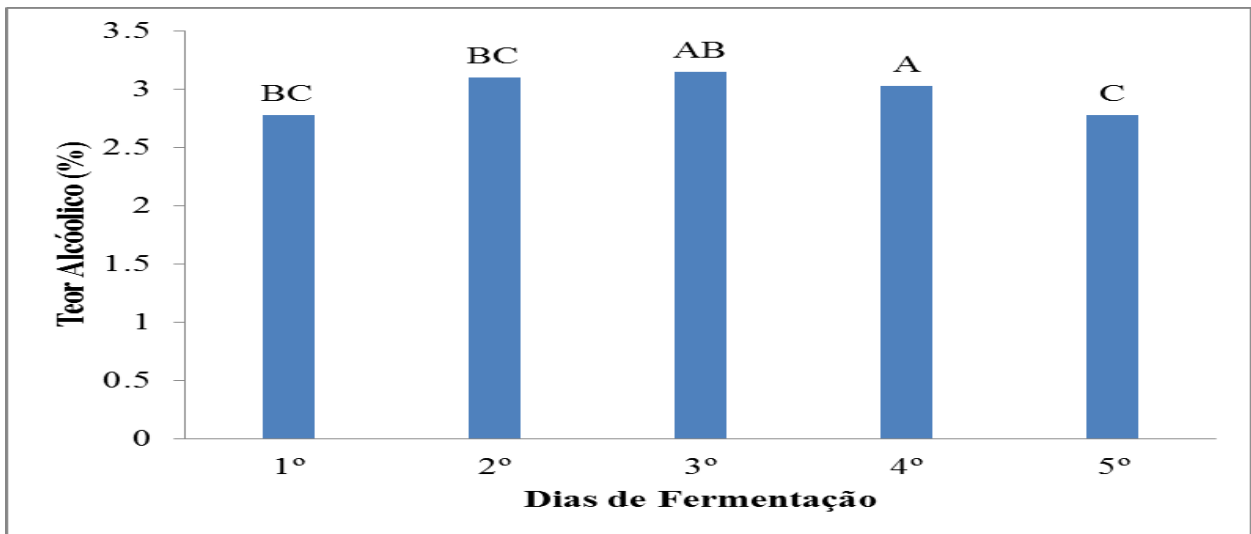


FIGURA 18 – Efeito dos dias de fermentação sobre a quantidade de Álcool produzido no vinho. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ )

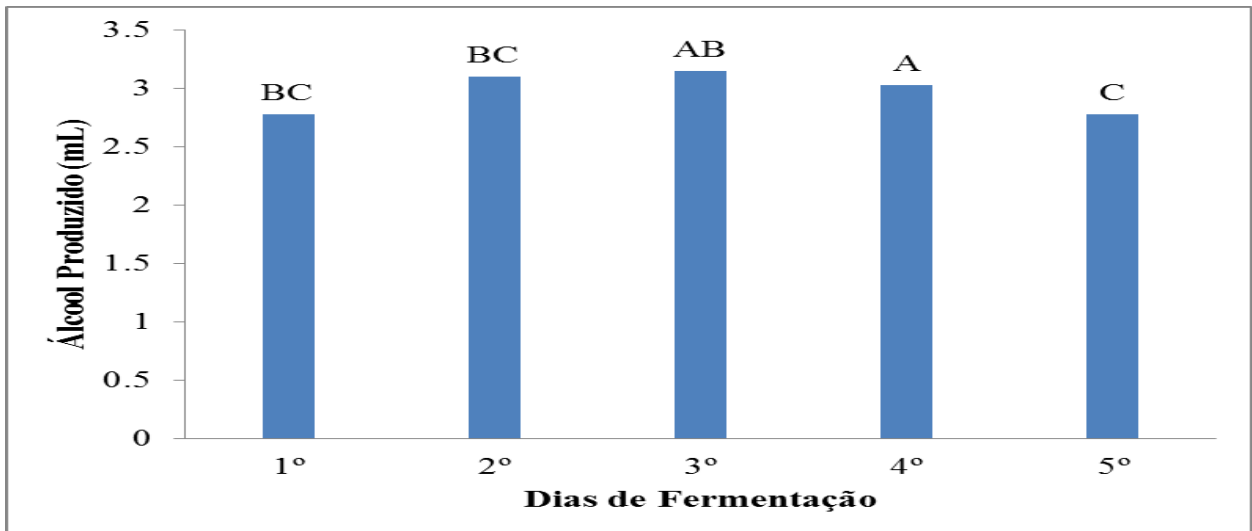
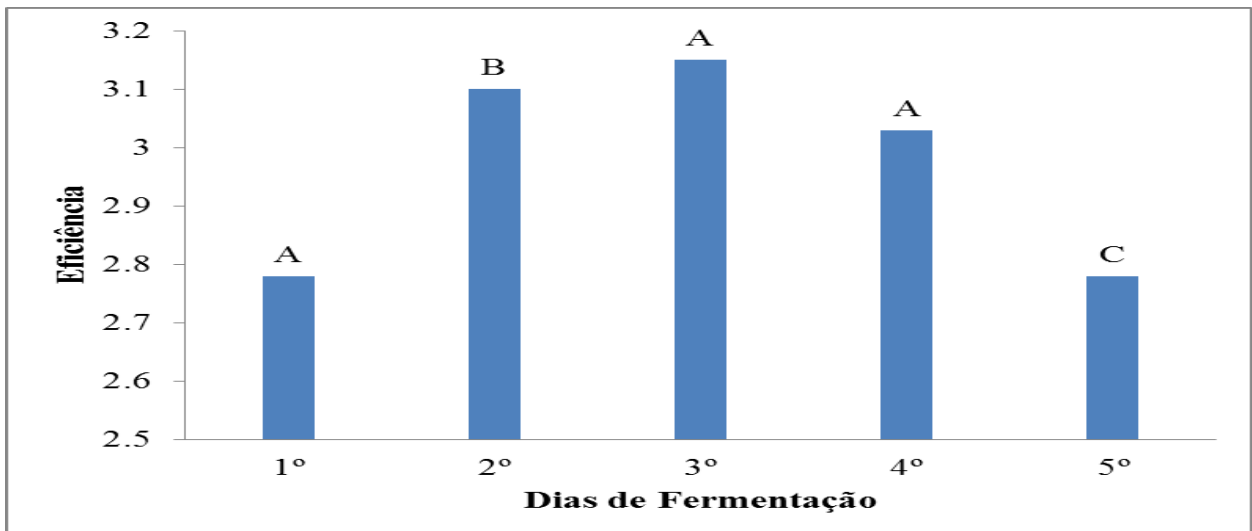


