

Curso de Tecnologia em Biocombustíveis

CARACTERIZAÇÃO DE COLÔNIAS BACTERIANAS EM AMOSTRAS DE ÁGUA DE DILUIÇÃO DO MOSTO

FLÁVIA ALEIXO GERALDO MARTINS

**Orientadora: Profa. Dra. Mariana Carina Frigieri
Salaro**

Coorientador: Marcio Roberto de Carvalho

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

**Jaboticabal-SP
2º Semestre/2013**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Martins, Flávia Aleixo Geraldo

M386c Caracterização de colônias bacterianas em amostras de água de diluição do mosto / Flávia Aleixo Geraldo Martins.— Jaboticabal : Fatec Nilo De Stéfani, 2013.
38f.

Orientador: Profa. Dra. Mariana Carina Frigieri Salaro
Coorientador: Marcio Roberto de Carvalho

Trabalho (graduação) – Apresentado ao Curso de Tecnologia em Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia Nilo De Stéfani - Jaboticabal, 2013.

1. Contaminantes. 2. *Escherichia coli*. 3. Coliformes. I. Salaro, M. C. F. II. Carvalho, M. R. II. Título.

CDU 579:628.19

Curso de Tecnologia em Biocombustíveis

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO DE COLÔNIAS BACTERIANAS EM AMOSTRAS DE ÁGUA DE DILUIÇÃO DO MOSTO.

AUTORA: FLÁVIA ALEIXO GERALDO MARTINS

ORIENTADORA: PROF(a). DR(a). MARIANA CARINA FRIGIERI SALARO

CO-ORIENTADOR: MARCIO ROBERTO DE CARVALHO

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.

MARCIO ROBERTO DE CARVALHO

AYLAN KENER MENEZHINE

FLÁVIA ROBERTA DE ANNUNZIO

Data da apresentação: 11 de dezembro de 2013.

Presidente da Comissão Examinadora

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente aos meus pais: José Eduardo Geraldo Martins e Marina Celia Aleixo Geraldo Martins, que foram meus alicerces em todos os momentos, me ajudando e apoiando em tudo que era necessário e a todo o restante da família que são as pessoas mais especiais em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me conceder saúde e determinação de poder lutar pelas coisas que quero e estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus familiares: Pais e irmãos pela ajuda psicológica nos momentos de tensão e estress.

Aos meus amigos pessoais e da Fatec que me ajudaram.

Ao João Moreira Castro, que com seu carinho e companheirismo tornou meus dias melhores.

A minha querida sobrinha que é uma pessoa essencial na minha vida.

Ao meu amigo Bruno Scardoeli, pelos conhecimentos cedidos.

A Minha amiga Aline Massaro pelo apoio e carinho comigo.

A minha orientadora Mariana Frigieri, que me ajudou e auxiliou muito em tudo que precisei e que com seu carinho, paciência e muitos conhecimentos, tornou meu trabalho muito mais prazeroso.

Ao meu coorientador Marcio Roberto de Carvaho, pelas ajudas, conhecimentos cedidos e paciência para a realização do meu trabalho.

A todos os funcionários, professores e alunos da Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, por todos os conhecimentos, ajudas, conversas e convívio que compôs a minha formação acadêmica.

E todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho e do meu sonho profissional.

Muito Obrigada!

O insucesso é apenas uma oportunidade para recomeçar de novo com mais inteligência..

Henry Ford

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DE COLÔNIAS BACTERIANAS EM AMOSTRAS DE ÁGUA DE DILUIÇÃO O MOSTO.

Para produção do etanol é necessário que ocorra a fermentação etanólica produzida através da atividade enzimática de leveduras. O mosto pode ser o próprio caldo de cana ou preparado através da diluição do melaço, entretanto a água de diluição do mosto de melaço é apontada como uma grande fonte de contaminações. Em um estudo anterior, foram isoladas quatro possíveis colônias de *Escherichia coli* pelo plaqueamento no sistema Petrifilm. O presente estudo teve a finalidade de buscar caracterizar essas colônias para posterior aplicação em aulas didáticas. Para caracterização destas colônias, as mesmas foram inoculadas em diferentes meios. Foi observado o crescimento das 4 colônias em meio AN, as quais posteriormente foram testadas em meio EMB para confirmar a presença da bactéria *E. coli*. Após 48h de inoculação as colônias não apresentaram nenhuma característica deste grupo, entretanto ao refrigerar a cultura durante 15 dias, uma das quatro colônias apresentou coloração verde metalizada indicando a presença de *E. coli* na placa. Nos tubos contendo meio P/A foi observado a formação de gás e a acidificação do meio, evidenciado pela mudança de sua coloração de púrpura para amarelo, indicando a presença de bactérias do grupo coliformes na amostra 4. Já no meio SIM observou-se o crescimento difuso das 4 amostras, evidenciando a motilidade e indicando a não produção de sulfeto, no entanto resultados positivos foram obtidos quando se testou a prova do indol, devido a formação de um anel róseo no tubo da amostra 4. Dentre as quatro colônias testadas neste estudo, apenas uma demonstrou ser positiva para bactérias pertencentes ao grupo coliformes e será utilizada nas aulas práticas envolvendo análise de água.

Palavras-Chave: Contaminantes. *Escherichia coli*. Coliformes.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF BACTERIAL COLONIES IN SAMPLES OF DILUTION WATER OF THE MASH

For ethanol production, ethanol fermentation produced by the enzymatic activity of is required. The mash may be the sugarcane juice itself or prepared by diluting molasses, however water dilution of molasses is identified as a major source of contamination. In a previous study, we isolated four possible colonies of Escherichia coli by plating system Petrifilm. This study aimed to characterize these colonies to seek further application in teaching classes. To characterize these colonies, they were inoculated in different media. We observed the growth of colonies 4 through AN, which were subsequently tested in EMB medium to confirm the presence of the bacterium E. coli. 48 hours after inoculation the colonies showed no characteristics of this group, however by cooling the culture for 15 days, one of the four colonies showed metallic green color indicating the presence of E. coli on the plate. In tubes containing medium P/A, generation of gas and medium acidification were observed as evidenced by their color change from purple to yellow, indicating the presence of coliform bacteria in the sample 4. In the medium SIM, a diffused growth of the 4 samples was observed pointing motility and indicating the non-production of sulfide, however positive results were obtained when testing indole due to the formation of a pink ring on the sample 4. Among the four colonies tested in this study, only one proved to be positive for bacteria belonging to the coliform group and it will be used in practical classes involving water analysis.

Keywords: Contaminants. Escherichia coli. Coliforms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Colônias bacterianas obtidas em um estudo anterior.	13
Figura 2 – Área de concentração da produção de cana de açúcar no Brasil (UNICA, [s.d.]).	17
Figura 3 – Equação de transformação da glicose em etanol e subprodutos (ZAMBONI, 2013).	19
Figura 4 – Uso da água na produção de açúcar e etanol (PERRI, 2010).	21
Figura 5 – Divisão do grupo de coliforme.	212
Figura 6 – Ilustração do coliforme <i>E. coli</i> no trato intestinal humano.	214
Figura 7 – Imagem da bactéria <i>Escherichia coli</i> (THE BLUE PAPER, 2013).	244
Figura 8 – Estrutura celular da <i>E. coli</i>	215
Figura 9 – Meios de cultura sintéticos utilizados nos experimentos.	27
Figura 10 – Meios de cultura sintéticos utilizados nos experimentos.	31
Figura 11 – Esquema do procedimento realizado com as possíveis colônias de <i>E. coli</i>	322
Figura 12 – Crescimento das quatro colônias em meio agar nutriente (AN). ..	333
Figura 13 – Crescimento das quatro colônias em meio EMB (eosina e azul de metileno).	344
Figura 14 – A) Crescimento das quatro colônias em caldo Presença/Ausência (P/A). B) Em destaque o aprisionamento dos gases no tubo de Durham.	344
Figura 15 – A) Crescimento das quatro colônias em caldo EC (<i>Escherichia coli</i>). B) Em detalhe a amostra positiva.	355
Figura 16 – A) Crescimento das quatro colônias em meio SIM (Sulfeto, Indol e Motilidade), B) Formação de anel roseo em meio SIM após a adição do reagente de Kovacs.	355