FIGURA 19 – Efeito dos dias de fermentação na Eficiência Fermentativa. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ )



### 5.3 Efeitos dos Biocidas sobre a Viabilidade Celular e Contaminação no Processo Fermentativo

Na tabela 2 se verificou que não houve efeito significativo para a ação dos biocidas na viabilidade das células de levedura. Esse fator é importante porque se o biocida reduzir a viabilidade celular indica que está eliminando também o microrganismo principal do processo e

assim causando efeito contrário ao desejado, o de favorecimento das leveduras em relação às bactérias. Para a contaminação inicial se observa apenas efeito significativo para os dias de fermentação, e para a contaminação final, para os tratamentos biocidas.

O lúpulo foi eficiente no combate as bactérias, pois em alguns dias, houve controle total, não ocorrendo o aparecimento de colônias nas placas (Figura 20). Enquanto, o tratamento testemunha apresentou maior quantidade de microrganismos contaminantes. Embora, não houve efeito significativo para o teor alcoólico (Tabela 1), a redução da contaminação final é muito importante. Nas usinas é feita a reutilização das leveduras para novas fermentações. As mesmas são separadas do vinho na centrifugação e são encaminhadas para o tratamento do fermento. Se a contaminação no vinho é menor, o tratamento empregado nas cubas terá melhor efeito e o fermento adicionado ao próximo processo fermentativo será de melhor qualidade. Portanto, a aplicação de lúpulo durante a fermentação deve ser cogitada. No entanto, depende do preço que o produto é encontrado no mercado e na padronização da produção, visto que existem muitas espécies de lúpulo. Mais estudos com outras dosagens devem ser realizados para se encontrar aquela ideal economicamente para o combate à contaminação. Ademais, o combate à contaminação não deve ser com a utilização de somente um produto ou método de controle.

O óleo de orégano não diferiu do tratamento testemunha e o Kamoran<sup>®</sup> apresentou resultado medianos no combate à contaminação. O antibiótico é o mais utilizado atualmente pelas usinas e, com os resultados encontrados nesse estudo, verifica-se a oportunidade de trabalho com lúpulo. A levedura seca, na qual foi aplicada o antibiótico, deverá ser incinerada. No entanto, quando há aplicação de biocida natural esse produto pode ser direcionado para ração animal.

Para os dias de fermentação se verifica efeito significativo somente para a contaminação inicial (Tabela 2). No segundo dia a contaminação foi maior do que no primeiro dia (Figura 21). Esse resultado mostra que o aparecimento de bactérias, embora se tenha utilizado a mesma matéria-prima para o preparo do mosto, pode ocorrer através de outros fatores como a higiene do operador, cuidado com a água de diluição e higiene dos equipamentos utilizados. No entanto, a contaminação final foi semelhante para todos os dias (Tabela 2).