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Evolução do setor brasileiro de produção da cana de açúcar entre 1975 a 2013. .	16
Tabela 2 – Produção brasileira de etanol nas ultimas 6 safras segundo UDOP (2013).....	17
Tabela 3 – Índices de contaminação do caldo de cana utilizado em processos fermentativos	23
Tabela 4 – Meio Agar Nutriente (M001 HIMEDIA [®]).	27
Tabela 5 – Meio Agar EMB (M317 HIMEDIA [®]).	28
Tabela 6 – Meio SIM (M181 HIMEDIA [®]).	289
Tabela 7 – CaldoEC (M127HIMEDIA [®]).	299
Tabela 8 – CaldoP/A (M186 HIMEDIA [®]).	30

LISTA DE ABREVIATURAS

IAA	Instituto do Álcool e Açúcar
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
UDOP	União dos Produtores de Bioenergia
UNICA	União da Indústria de Cana-de-Açúcar
Meio SIM	Meio Sulfeto, Indol e Motilidade
Meio EC	Meio <i>Escherichia coli</i>
Meio P/A	Meio Presença/Ausência
Meio AN	Meio Agar nutriente
Meio EMB	Meio Eosina e Azul de Metileno
CO ₂	Dióxido de carbono
FCAV/UNESP	Faculdade de Ciências Agrária e Veterinárias de Jaboticabal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	123
2 OBJETIVOS	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1 Cana de açúcar como geradora de combustível: história e regiões produtoras.....	15
3.2 Obtenção do Etanol.....	18
3.2.1 Preparo do mosto	18
3.2.2 Fermentação	19
3.3 Água de diluição	20
3.4 Uso da água no processo de produção de etanol	20
3.5 Micro-organismos bioindicadores de contaminação	22
3.5.1 <i>Escherichia coli</i>	24
3.6 Contaminantes.....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
5 RESULTADOS.....	33
6 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

O processo de fermentação etanólica a partir da cana-de-açúcar envolve a reação de oxidação dos monômeros de açúcar, glicose e frutose, transformando-os principalmente em etanol e gás carbônico (NELSON; COX, 2002). A reação é promovida por leveduras, sendo a espécie *Saccharomyces cerevisiae* a mais utilizada pelas usinas e destilarias.

O mosto, utilizado no processo, pode ser o próprio caldo de cana preparado através da diluição do melaço oriundo do processo de produção de açúcar. A água de diluição do mosto de melaço é apontada como uma grande fonte de contaminações.

Uma fermentação ideal deve ocorrer em ambiente com pouco ou nenhuma contaminação, uma vez que os microrganismos invasores acarretam perda de rendimento do processo de conversão em etanol por parte das leveduras, além do mais, em estresse as leveduras desviam seu metabolismo por estresse em outros metabólitos ou convertem os açúcares em compostos utilizados como defesa pela própria levedura (PAPPA, 2011).

Em um trabalho anterior realizado, por Zamboni (2013), estudando o tratamento da água de diluição do mosto visando à redução máxima da população microbiana sem, no entanto, alterar o rendimento do processo fermentativo; foram isoladas quatro possíveis colônias de *Escherichia coli* (Figura 1) pelo plaqueamento no sistema Petrifilm. As Placas Petrifilm™ 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 microrganismo pesquisado (BRASIL, 2010). O presente projeto buscou caracterizar as colônias azuis, conforme ilustrado na figura 1, de forma que pudessem ser utilizadas nas aulas práticas de Microbiologia.

Figura 1 – Colônias bacterianas obtidas em um estudo anterior.



2 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo caracterizar quatro colônias de possíveis coliformes do tipo *E.coli* obtidas em um estudo anterior, para utilização nas aulas da disciplina de microbiologia.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cana de açúcar como geradora de combustível: história e regiões produtoras

O surgimento de tecnologias energéticas renováveis em substituição as de origem fóssil tem gerado grandes vantagens econômicas e principalmente ambientais (NOGUEIRA; LORA, 2003).

No início do século XX, no Brasil iniciou-se os primeiros indícios da utilização da cana de açúcar na produção de combustível, nesta época iniciavam-se os estudos sobre a tecnologia para produção de motores movidos a álcool e do álcool em sua forma concentrada, uma vez que o processo de produção da cachaça já era bastante desenvolvido no País, e as pequenas propriedades então necessitariam apenas de pequenos aperfeiçoamentos para fabricação do etanol combustível (NATALE NETTO, 2007). De acordo com o mesmo autor outro passo importante para expansão do etanol foi o decreto 19.717 de 20 de janeiro de 1931, criado na época por Getúlio Vargas, o qual incluía a obrigatoriedade da adição de 5% de etanol em toda a gasolina importada.

Além do decreto criado em 1931, no ano de 1933, Getúlio Vargas criou o Instituto do Álcool e Açúcar (IAA) fazendo com que este setor fosse regulamentado, recebendo diversos incentivos na produção e exportação do açúcar favorecendo o seu crescimento principalmente na região do estado de São Paulo, fazendo com que a região sudeste superasse a região do nordeste em termos área plantada de cana de açúcar. Em meados de 1955, a área de plantio de cana de açúcar apenas no Brasil já atingia aproximadamente 1 milhão de hectares (ROSSETO, 2008).

A consagração agroindustrial da cana-de-açúcar viria mais tarde influenciada pela crise do petróleo em 1973, que proporcionou a criação do Proálcool em 1975 visando a diminuir a dependência de importação de combustíveis derivados de petróleo que oneravam a balança comercial do Brasil (NATALE NETTO, 2007). Criado pelo governo federal o Proálcool prestou uma grande contribuição ao desenvolvimento tecnológico do setor sucroalcooleiro. Na Tabela 1 é possível perceber a grande expansão do setor, sendo que com a criação do Proálcool em apenas 10 anos a área de plantio da cana de açúcar dobrou.

Tabela 1 – Evolução do setor brasileiro de produção da cana de açúcar entre 1975 a 2013.

Ano	Área plantada (Milhões de hectares)	Produção (Milhões de toneladas)	Produtividade (t/há)
1975	1,9	88,92	46,82
1976	2,08	102,77	49,43
1977	2,27	120,01	52,93
1978	2,39	129,06	54,04
1979	2,54	139,27	54,79
1980	2,61	146,23	56,09
1985	3,9	246,54	63,22
1990	4,29	262,6	61,49
1995	4,62	303,56	66,49
1996	4,9	325,93	67,52
1997	4,95	337,2	69,1
1998	5	338,97	68,18
1999	4,86	331,71	68,41
2000	4,82	325,33	67,51
2012/13	8,48	588,91	69,40

Fonte: (MAPA, 2011; CONAB, 2013)

Para a temporada 2013/14, a cultura da cana-de-açúcar continua em expansão. A previsão é que o Brasil tenha um acréscimo na área de cerca de 314 mil hectares, equivalendo a 3,7% em relação à safra 2012/13. A área cultivada com cana-de-açúcar que será colhida e destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2013/14 está estimada em 8.799.150 mil hectares, distribuídas em todos estados produtores conforme suas características. O estado de São Paulo permanece como o maior produtor com 51,31% (4.515.360 hectares) da área plantada (CONAB, 2013).

Com relação à produção de etanol brasileiro, alguns dados podem ser verificados na tabela 2. Os valores demonstram que nas últimas 6 safras vêm ocorrendo uma diminuição na produção de etanol, isto porque atualmente as usinas estão optando por aumentar a produção de açúcar em relação ao etanol, devido aos melhores preços de mercado e demanda de exportação.

Tabela 2 – Produção brasileira de etanol nas ultimas 6 safras segundo UDOP (2013).