TABELA 2 – Análise de variância e teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) para Viabilidade Inicial (%), Viabilidade Final (%), Contaminação Inicial (UFC/mL) e Contaminação Final (UFC/mL) para os tratamentos biocidas (Testemunha, Kamoran, Orégano e Lúpulo) empregados na fermentação com mosto de melão em diferentes dias.

<b>Causas de variação</b>	<b>Viab. Inicial</b>	<b>Viab. Final</b>	<b>Cont. Inicial</b>	<b>Cont. Final</b>
<b>Tratamentos (F)</b>	0,6289 <sup>ns</sup>	0,9983 <sup>ns</sup>	1,1660 <sup>ns</sup>	7,61 <sup>**</sup>
Testemunha	83,84 A	79,53 A	152,60 A	35,39 A
Kamoran	72,71 A	69,06 A	135,80 A	4,40 BC
Orégano	84,72 A	82,44 A	101,00 A	28,18 AB
Lúpulo	81,24 A	78,42 A	103,60 A	0,53 C
<b>Blocos (F)</b>	0,4082 <sup>ns</sup>	1,2465 <sup>ns</sup>	5,0226 <sup>*</sup>	2,46 <sup>ns</sup>
1	78,72 A	67,95 A	46,50 B	20,68 A
2	76,38 A	78,57 A	207,50 A	24,27 A
3	76,20 A	86,72 A	113,75 AB	2,64 A
4	85,89 A	72,88 A	107,50 AB	4,57 A
5	85,96 A	80,68 A	141,00 AB	21,32 A
<b>CV</b>	19,16	16,74	42,28	53,58

<sup>ns</sup> – não significativo ( $P > 0,05$ ); <sup>\*</sup> Significativo a 5% de probabilidade ( $P \leq 0,05$ ); <sup>\*\*</sup> Significativo a 1% de probabilidade ( $P \leq 0,01$ );

FIGURA 20 – Efeito dos tratamentos Biocidas para a Contaminação Final do vinho. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ )

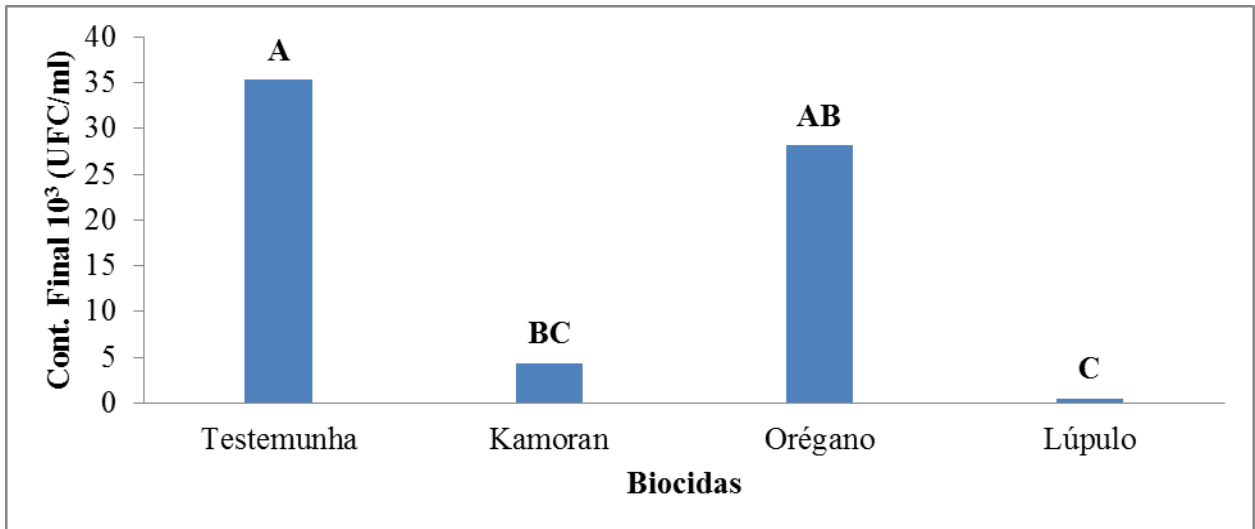
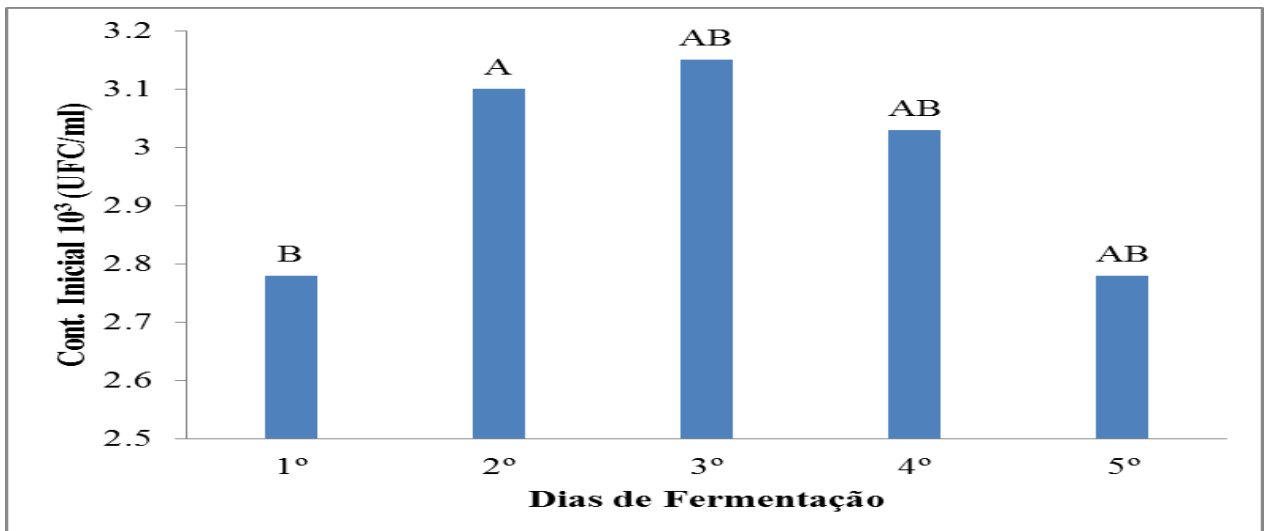