Regiões	Ano- Safra (m ³)					
	2008/09	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14
Norte/Nordeste	2.410.999	2.005.164	1.991.614	2.139.206	1.864.442	401.571
Centro-Sul	25.270.240	23.733.511	25.612.506	20.597.334	21.608.912	15.227.240
Brasil	27.681.239	25.738.675	27.604.120	22.736.540	23.473.354	15.628.811

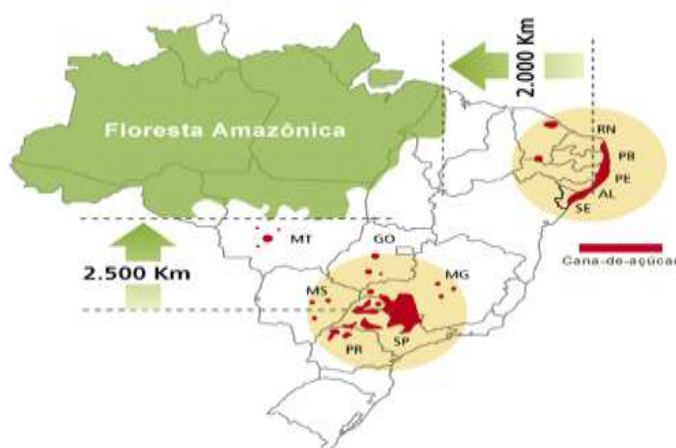
Fonte: DCAA/SPA/EMAPA

(*) Valores atualizados em 01/09/2013

Dentre os estados brasileiros, São Paulo é o principal estado produtor de cana de açúcar, representando cerca de 59,5% de toda produção nacional (REPÓRTER BRASIL, 2009). Atualmente o estado de São Paulo ainda é o maior produtor com 52,07% (4.419,48 mil hectares), seguido por Goiás com 8,55% (725,91 mil hectares), Minas Gerais com 8,51% (721,88 mil hectares), Paraná com 7,20% (610,83 mil hectares), Mato Grosso do Sul com 6,34% (542,70 mil hectares), Alagoas com 5,25% (445,71 mil hectares) e Pernambuco com 3,68% (312,09 mil hectares).

Nos demais estados produtores as áreas são menores, com representações abaixo de 3%. A área nacional de cana-de-açúcar, deste ano safra destinada à produção sucroalcooleira apresentou um crescimento de 1,5% ou 123 mil hectares em relação à safra passada (CONAB, 2013). A Figura 2 ilustra as regiões produtoras de cana de açúcar, as usinas de produção de açúcar e de etanol.

Figura 2 – Área de concentração da produção de cana de açúcar no Brasil (UNICA, [s.d.]).



Segundo Burnquist e Rodrigues (2008) dentre os países produtores de etanol, o Brasil é o único que apresenta potencial para exportação, e com aumento da demanda deste produto por países como os EUA, Bélgica, Holanda, Luxemburgo, Suécia, França, Reino Unido, Japão entre outros, vem aumentando também a necessidade de importação do etanol brasileiro. O Brasil é o maior produtor mundial de etanol de cana, segundo a União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA), foram produzidos, no país, 20,5 bilhões de litros do combustível na safra 2011-2012 (PETROBRAS, 2012).

3.2 Obtenção do Etanol

Pertencente à classe dos álcoois, o etanol é uma substância que não pode ser encontrada na natureza, mas pode ser obtido através de diversas fontes energéticas. No Brasil a principal forma de obtenção do etanol é através da biomassa, com destaque à cana-de-açúcar (sacarose), principal matéria prima.

O etanol é produzido através de reações biológicas envolvendo amido, sacarose ou melaço (BNDS; CGEE, 2008) pela via fermentativa, que é a mais utilizada para obtenção do etanol no Brasil, devido ao grande número de matérias primas naturais que existem no país. Basicamente o processo consiste na transformação de açúcares em etanol gerando dióxido de carbono (LIMA et al., 2001).

3.2.1 Preparo do mosto

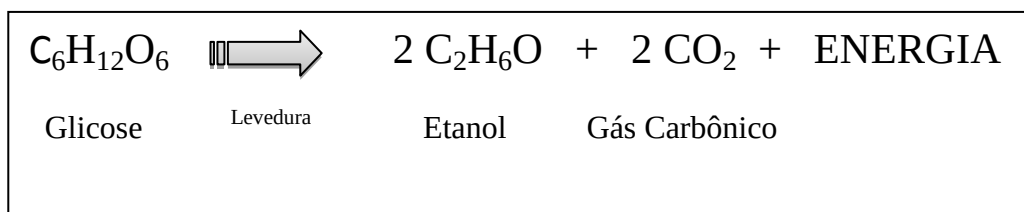
O mosto é uma mistura açucarada destinada à fermentação alcoólica, a qual ocorre por meio da ação de leveduras, sendo a espécie *Saccharomyces cerevisiae* a mais empregada. Segundo Alcarde (2013), para a preparação do mosto, são necessários alguns cuidados com a concentração dos açúcares totais em relação aos sólidos solúveis, acidez e pH. Algumas vezes ainda é preciso fazer a suplementação de nutrientes, adição de anti-sépticos e aumento da temperatura, para obter rendimentos mais satisfatórios.

No preparo do mosto é feita a diluição do melaço, que é obtido na centrifugação dos cristais de açúcar. Um dos fatores importantes no desenvolvimento das leveduras é o pH, que deve ser mantido entre 4,5 e 5, e a temperatura com melhor desenvolvimento das leveduras fica entre 32 a 34 °C para favorecer o processo fermentativo (ALCARDE, 2013).

3.2.2 Fermentação

Como já dito, o processo de fermentação consiste na atividade das leveduras sobre o mosto açucarado, produzindo etanol e gás carbônico (LACERDA, 2011). Esse processo de fermentação etanólica é realizado pelas leveduras em nível citoplasmático, o qual produz energia para realização das atividades fisiológicas, crescimento e reprodução; sendo o etanol um subproduto desse processo (LIMA et al, 2011). A Figura 3 abaixo ilustra a equação de conversão do açúcar em etanol e gás carbônico.

Figura 3 – Equação de transformação da glicose em etanol e subprodutos (ZAMBONI, 2013).



Segundo Lopes (2009) a fermentação alcoólica é composta em 3 fases: a fermentação preliminar, principal e complementar. A fermentação preliminar inicia-se quando o fermento é adicionado e termina quando ocorre o desprendimento de gás carbônico. Nesta fase, mesmo o fermento já consumindo a sacarose do mosto, ainda não há produção de álcool, sendo assim esta fase é realizada o mais rápido possível. A fermentação principal inicia-se quando começa a ocorrer o desprendimento do gás carbônico (CO_2), que aumenta progressivamente e de forma rápida, causando turbulência, e aumentando em 20% do volume da dorna, nesta fase a temperatura deve ser controlada através de resfriamento. Na fermentação principal a formação de álcool é máxima e rápida, diminuindo o brix do mosto até o ponto da fermentação complementar. Já a fermentação complementar inicia-se com a diminuição do desprendimento do gás carbônico e da temperatura do mosto. Nesta fase o brix é controlado, até que chegue a um ponto favorável para destilação, cerca de 3° à 8° brix. Após completar a fermentação é aguardada a decantação natural das células de levedura e estas são tratadas para poderem ser reutilizadas em próximas fermentações. Esse processo também pode ser feito por centrifugação.

3.3 Água de diluição

O mosto utilizado na fermentação pode ser o próprio caldo de cana ou pode ser preparado através da diluição do melaço oriundo do processo de produção de açúcar. Para que possa haver a fermentação etanólica empregando o melaço, é preciso que ocorra a diluição, pelo fato deste ser muito concentrado e as leveduras apresentarem grande dificuldade para realizar a fermentação neste ambiente. A qualidade da água de diluição é de grande importância, já que esta será misturada ao mosto e qualquer contaminante presente afetará diretamente a eficiência fermentativa (OLIVEIRA, 2011).

Uma fermentação ideal deve ocorrer em ambiente com pouco ou nenhuma contaminação, uma vez que os micro-organismos invasores acarretam perda de rendimento do processo de conversão em etanol por parte das leveduras (PAPPA, 2011).

Na maioria das vezes a água em que é feita a diluição vem de rios próximos e quase sempre sem nenhum tratamento específico (OLIVEIRA, 2011). A água de diluição pode possuir um teor variável de material coloidal, sendo necessário o tratamento físico-químico para tentar controlar o teor de impurezas e micro-organismos (ROSSELL, 2013).

Algumas usinas fazem seu próprio tratamento da água por meio de cloro (MORAES, 2011 apud OLIVEIRA, 2011). É comprovado por meio de estudo que o cloro pode ser corrosivo ao aço inoxidável, sendo que as dornas são feitas desse mesmo material, não sendo esse método o mais indicado para a usina (CARDOSO, 2002).

Segundo levantamento apresentado por Elia Neto (1995), a necessidade de água de uma usina seria de aproximadamente $21\text{m}^3/\text{t.cana}$, se os circuitos fossem totalmente abertos. Já Leite (2000) apresentou balanço hídrico considerando as necessidades de água para produção de 50% para açúcar e 50% para álcool, a implementação de sistema de cogeração, como também a não utilização de técnicas de lavagem da cana, concluindo que seriam necessários $19\text{m}^3/\text{t.cana}$.

3.4 Uso da água no processo de produção de etanol

As indústrias sucroenergéticas necessitam de consideráveis quantidades de água em seus processos e operações, sendo por esse motivo, a sua instalação é comumente próxima a corpos d'água. Esta necessidade mostra uma grande relação entre a existência ou não de disponibilidade hídrica e a instalação das usinas no país (FREITAS; FERREIRA, 2006).

Na indústria, cerca de 90% das águas empregadas nas usinas devem-se basicamente a quatro funções: lavagem de cana (25%) como pode ser observado na Figura 5, águas dos condensadores barométricos ou multijatos da fabricação do açúcar (29%), águas de resfriamento de dornas da fermentação (14%) e águas dos condensadores de álcool (19%). De uma forma geral, utiliza-se cerca de 21 m³ de água/tonelada de cana esmagada, gerando proporcional quantidade de resíduos (TORQUATO JR et al., 2009). Pensando nestes aspectos o setor tem buscado tecnologias que visam reduzir o consumo e a captação de água. Como por exemplo, a Copersucar, devido às várias reutilizações, capta apenas cerca de 5,0 m³/TC (GUARNIERI; JANNUZI, 1992). Mas, com o fechamento dos circuitos principais, pode-se reduzir a captação para 1 m³/TC.

Figura 4 – Uso da água na produção de açúcar e etanol (PERRI, 2010).



Altos volumes de água são extraídos através da ebulição do caldo durante a condensação para obtenção do açúcar, isso após sua utilização no sistema de embebição e resfriamento, quando segue para a lavagem da própria matéria prima e é destinada à ferti-irrigação. Esse processo permite à usina minimizar o consumo de água fluvial (ÁLCOOLBRÁS, 2002).

O Grupo Raízen um dos maiores produtores mundiais, implantou parcialmente em todas as suas unidades, a partir da safra 2002/03, o programa “Só Cana Pura”, cuja finalidade é de se obter uma matéria-prima com baixos teores de impurezas, não havendo assim a necessidade de sua lavagem. No aspecto ambiental, a eliminação dessa etapa ainda libera a água para fins mais nobres (ÁLCOOLBRAS, 2003).

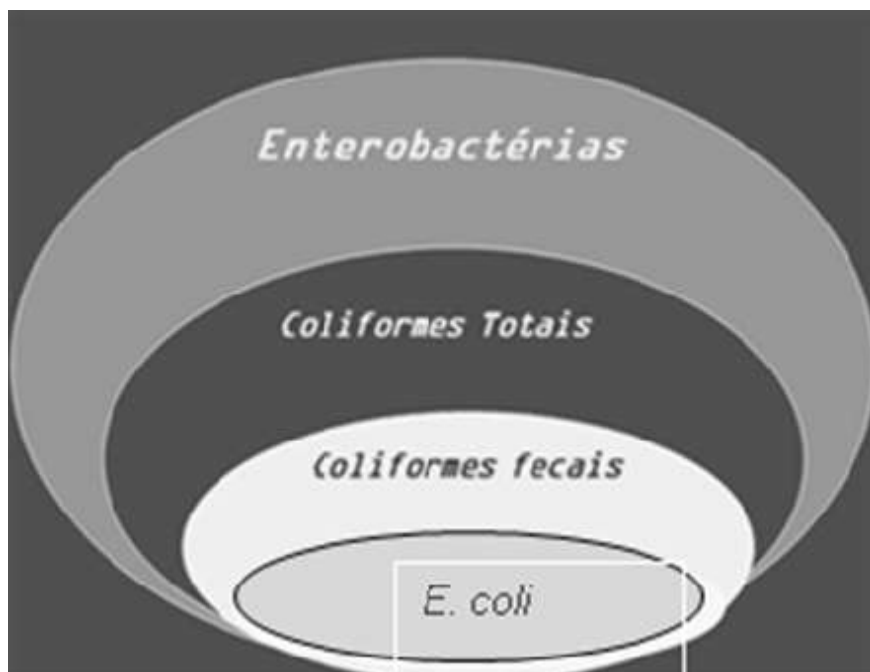
Além das utilizações citadas acima, para produção do etanol outros processos também requerem o uso de água para sua realização, como nas diluições do mosto ou melaço, e em

outras etapas da fermentação. Entretanto a água utilizada nestes processos não pode ser de baixa qualidade, ou seja, sob presença de contaminantes, pois estes contaminantes afetariam a produção do etanol reduzindo o rendimento das leveduras e gerariam subprodutos indesejáveis além do etanol.

3.5 Micro-organismos bioindicadores de contaminação

A presença de alguns tipos de micro-organismos pode ser utilizada como indicadores, os quais refletem a qualidade de determinada amostra ou produto, podendo ser relacionado a níveis de segurança, uma vez que podem indicar a presença de organismos patogênicos (JAY, 2005). Organismos indicadores são comumente utilizados para avaliação da qualidade microbiológica da água, seja para consumo humano, residual ou uso industrial (ASHBOLT et al., 2001). Mesmo sendo possível a detecção de patógenos em água, os métodos de isolamento são complexos e demorados, além de que, esses organismos estão presentes apenas de forma esporádica e sobrevivem apenas por um curto período de tempo.

Figura 5 - Divisão do grupo de coliforme.



Fonte: Cassini (2011).

As bactérias do grupo Coliforme fazem parte da família das Enterobacteriaceae e podem ser divididas em (Figura 5):

- **Coliformes totais (ambientais):** são aqueles que habitam nas águas e solos do meio

ambiente e que podem também ser oriundos de fezes.

- **Coliformes Termotolerantes (fecais):** são originados diretamente de fezes, vindos principalmente de esgotos domésticos.
- **Coliforme específico:** *Escherichia coli* e também inclui os gêneros: *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter*

Devido alguns tipos de micro-organismos serem encontrados em águas principalmente os de origem fecal, alguns indicadores sanitários vem sendo utilizados visando sua detecção. A presença deste grupo de micro-organismo indica a presença de patógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2008), podendo atrapalhar e contaminar culturas e processos industriais.

Um indicador de contaminação em água deve apresentar as seguintes características: estar presente em águas poluídas ou ausentes nas não poluídas; presente quando organismos patogênicos estão presentes; sobrevivência igual ou maior que os patógenos na água; inofensivo ao homem; fácil detecção; habitat exclusivo ao trato intestinal humano e de animais; ocorrer em números altos e apresentar alta resistência ao ambiente extra-enteral (FRANCO; LANDGRAF, 2008; PELCZAR et al., 1996). Entretanto como é difícil um micro-organismo apresentar todas estas características, são utilizados alguns que apresente o maior número delas e que estejam presentes em dejetos humanos, como indicadores alternativos de contaminação, tais como *Streptococcus*, *Clostridium*, vírus entéricos, coliformes e *Escherichia coli* (BURBARELLI, 2004).

Segundo Marques et al. (2008) é possível verificar se há ou não contaminação em algumas etapas do processo de obtenção de etanol, como por exemplo no caldo de cana, através da quantidade de determinado grupo de microrganismo. A Tabela abaixo ilustra os níveis de significância de contaminação e a quantidade de microrganismo respectiva.

Tabela 3 – Índices de contaminação do caldo de cana utilizado em processos fermentativos.