FIGURA 21 – Efeito dos dias de fermentação sobre a Contaminação Inicial. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ )



#### 5.4 Ação dos Tratamentos Biocidas sobre a Formação de Espuma Durante a Fermentação

Um resultado inesperado desse estudo foi a observação que durante a utilização dos tratamentos: OEO e lúpulo eliminaram a espuma produzida pelo processo fermentativo (Figuras 22 a 24). Essa característica é muito importante, porque há gasto elevado de antiespumantes na

usina para combate ao derramamento da dorna. Se o processo de fermentação for contínuo o espalhamento da espuma para a segunda dorna é prejudicial. Ou seja, é um problema muito sério. Provavelmente, os óleos (os dois biocidas) rompem a tensão superficial e impedem a formação de espuma no processo.

No primeiro dia de experimento, pensou-se que nos tratamentos onde havia sido aplicado biocidas, principalmente o orégano, as leveduras pareciam estar mortas, mas ao final do processo se verificou que isso não ocorreu (Tabela 2). O lúpulo traz a vantagem, então, de combater a contaminação (Figura 20) e ao mesmo tempo impedir a formação de espumas nas dornas (Figura 24). Mais uma razão para se pensar na utilização desse produto durante o processo fermentativo.

FIGURA 22 – Formação de espuma no tratamento Testemunha

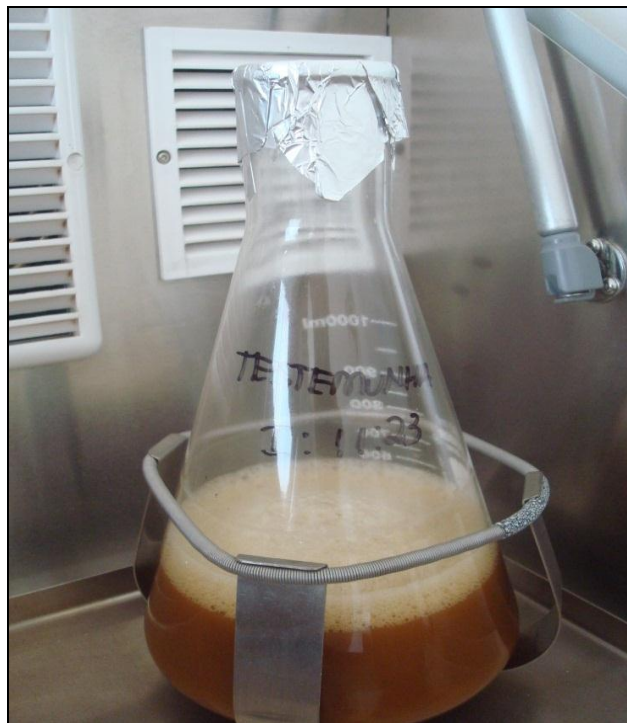


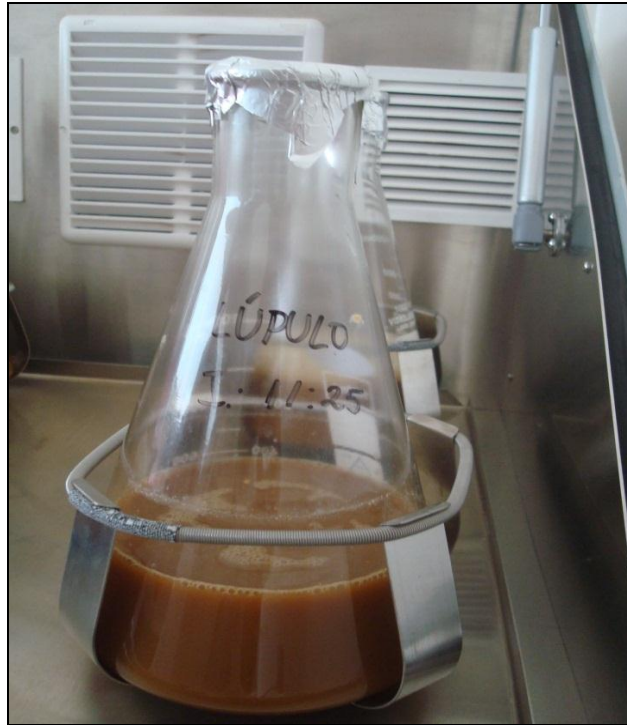
FIGURA 23 – Formação de espuma no tratamento Kamoran®



FIGURA 24 – Formação de espuma no tratamento Orégano



FIGURA 25 – Formação de espuma no tratamento Lúpulo



## 6 CONCLUSÕES

A aplicação de Extrato de Lúpulo na dosagem utilizada neste estudo é suficiente para reduzir a contaminação final da fermentação e diminuir a acidez do vinho fermentado com mosto de melação.

Para o tempo de fermentação de oito horas o óleo essencial de orégano apresenta o menor Brix final em relação aos demais tratamentos.

Os dias de fermentação são diferentes e influenciam na quantidade do Brix Final, ARRT, pH, teor alcoólico, álcool produzido e eficiência fermentativa para a fermentação de mosto de melação.

O óleo de orégano e o Extrato de Lúpulo eliminam a espuma formada durante a fermentação do mosto de melação.

## REFERÊNCIAS

- 3M DO BRASIL. Placa **3M™ Petrifilm™ para Contagem de Aeróbios**. Disponível em: <[http://solutions.3m.com.br/wps/portal/3M/pt\\_BR/Microbiology/FoodSafety/product-information/product-catalog-br/?PC\\_7\\_RJH9U5230GD8A0I8TS8A0O2C43000000\\_nid=J5W756N61VbeRNSP8PD320gl](http://solutions.3m.com.br/wps/portal/3M/pt_BR/Microbiology/FoodSafety/product-information/product-catalog-br/?PC_7_RJH9U5230GD8A0I8TS8A0O2C43000000_nid=J5W756N61VbeRNSP8PD320gl)>. Acesso em: 22 nov. 2012.
- ALCARDE, A. R.; WALDER, J. M. M. Efeito da radiação gama na sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (cepa M-300-A) em mosto de mel de cana-de-açúcar. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.54, n.3, 1997. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S01030161997000200015&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S01030161997000200015&script=sci_arttext&tlng=pt)>. Acesso em: 12 nov. 2012
- ALCARDE, A.R.; HORII, J.; NOBREI, T.P. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 27, n.1, p. 20-25, 2007.
- ALCOOBRAS. **Inimigo Natural**. São Paulo, v.9, n.110, 2007.
- AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A. J. Infecção na fermentação: como evitá-las. **STAB Álcool & Açúcar**, Piracicaba, v. 5, p. 12-18, 1982.
- AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; CAMPOS, H. Infecção, problema sério na produção de álcool. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS DO BRASIL, 2., Rio de Janeiro, 1981. **Anais**. Piracicaba: STAB, 1981. v.1, p.158-168
- ANSELMINI, Renato. **Jornal Cana**, Campinas, p. 51, 2008.
- BADIN, F. **Biocidas naturais e seus reflexos sobre contaminantes na produção de etanol**. 2010. 51 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação Agrícola**. 3. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006.
- BARBOSA, N. F. **Aspectos teóricos e práticos do processo de fermentação alcoólica**. 2012. 46 f. Trabalho de Graduação (Tecnologia em Biocombustíveis) – Centro de Tecnologia em Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, Araçatuba, 2012. Disponível em: <<http://www.fatecaracatuba.edu.br/suporte/upload/Biblioteca/BIO%2017711207143%20Autor%20Natalia%20Franca%20Barbosa.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2012.
- BASSO, L.C.; AMORIM, H.V; OLIVEIRA, A.J. Leveduras selecionadas: permanência no processo industrial monitorada pela técnica da cariotipagem. In: ALCARDE, A. R.; WALDER,

J. M. M. Efeito da radiação gama na sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (cepa M-300-A) em mosto de mel de cana-de-açúcar. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.54, n.3, 1997. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S01030161997000200015&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S01030161997000200015&script=sci_arttext&tlng=pt)>. Acesso em: 12 nov. 2012.