Nº de bastonetes por mL de caldo	Parâmetro
$<10^4$	Ótimo
1 a 5×10^5	Bom
6 a 9×10^5	Regular
$>10^5$	Ruim

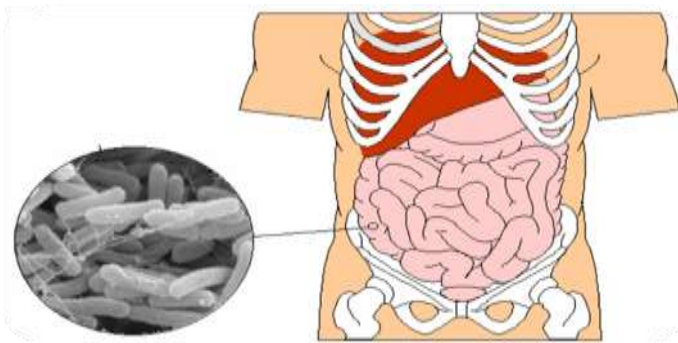
Fonte: MARQUES et al, 2008.

3.5.1 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria na forma de bastonete gram-negativa, anaeróbia facultativa, não esporulada, com oxidase negativa, locomoção por flagelos peritríquios ou não movel pertencente à Família *Enterobacteriaceae* (KAPER et al. 2004).

Em condições normais os coliformes não são patogênicos embora certas linhagens possa ser bastante perigosas e podem causar: diarreia e infecção urinárias oportunistas entre outras. A *E. coli* é um habitante normal do trato intestinal de humanos e outros animais de sangue quente. É o Coliforme específico mais utilizado por satisfazer as exigências de um indicador ideal de poluição. A figura abaixo ilustra a imagem do coliforme *E. coli* no trato intestinal humano.

Figura 6 - Ilustração do coliforme *E. coli* no trato intestinal humano.



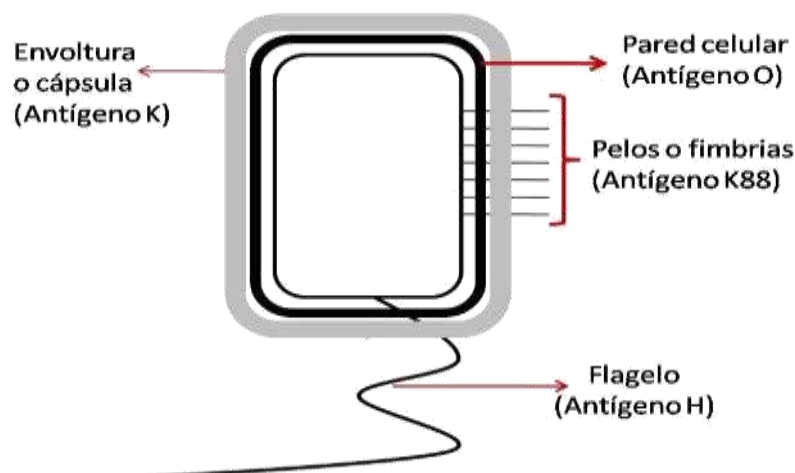
Fonte: Structmed (2013)

A Figura 7 ilustra a imagem da bactéria, mostrando sua forma e flagelos e logo abaixo a figura 8 ilustra sua estrutura celular.

Figura 7 – Imagem da bactéria *Escherichia coli* (THE BLUE PAPER, 2013).



Figura 8 - Estrutura celular da *E. coli*.



Fonte: Arango (2012)

Na figura acima que mostra que as linhagens da *E. coli* se diferem pelos componentes chamados antígenos, que são resonsáveis por ativar o sistema imunológico.

Esse micro-organismo é capaz de fermentar a glicose e lactose produzindo ácidos e gases, apresentando grandes riscos quando presentes em processos fermentativos, como o de obtenção do etanol. A glicose é fermentada em ácidos lácticos, acéticos e fórmico, sendo o ácido fórmico, hidrolisado a hidrogênio e dióxido de carbono (FRANCO, 2002). Outra característica da *E. coli* é a produção de β -galactosidade e indol mas não forma sulfito de hidrogênio ou hidrolisa uréia (BETTELHEIM, 2002).

3.6 Contaminantes

Devido as características do caldo de cana e do mosto, como elevado conteúdo de nutrientes orgânicos e inorgânicos, presença de água, pH favorável e temperatura ótima para o desenvolvimento de micro-organismos, estes são ótimos substratos, especialmente para o crescimento de bactérias (CHERUBIN, 2003). O controle deste tipo de organismo é bastante complexo, devido ser necessário a compreensão de suas características, fatores que contribuem para seleção e disseminação destes microrganismos contaminantes (EGUCHI, 2007).

Dentre os diversos contaminantes presentes na água muitos são inofensivos, alguns são desejáveis e outros prejudiciais, como bactérias, vírus, parasitas, substâncias tóxicas e radioativas (RITCHER; AZEVEDO NETTO, 1995). Para evitar a contaminação nos processos de produção do etanol, além de tratamentos da água é comum a utilização da água

em temperatura elevada. Entretanto, o uso de água quente nos processos fermentativos não garante total isenção de contaminantes no caldo, devido a existência de grupos genéricos de *Bacillus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc* presentes. Estes são classificados como pertencentes ao grupo taxonômico que pode formar endósporos, que são formas temporariamente inativas do microrganismo, porém resistentes a muitas adversas, como ação de alguns produtos químicos e elevação de temperatura (MARGULIS; SCHWARTZ, 2001).

Um exemplo de bactéria que resistiria a elevada temperatura da água é o *Bacillus stearothermophilus*, uma bactéria termofílica, esporulada termorresistente, um contaminante típico que suporta altas temperaturas (NOLASCO JR., 2005).

Outro grupo de organismos responsáveis por prejuízos na fermentação são as leveduras selvagens, as quais atrapalham a produção de etanol competindo com as leveduras desejáveis. Entretanto o seu controle é mais difícil, devido não existir nenhuma forma de tratamento ou inibição deste grupo como o uso de antibióticos ou ácidos, sem que alterem as leveduras selecionadas (ZAMBONI, 2013). O monitoramento destas leveduras é de grande importância na indústria, pois para o tratamento eficiente é necessário a troca completa do fermento (GUERRA; ANGELIS, 2013).

Dentre os danos causados por esses microrganismos contaminantes na fermentação etanólica destacam-se formação de goma, floculação, aumento da acidez do meio, inibição e queda da viabilidade da levedura devido a excreção de compostos tóxicos (ácido orgânicos), acarretando a redução no rendimento fermentativo (YOKOYA, 1991).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente experimento foi realizado no Laboratório Didático de Microbiologia da Fatec Jaboticabal. Inicialmente, os meios de cultura utilizados neste experimento foram preparados de acordo com as recomendações do fabricante HIMEDIA®, a figura abaixo ilustra os produtos utilizados em suas embalagens (Figura 6).

Figura 9 – Meios de cultura sintéticos utilizados nos experimentos.



Os meios comerciais utilizados são basicamente constituídos por reagentes químicos e determinados extratos, a seguir são descritas as composições, condições de preparo de cada meio e a importância de alguns componentes da formulação:

Tabela 4 – Meio Agar Nutriente (M001 HIMEDIA®).

Componentes da Formulação	g/L
Peptona	5,0
Extrato de Bife	1,0
Extrato de levedura	2,0
Cloreto de sódio	5,0

Agar	15,0
------	------

Observações: pH final = 7,4
Na preparação utiliza 28 g/L do M001

Meio é utilizado para crescimento de massa e facilidade no momento de repassar as bactérias, obtendo maior chance de tê-las vivas.

Tabela 5 – Meio Agar EMB (M317 HIMEDIA[®]).

Componentes da Formulação	g/L
Digestão Péptica de tecido animal	10,0
Fosfato Dipotássico	2,0
Lactose	10,0
Eosina Amarelada	0,4
Azul de Metileno	0,065
Agar	15,0

Observações: pH final = 7,1
Na preparação utiliza 36 g/L do M317

Meio específico utilizado para detecção de bactérias *E. Coli*. A bactéria irá fermentar a lactose assim produz a coloração específica que é o verde metálico. Os corantes: Eosina Amarelada e Azul de Metileno inibem a Gram +, sendo a *E. Coli*. Gram -, constatará sua presença.

Tabela 6 – Meio SIM (M181 HIMEDIA®).

Componentes da Formulação	g/L
Digestão Péptica de Tecido Animal	30
Extrato de bife	3,0
Ferro peptonizado	0,2
Tiosulfato de sódio	0,025
Agar	3,0

Observações: pH final = 7,3

Na preparação utiliza 36,23 g/L do M181

Meio no qual mostra três análises: Indica presença de sulfeto, se ocorrer a coloração escura; produção de Indol, se a *E. Coli* metabolizar o aminoácido triptofano que é encontrado na digestão péptica animal, e indicar se houve motilidade das bactérias.

Tabela 7 – CaldoEC (M127HIMEDIA®).

Componentes da Formulação	g/L
Caseína enzimática hidrolisada	20 g
Lactose	5,0 g
Mistura de sais biliares	1,5
Fosfato Dipotássico	4,0
Fosfato Monopotássico	1,5
Cloreto de sódio	5,0

•

Observações: pH final = 6,9

Na preparação utiliza 37 g/L do M127

Meio no qual a *E. Coli* irá fermentar a lactose e produzirá gases e os sais biliares inibem a Gram +.

Tabela 8 – Caldo P/A (M186 HIMEDIA[®]).

Componentes da Formulação	g/L
Digestão Péptica de tecido animal	5,0 g
Triptose	9,83 g
Extrato de Bife	3,0
Lactose	7,46
Cloreto de Sódio	2,46
Fosfato Dipotássico	1,35
Fosfato Monopotássico	1,35
Sulfato Lauril de Sódio	0,05
Púrpura Bromocresol	0,0085

Observações: pH final = 6,8

Na preparação utiliza 30,51 g/L do M186

Meio em que a *E. Coli* Fermentará a lactose produzindo gases e o corante Púrpura Bromocressol fará que o caldo mude de cor.

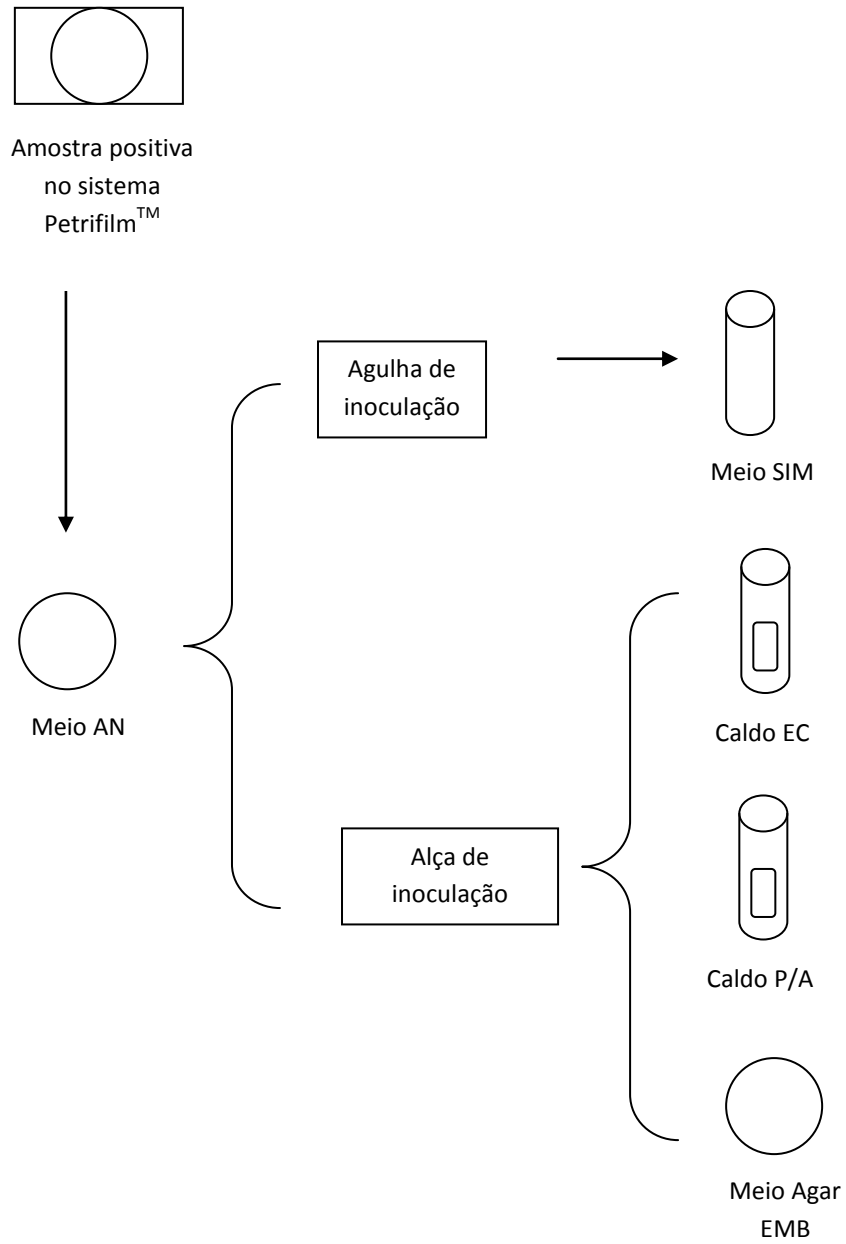
Após o preparo do meio SIM, o mesmo foi adicionado em tubos de ensaio para sua utilização, depois de preparado este foi acondicionado em tubos de ensaio. Os caldos de EC (*Escherichia coli*) e P/A (Presença/Ausência) foram distribuídos em tubos de ensaio acrescentando-se em cada amostra tubo de Durham invertido facilitando assim a captação de gases. Já os meios sólidos AN (Agar nutriente) e EMB (Eosina e Azul de Metileno) depois de preparados foram mantidos em frascos de Boeco de 1L. Nesta etapa dos experimentos, todos os materiais foram autoclavados, e após este processo os meios sólidos foram distribuídos em placas de petri como mostrado na figura abaixo (Figura 7).

Figura 10 – Meios de cultura sintéticos utilizados nos experimentos.



As colônias utilizadas neste estudo foram obtidas em um trabalho realizado anteriormente (Figura 1) sendo estas coletadas com auxílio de uma alça de inoculação e cultivadas em placas AN a uma temperatura de 37°C. Esse meio foi utilizado com a finalidade de ser um controle positivo do crescimento bacteriano. Como controle negativo foram utilizados os meios de cultura sem inoculação. Após isso, foram feitas inoculações em tubos contendo caldo EC e caldo P/A. Também foram realizadas inoculações em placas contendo agar EMB e meio SIM. Um esquema do procedimento realizado pode ser observado na Figura 8. As placas e os tubos foram incubados por até 48 horas. Nos tubos contendo o meio SIM foram adicionadas duas gotas do reagente de Kovacs, que é quem mostra se obteve o anel róseo, após o período de incubação.

Figura 11 – Esquema do procedimento realizado com as possíveis colônias de *E. coli*.



5 RESULTADOS

Estudos realizados anteriormente pela aluna Tailine Zamboni utilizando o método de plaqueamento em sistema Petrifilm™ pode-se observar possíveis colônias de *E. coli*. Neste sistema os pontos vermelhos indicam a presença de bactérias, sendo que os pontos que apresentam formação de gás são bactérias do grupo coliformes e a coloração azul indica a presença do coliforme específico *E. coli*. Como pode ser observado na Figura 1 houve a formação de 4 colônias azuis, as quais foram crescidas em meio AN para aumento da amostra e para a realização dos posteriores testes realizados. O meio AN é definido como um meio de cultura básico utilizado para a manutenção de microrganismos em geral. Na Figura 9 é possível observar o crescimento das colônias neste meio.