BERTELLI, L. G. **Dezesseis anos de Proalcool**. In: SILVA, K.C.S. Avaliação da ação de diferentes antibióticos sobre o crescimento de microorganismos contaminantes do processo fermentativo par a obtenção do etanol. 2012. 50 f. Trabalho de Graduação (Tecnologia em Biocombustíveis) – Centro de Tecnologia em Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, Araçatuba, 2012. Disponível em:

<<http://www.fatecaracatuba.edu.br/suporte/upload/Biblioteca/BIO%2017701020001.pdf>>. Acesso em: 22 out. 2012.

BÍSCOLA, V. **Influência da matriz alimentar no efeito antimicrobiano de óleo essencial de orégano e nisina contra *Listeria monocytogenes*: avaliação em modelos cárneos**. 2007. 74f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, Faculdade de Ciências Farmaceuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

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

CAETANO, A. C. G.; MADALENO, L. L. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. **Ciência & Tecnologia: Fatec-JB**, v.2, n.1, p.27-37, 2011. Disponível em:

<[http://www.fatecjab.edu.br/revista/2011\\_v02\\_n01/3\\_caetano.pdf](http://www.fatecjab.edu.br/revista/2011_v02_n01/3_caetano.pdf)>. Acesso em: 02 out. 2012.

CAIXETA, Danila Soares. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável**. 2008. 75f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CAPELLETTI, R. V. **Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais**. 2006. 81f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

CARDOSO, S. C.; COELHO, T. M.; FILHO, N.A. Controle microbiológico do caldo de cana por meio de Dióxido de Cloro. In: ENCONTRO DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO AGROINDUSTRIAL, Campo Mourão, 4., 2010. **Anais eletrônicos...** Campo Mourão: FECILCAM, 2010. Disponível em: <[http://www.fecilcam.br/anais\\_iveepa/arquivos/5/5-09.pdf](http://www.fecilcam.br/anais_iveepa/arquivos/5/5-09.pdf)>. Acesso em: 29 out. 2012.

CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. **Fermentação Descontínua**. In: SANTOS, A. M. Fermentação Alcoólica com Levedura Imobilizada em Colmos de Bambu e em Fibra de Coco. 2008a. 69 f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Unidade Acadêmica Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008a. Disponível em: <[http://www.ctec.ufal.br/posgraduacao/ppgeq/dissertacao\\_adeilton.pdf](http://www.ctec.ufal.br/posgraduacao/ppgeq/dissertacao_adeilton.pdf)>. Acesso em: 10 out. 2012.

CAVALCANTI, G. A. **A dinâmica econômica do proálcool: acumulação e crise 1975-1989.** In: SILVA, K.C.S. Avaliação da ação de diferentes antibióticos sobre o crescimento de microorganismos contaminantes do processo fermentativo par a obtenção do etanol. 2010. 50 f. Trabalho de Graduação (Tecnologia em Biocombustíveis) – Centro de Tecnologia em Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, Araçatuba, 2010. Disponível em: <<http://www.fatecaracatuba.edu.br/suporte/upload/Biblioteca/BIO%2017701020001.pdf>>. Acesso em: 25 out. 2012.

CHAVES, Lúcia da Conceição Diogo. **Estudo da cinética de formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável.** 2004. 156f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2004.

CONAMA. **A Produção Brasileira de Etanol.** Disponível em: <[http://www.mma.gov.br/estruturas/sqa\\_pnla/\\_arquivos/item\\_6.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/sqa_pnla/_arquivos/item_6.pdf)>. Acesso em: 20 set. 2012.

CTC. **Manual de métodos de análises para açúcar.** Piracicaba: CTC, 2005.

EGUCHI, J.Y. Ativos antimicrobianos utilizados na indústria. **Revista Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**, São Paulo, n.22, p.35-39, 2007. Disponível em: <[http://www.sbcc.com.br/sumario\\_22.htm](http://www.sbcc.com.br/sumario_22.htm)>. Acesso em: 15 maio 2012.

FERNANDES, A.C. **Cálculos na agroindústria da cana-de-açúcar.** Piracicaba, 2006.

FILHO, J.C.A.; PRESSANHA, F.S.A. Otimização dos métodos tradicionais e busca de novas alternativas de obtenção de etanol visando a sua viabilidade. Bolsista de Valor: **Revista de divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense**, v.2, n.1, p. 245-251, 2012. Disponível em: <<http://essentiaeditora.iff.edu.br/index.php/BolsistaDeValor/article/viewFile/2423/1311>>. Acesso em: 27 out. 2012.

KAMORAN NEWS. Kamoran no controle bacteriano em fermentações alcoólicas que sangram e secam levedura seca. v.1, n.1, 2009. Disponível em: <[http://www.quimicareal.com.br/downloads/kamoran\\_news.pdf](http://www.quimicareal.com.br/downloads/kamoran_news.pdf)>. Acesso em: 20 out. 2012.

LANE, J.H.; EYNON, L. **Determination of reducing sugars by Fehling solution with methylene blue indicator.** Norman Rodger, London, 8p. (1934).

LEITE, I.R. **Avaliação da Ação de Antibiótico Natural de Fermentação Alcoólica Contaminada por Cultura Mista.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011. Disponível em:

<[http://www.btdt.ufu.br/tde\\_arquivos/12/TDE-2012-01-26T135703Z-2758/Publico/d.pdf](http://www.btdt.ufu.br/tde_arquivos/12/TDE-2012-01-26T135703Z-2758/Publico/d.pdf)>. Acesso em: 08 out. 2012.

LIMA, U.A. **Produção de Etanol**. In: SANTOS, A. M. Fermentação Alcoólica com Levedura Imobilizada em Colmos de Bambu e em Fibra de Coco. 2008a. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Unidade Acadêmica Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008a. Disponível em: <[http://www.ctec.ufal.br/posgraduacao/ppgeq/dissertacao\\_adeilton.pdf](http://www.ctec.ufal.br/posgraduacao/ppgeq/dissertacao_adeilton.pdf)>. Acesso em: 10 out. 2012.

LOPES, J. J. C. **Bagaço de nutrientes minerais no processo Melle-Boinot de fermentação alcoólica**. 1989, 74 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989. Disponível em: <[http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/diaadia/diadia/arquivos/File/conteudo/veiculos\\_de\\_comunicacao/CTA/VOL18N4/CTA18N4\\_9.pdf](http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/diaadia/diadia/arquivos/File/conteudo/veiculos_de_comunicacao/CTA/VOL18N4/CTA18N4_9.pdf)>. Acesso em: 13 out. 2012.

LUCCHESI, E. G. **Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes in vitro e avaliação de sua susceptibilidade a biocidas**. 2006. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MAFRA, Alan *et al.* **Produção de Álcool Combustível**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina – Ufsc Departamento de Engenharia Química e de Alimentos-eqa, 2009. Disponível em: <[www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc\\_eng...2009\\_1/.../etanol.DOC](http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng...2009_1/.../etanol.DOC)>. Acesso em: 16 out. 2012.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Brasil: Projeções do Agronegócio 2011/2012 a 2021/2022**. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/Projecoes%20do%20Agronegocio%20Brasil%202011-20012%20a%202021-2022%20\(2\)\(1\).pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/Projecoes%20do%20Agronegocio%20Brasil%202011-20012%20a%202021-2022%20(2)(1).pdf)>. Acesso em: 22 nov. 2012.

MUNDO DOS ÓLEOS. **Oleo de Coco Extra Virgem**. Disponível em: <<http://www.mundodosoleos.com/oleo-de-coco-extra-virgem-60-capsulas-mundo-dos-oleos>>. Acesso em: 21 set. 2012.

NARENDRANATH, N.V.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, WM. **Urea Hydrogen Peroxide Reduces the Numbers of Lactobacilli, Nourishes Yeast, and Leaves No Residues in the Ethanol Fermentation**. In: LEITE, I.R. Avaliação da Ação de Antibiótico Natural de Fermentação Alcoólica Contaminada por Cultura Mista. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011. Disponível em: <[http://www.btdt.ufu.br/tde\\_arquivos/12/TDE-2012-01-26T135703Z-2758/Publico/d.pdf](http://www.btdt.ufu.br/tde_arquivos/12/TDE-2012-01-26T135703Z-2758/Publico/d.pdf)>. Acesso em: 08 out. 2012.

NATUROILS. **Oleos Essencias: Oleo Essencial de Oregano**. Disponível em: <http://www.naturoils.com.br/#!óleos-essenciais/vstc2=oregano>. Acesso em: 02 nov. 2012.

NAVES, R.F. *et al.* Contaminação microbiana nas etapas de processamento e sua influencia no rendimento fermentativo em usina alcooleira. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.6, n.11, 2010. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2010c/contaminacao%20microbiana.pdf>>. Acesso em: 09 out. 2012.

OLIVA NETO, P. **Estudo de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por leveduras**. In: BARBOSA, N. F. Aspectos teóricos e práticos do processo de fermentação alcoólica. 2012. 46 f. Trabalho de Graduação (Tecnologia em Biocombustíveis) – Centro de Tecnologia em Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, Araçatuba, 2012. Disponível em: <<http://www.fatecaracatuba.edu.br/suporte/upload/Biblioteca/BIO%2017711207143%20Autor%20Natalia%20Franca%20Barbosa.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2012.