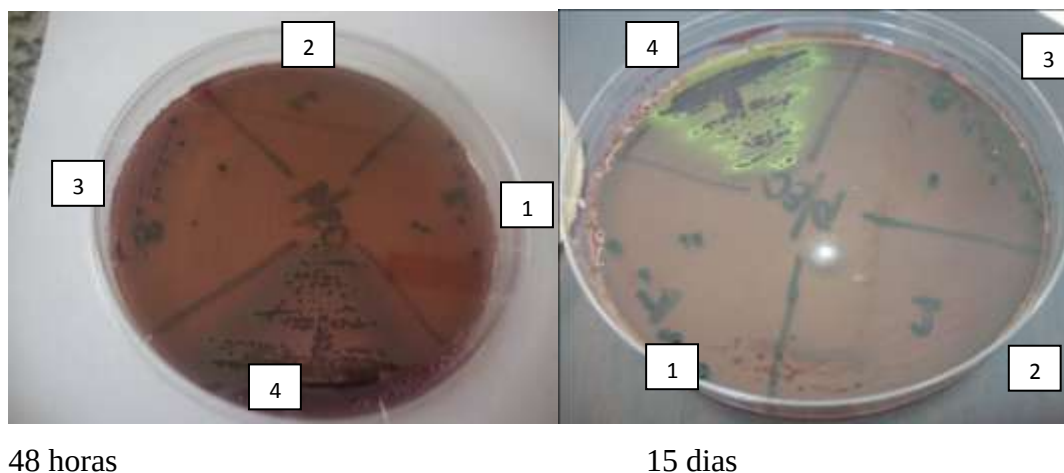
Figura 12 – Crescimento das quatro colônias em meio agar nutriente (AN).



Após esta etapa descrita, as colônias foram inoculadas em meios específicos que auxiliam na identificação definitiva de *E.coli*. O meio EMB contém os corantes eosina e azul-de-metileno que inibe as bactérias gram-positivas até determinado grau. Esses corantes funcionam também como indicadores de diferenciação em resposta à fermentação da lactose por microrganismos. Os coliformes produzem colônias preto-azuladas, enquanto as colônias de *Salmonellae Shigella* são incolores ou apresentam coloração âmbar transparente. As colônias de *Escherichia coli* podem apresentar um reflexo verde metalizado característico, devido à rápida fermentação da lactose (BD, 2011). Na Figura 10 é possível observar o crescimento das colônias em meio EMB, após 48 horas da inoculação o reflexo verde

metalizado não foi totalmente visível, porém com a manutenção da placa em refrigerador, após 15 dias foi possível verificar perfeitamente esse reflexo, evidenciando que apenas 1 das colônias (amostra 4) possuía a característica desejada.

Figura 13 – Crescimento das quatro colônias em meio EMB (eosina e azul de metileno).



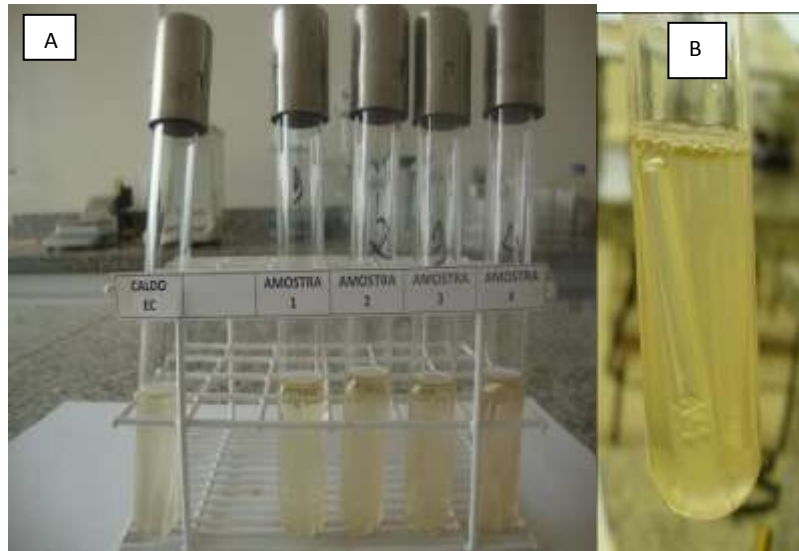
No caldo P/A a formação de gás e a acidificação do meio, evidenciado pela mudança de sua coloração de púrpura para amarelo, indica a presença de bactérias do grupo coliformes. A Figura 11 mostra os resultados obtidos para as 4 amostras. É possível verificar que somente na amostra 4 houve alteração da coloração com formação de gás.

Figura 14 – A) Crescimento das quatro colônias em caldo Presença/Ausência (P/A). B) Em destaque o aprisionamento dos gases no tubo de Durhan.



No caldo EC, como mostra na figura 12, foi possível observar a presença de gás apenas na amostra 4. O crescimento neste meio com formação de gás é confirmativo da presença de *Escherichia coli* (HIMEDIA, 2013). Castro et. al. (2010) também fizeram uso deste meio na avaliação microbiológica de diversas marcas de água mineral.

Figura 15 – A) Crescimento das quatro colônias em caldo EC (*Echerichia coli*). B) Em detalhe a amostra positiva.



No meio SIM foi possível observar o crescimento difuso das 4 amostras, este crescimento foi evidenciando a motilidade, indicando que nenhuma das colônias crescidas produziram o composto sulfeto. Isto pode ser afirmado devido o meio não apresentar a coloração negra, no entanto quando se testou a prova do indol, resultados positivos foram obtidos apenas para a amostra 4, onde após a adição do reagente de Kovacs, o tubo onde continha a colônia formou-se um anel róseo.

O uso deste meio é comumente indicado para detecção de bacilos Gram negativos, sendo muito útil na diferenciação de *E. coli* e *Salmonella*.

Figura 16 – A) Crescimento das quatro colônias em meio SIM (Sulfeto, Indol e Motilidade), B) Formação de anel roseo em meio SIM após a adição do reagente de Kovacs.



6 CONCLUSÃO

Dentre as colônias testadas apenas uma apresentou as características desejadas (*E. Coli*). Na parte experimental pode ter ocorrido algum erro, já que era esperado o resultado positivo nas 4 colônias, como indicava o sistema petrifilm.

A amostra positiva encontrada será usada como um indicador de qualidade para serem mostradas nas aulas práticas de Microbiologia.

REFERÊNCIAS

ALCARDE, A. R. **Processamento da cana-de-açúcar**. Brasília, DF: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, 2007.

ALCARDE, R. A. Fermentação. In: EMBRAPA – Empresa Brasileira de Agropecuária. **Cana-de-açúcar**. Disponível em: <www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_105_22122006154841.html>. Acesso em: 13 out. 2013.

ALCOOLBRÁS. O combustível renovável para seus negócios: 2002 e 2003. Disponível em: <<http://www.revistaalcoholbras.com.br/>>. Acesso em: 22 out. 2013.

ASHBOLT, N. J. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. **Toxicology**, Amsterdam, v. 198, n. 1-3, p. 229-238, 2004.

BD. **Instruções de utilização**: meios em placas prontos a usar. 2013. Disponível em <<http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9068>>. Acesso em: 19 nov. 2013.

BETTELHEIM, K. A. *Escherichia coli*. 2012. Disponível em: <www.sciencenet.com.au/>. Acesso em: 10 out. 2013.

BNDES – Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social; CGEE – Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: BNDES/CGEE, 2008. 316 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Anuário estatístico da agroenergia 2010**. Brasília, 2011. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 16 out. 2013.

BURBARELLI, R. C. **Avaliação da qualidade da água subterrânea e microbiologia do solo em área irrigada com efluente de lagoa anaeróbia**. 2004. 114 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

BURNQUIST, H. L.; RODRIGUES, F. R. Consumo de etanol definirá estabilidade do setor. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n. 8, 2008.

CARDOSO, R. J. C. **Corrosão de tubo de aço inoxidável (AISI 304) de alta pressão**. Salvador: COTEQ, 2002. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/106241140/Corrosao-de-tubo-de-aco-inoxidavel-AISI-304-de-alta-pressao>>. Acesso em: 15 out. 2013.

CASSINI, S. T. **Avaliação de Bioindicadores de Qualidade de águas**. Programa de pós-graduação em gestão ambiental-UFES-Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-Espírito Santo, 2011. Disponível em <www.inf.ufes.br/~neyval/Gestao.../aula_5_bioind_agua.ppt> Acesso em 05/11/13.

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. 137 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira**. Brasília, 2013. Disponível em: <http://http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_08_09_39_29_boletim_cana_portugues_-_abril_2013_1o_lev.pdf>. Acesso em: 22 out. 2013.