OLIVEIRA FILHO, J. H. de, **Atividade Antimicrobiana de própolis sobre contaminantes da fermentação alcoólica destinada a produção de cachaça**. 2010. 61f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2010. Disponível em: <[http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/bja/33004102070P6/2010/oliveirafilho\\_jh\\_m\\_e\\_jabo.pdf](http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/bja/33004102070P6/2010/oliveirafilho_jh_m_e_jabo.pdf)>. Acesso em: 18 out. 2012.

OLIVEIRA-FREGUGLIA, R.M.; HORII, J. Viabilidade Celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura mista com *Lactobacillus fermentum*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, 1998. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-90161998000300022](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90161998000300022)>. Acesso em: 12 out. 2012.

PACHECO, T.F.; **Fermentacao Alcoolica com Leveduras de características Floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. 2010. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

PEREIRA, O. B. O. **Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme**. 2001. 221f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2001.

PRADO-FILHO, L.G. *et al.* Acúmulo de cádmio por *Saccharomyces cerevisiae* fermentando mosto de melão. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.55, n.1, 1998. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s0103-90161998000100020&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s0103-90161998000100020&script=sci_arttext)>. Acesso em: 30 out. 2012.

QUIMICA REAL. **Produtos**. Belo Horizonte, 2012. Disponível em: <<http://www.quimicareal.com.br/>> Acesso em: 05 nov. 2012.

RAVANELI, G.C. **Qualidade da matéria - prima, microbiota fermentativa e produção de etanol sob ataque de *Mahanarva fimbriolata* em cana-de-açúcar**. 2010. 104f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

SANTOS, A. M. **Fermentação Alcoólica com Levedura Imobilizada em Colmos de Bambu e em Fibra de Coco**. 2008a. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Unidade Acadêmica Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008a. Disponível em:

<[http://www.ctec.ufal.br/posgraduacao/ppgeq/dissertacao\\_adeilton.pdf](http://www.ctec.ufal.br/posgraduacao/ppgeq/dissertacao_adeilton.pdf)>. Acesso em: 10 out. 2012.

SANTOS, A.M. **Estudo da influência da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada**. 2008b. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas. Instituto de Química, Universidade Federal de Alagoas. Maceió, 2008b. Disponível em:

<[http://www.ctec.ufal.br/posgraduacao/ppgeq/dissertacao\\_alessandra.pdf](http://www.ctec.ufal.br/posgraduacao/ppgeq/dissertacao_alessandra.pdf)>. Acesso em: 13 out. 2012.

SCHENEIDER, F. (ed.) **Sugar Analysis ICUMSA methods**. 1979. 265p.

SILVA, K.C.S. **Avaliação da ação de diferentes antibióticos sobre o crescimento de microorganismos contaminantes do processo fermentativo par a obtenção do etanol**. 2010. 50 f. Trabalho de Graduação (Tecnologia em Biocombustíveis) – Centro de Tecnologia em Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, Araçatuba, 2010. Disponível em:

<<http://www.fatecaracatuba.edu.br/suporte/upload/Biblioteca/BIO%2017701020001.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2012.

UNICA. **O etanol: combustível limpo e renovável**. Disponível em:

<<http://www.unica.com.br/>>. Acesso em: 20 jul. 2012.

UNICA. **Setor Sucroenergético: mapa da Produção**. Disponível em:

<<http://www.unica.com.br/>>. Acesso em: 20 jul. 2012.

VENTURA, R. **Potenciais contaminantes em levedura extraída de fermentação alcoólica**, [s.d.]. Disponível em: <[http://www.quimicareal.com.br/upload/palestra\\_ventura.pdf](http://www.quimicareal.com.br/upload/palestra_ventura.pdf)>. Acesso em: 18 maio 2012.

VERBELEN, P.J., DE SCHUTTER, D.P., DELVAUX, F., *et al.* **Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications**. In: SANTOS, A. M. **Fermentação Alcoólica com Levedura Imobilizada em Colmos de Bambu e em Fibra de Coco**. 2008a. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Unidade Acadêmica Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008a. Disponível em: <[http://www.ctec.ufal.br/posgraduacao/ppgeq/dissertacao\\_adeilton.pdf](http://www.ctec.ufal.br/posgraduacao/ppgeq/dissertacao_adeilton.pdf)>. Acesso em: 10 out. 2012.

WARREN, L.; HEIST, P. **Bactérias resistentes a antibióticos em fermentações etanol combustível**. In: SILVA, K.C.S. **Avaliação da ação de diferentes antibióticos sobre o crescimento de microorganismos contaminantes do processo fermentativo par a obtenção do etanol**. 2012. 50 f. Trabalho de Graduação (Tecnologia em Biocombustíveis) – Centro de Tecnologia em Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, Araçatuba, 2012.

Disponível em:

<<http://www.fatecaracatuba.edu.br/suporte/upload/Biblioteca/BIO%2017701020001.pdf>>.

Acesso em: 31 ago. 2012.