CASTRO, L. R. F.; CARVALHO, J. S.; VALE, V. L. C. Avaliação microbiológica de diferentes marcas de água mineral. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v.34, n.4, p.835-844, 2010.

DUARTE, J. C.; LOURENÇO, V.; RIVEIRO, B. **Continuous culture of flocculent yeast for etanol production**. Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, Biotechnology Department, Portugal, 2006.

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>. Acesso em: 10 out. 2013.

ELIA NETO, A. **Tratamento de efluentes da agroindústria sucroalcooleira**. Simpósio Febral, 1995.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

FRANCO, R. M. **Escherichia coli**: Ocorrência em suínos abatidos na Grando Rio e sua viabilidade experimental em linguiça frescal tipo toscana. 2002. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2002.

FREITAS, G. L.; FERREIRA, O. M. **Uso da água no processo de produção de álcool: estudo de caso**. Goiânia, 2006. Disponível em: <<http://www.ucg.br/ucg/prope/cpgss/ArquivosUpload/36/file/USO%20DA%20%C3%81GUA%20NO%20PROCESSO%20DE%20PRODU%C3%87%C3%83O%20DE%20%C3%81LCOOL.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2013.

GUARNIERI, L. C.; JANNUZZI, R. M. Proálcool: impactos ambientais. **Revista Brasileira de Energia**, v. 2, n. 2, 1992. Disponível em: <<http://www.sbpe.org.br/v2n2/v2n2a7.htm>> Acesso em: 22 out. 2013.

GUERRA, E. J.; ANGELIS, D. F. **Contaminação de processo industrial de fermentação etanólica e medidas operacionais de controle**. Araras: UFSCar, [s.d.]. (Apresentação de trabalho). Disponível em: <<http://www.cca.ufscar.br/~vico/2%20monitoramento/10%20Contaminacao.pdf>>. Acesso em: 19 out. 2013.

HIMEDIA. **Produtos**. Disponível em: <<http://http://www.himedialabs.com.br/produtos/>>. Acesso em: 13 nov. 2013.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

KAPER J. B.; NATARO J. P.; MOBLEY H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**, n.2, p. 123-140, 2004.

LACERDA, A. K. N.; MARIA, A. C.; MARTINS, C. L. S.; MANTUANELI, G. T.; COUTO, G. A. P.; SANTOS, G. L. P.; OLIVEIRA, H. E. S.; MEDINA, I.; BATISTA, J.C. A.; RAIA, K. S. S.; GIANNELLA, R. C.; COIMBRA, R. L.; COSTA e SILVA, V. C. Fermentação Alcoólica: Processos e Análises. In: SIMPÓSIO DE BASE EXPERIMENTAL DAS CIENCIAS NATURAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC, 9., 2011. **Anais...** São Bernardo: UFABC, 2011.

LEITE, H. T. C. Cobrança pelo uso da água e redução deste recurso natural no setor sucroalcooleiro. **Simpósio UDOP**, 2000.

LIMA, U. A. Aguardentes. In: AQUARONE, E. et al. (coord.). **Biotecnologia Industrial: alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher, v. 4, p. 145-182, 2001.

LOPES, A. **A usina de açúcar e sua automação**. 2009. Disponível em <<http://www.scribd.com>>. Acesso em: 17 out. 2013.

MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K. V. **Cinco Reinos: um Guia Ilustrado dos Filos da Vida na Terra**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

MARQUES, M. O.; MACIEL, B. F.; FIGUEIREDO, I. C.; MARQUES, T. A. Considerações sobre a qualidade da matéria-prima. In: MARQUES, M. O.; MUTTON, M. A.; NOGUEIRA, T. A. R.; TARSO JUNIOR, L. C.; NOGUEIRA, G. A.; BERNARDI, J. H. **Tecnologia na Agroindústria Canavieira**. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/UNESP, 2008.

MIERZWA, J.C.; HESPANHOL, I. **Água na indústria: uso racional e reúso**. São Paulo: Oficina de Textos, 2005.

NATALE NETTO, J. **A saga do álcool: fatos e verdades sobre os 100 anos do álcool combustível em nosso país**. Osasco: Novo século, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger: Princípios de Bioquímica. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NOGUEIRA, L. A. H.; LORA, E. E. S. **Dendroenergia: fundamentos e aplicações**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.

NOLASCO JR., J. **Desenvolvimento de Processo Térmico Otimizado para Mosto de Caldo de Cana na Fermentação Alcoólica**. 2005. 181 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Campinas, 2005.

OLIVEIRA, J. A. **Estudo da Radiação Ultravioleta no Controle dos Microrganismos na Água de Diluição e no Mosto de Melaço**. 2011. 40f. Trabalho de Conclusão de Curso

(Graduação em Tecnologia em Biocombustíveis) – Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, Jaboticabal, 2011.

PAPPA, D. M. A. **Pontos de contaminação por microorganismos no processamento da cana para fermentação etanólica e as barreiras térmicas existentes para seu controle.** 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Biocombustíveis) – Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, Jaboticabal, 2011.

PELCZAR JR.; J. M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, R. **Microbiologia:** conceitos e aplicações. São Paulo: Makron Books, v. 2, 1996. 517p.

PERRI, A. Processo de produção de etanol em usina na região de Campinas: água retirada da própria cana pode ser reutilizada com segurança. In: CRUZ, M. A. **Técnica permite reúso da água na produção de etanol e açúcar.** Jornal da UNICAMP, Campinas, 2010. Disponível em: <http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/setembro2010/ju475pdf/Pag05.pdf>. Acesso em: 14 out. 2013.

PETROBRAS Magazine. **Etanol:** um salto para o futuro. 2012. Disponível em: <<http://www.petrobras.com/pt/magazine/post/detalhe-18.htm>>. Acesso em: 22 out. 2013.

REPÓRTER BRASIL. **O Brasil dos Agrocombustíveis:** O Impacto das Lavouras sobre a Terra, o Meio e a Sociedade – Cana 2009. Centro de Monitoramento dos Agrocombustíveis. 2009.

RICHTER, C. A.; AZEVEDO NETTO, J. M. **Tratamento de Água.** São Paulo: Edgar Blucher, 1995.

ROSSELL, C. E. V. **Qualidade da matéria-prima.** In: Workshop Tecnológico sobre Produção de Etanol. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/PPaper_sessao_1_Rossell_000fxg4uzq002wyiv80soht9h3dff8cq.pdf>. Acesso em: 15 out. 2013.

ROSSETO, R. A cana-de-açúcar e a questão Ambiental. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; ANDRADE LANDELL, M. G. **Cana-de-açúcar.** Campinas: Instituto Agrônomo, p. 869-883, 2008.

STRUCTMED, 2013. Disponível em: <http://www-structmed.cimr.cam.ac.uk/Personal/randy/SLT/disease.html>
Acesso em 20/10/2013.

THE BLUE PAPER. Another friendly key west swimming buddy: antibiotic resistant *E-coli*. 2013. Disponível em: <<http://thebluepaper.com/article/another-friendly-key-west-swimming-buddy-antibiotic-resistant-e-coli/>>. Acesso em: 14 nov. 2013.

TORQUATO JR., H.; CALLADO, N. H.; PEDROSA, V. A.; PEMENTEL, I. M. C.; MENEZES, A. C. V.; OMENA, S. P. F. **Demanda de água nos processos industriais de açúcar e álcool.** Maceió: Universidade Federal de Alagoas - UFAL, 2009.

UDOP- União dos Produtores de Bioenergia. **Produção Brasileira de Etanol.** 2013. Disponível em:

<http://www.udop.com.br/download/estatistica/acucar_producao/16set13_producao_etanol_brasil.pdf>. Acesso em: 16 out. 2013.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-Açúcar. **Usina Virtual**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/usina-virtual>>. Acesso em: 16 out. 2013.

YOKOYA, F. Problemas com contaminantes na fermentação alcoólica. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Campinas, v. 9, n. 6, p. 38-39, 1991.

ZAMBONI, T. V. **Controle de contaminantes na água de diluição do mosto de melaço**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Biocombustíveis) – Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, Jaboticabal, 2013.