

Estudo sobre a viabilidade celular da levedura no processo de fermentação em uma usina de álcool e açúcar

Study on the cell viability of yeast in the fermentation process in an alcohol and sugar plant

Ana Beatriz Ferrari Jacob; Raquel Teixeira Campos¹

¹Centro Universitário Sagrado Coração, Bauru/SP, Brasil.

E-mail (autor principal): ana_ferrari_jacob@hotmail.com

RESUMO

Este trabalho foi elaborado com o intuito de analisar a viabilidade celular do processo fermentativo de uma usina de álcool, açúcar e energia no interior de São Paulo. A produção de etanol é importante para as transições econômicas nacionais e ganha destaque por ser um combustível limpo em relação aos que são provenientes do petróleo, por esse motivo, o estudo da sua principal fonte de origem merece destaque, as leveduras são as protagonistas que consomem o açúcar que provém do caldo de cana, produzindo álcool e CO₂. São microrganismos sensíveis e por consequência a viabilidade é facilmente atingida por diversos tipos de estresse e sua porcentagem começa a decair durante a safra, afetando o rendimento final do álcool. Os resultados obtidos através desse estudo de campo, confirmou a queda da viabilidade e as variáveis que afetam esse microrganismo, como as temperaturas elevadas, dosagem de antibióticos ou ácido sulfúrico, erros operacionais, alimentação com vazões incorretas, leveduras selvagens e paradas da usina que geram consequências negativas. O trabalho busca contribuir para que esta e outras usinas que se identifiquem com o problema, fiquem atentas com os pontos exaltados e busquem a melhoria contínua do setor para se obter resultados bons e evitar chegar a uma fermentação lenta ou até mesmo ter que comprar novas leveduras durante a safra para substituir as que estão debilitadas a ponto de morrer.

Palavras-chave: Dornas. Floculação. Propagação. *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

This work was carried out with the aim of analyzing the cellular viability of the fermentation process of an alcohol, sugar and energy plant in the interior of São Paulo. Ethanol production is important for national economic transitions and is highlighted for being a clean fuel in relation to those that come from petroleum, for this reason, the study of its main source of origin deserves to be highlighted, yeasts

are the protagonists that consume the sugar that comes from the sugarcane juice, producing alcohol and CO₂. They are sensitive microorganisms and, consequently, their viability is easily reached by different types of stress and their percentage begins to decline during the harvest, affecting the final alcohol yield. The results obtained through this field study confirmed the drop in viability and the variables that affect this microorganism, such as high temperatures, dosage of antibiotics or sulfuric acid, operational errors, feeding with incorrect flows, wild yeasts and plant shutdowns that generate negative consequences. The work seeks to contribute to this and other plants that identify with the problem, be aware of the exalted points and seek continuous improvement in the sector to obtain good results and avoid reaching a slow fermentation or even having to buy new yeasts. during the harvest to replace the one that is weakened to the point of death.

Keywords: Dornas. Flocculation. Propagation. Saccharomyces cerevisiae.

INTRODUÇÃO

As canas-de-açúcar devido suas características são consideradas gramíneas, sua estrutura pode ser dividida em duas partes, a superior que são as folhas e a inferior que são suas raízes, e entre ambas, localiza-se os colmos, onde se concentram a sacarose e outros componentes. Destacando-se por ser a cultura mais utilizada para a produção de álcool e açúcar (MARTINS, 2022, p.8).

O Brasil ocupa o primeiro lugar no ranking mundial de maior produtor de cana-de-açúcar, gerando destaque através de seus subprodutos, como o álcool e o açúcar. Comparado com o resto do mundo somamos cerca de 40% de toda produção dessa matéria-prima. Somente no estado de São Paulo há mais de 100 usinas (ESTADÃO, 2021). Os resultados da safra 2020/2021 mostram que houve a moagem de 654,5 milhões, que conseqüentemente promoveu 41,2 milhões de toneladas de açúcar e 29,7 bilhões de litros de etanol, sendo São Paulo responsável por 54,1% de toda essa produção (NACHILUK, 2021).

Segundo Silva, Serpa e Rangel (2019, p.4) devido ao aumento de veículos, houve a necessidade de esquivar-se do aumento da poluição por combustíveis fósseis, através do etanol. Os carros que são abastecidos por etanol, produzem uma diminuição no tempo entre o torque e a quantidade de rotações, devido a capacidade de sofrer maior compressão, e também motivo de ser consumido com maior velocidade (DIAS, s.d.).

A geração da gasolina só ocorre devido a refinaria do petróleo que libera carbono para a atmosfera, causando impactos negativos ao meio ambiente. O etanol é obtido através da cana que já possui carbono na sua estrutura, sendo emitido apenas o que já existia, sem adição, e no final do uso deste combustível, o mesmo é absorvido novamente pelas plantas, poluindo menos (MORENO, 2021).

O processo de fermentação inicia-se quando as leveduras se alimentam dos açúcares providos do mosto (caldo de cana-de-açúcar + mel), em sistema anaeróbico, e produzem etanol e CO₂, enlaçado a esse meio ocorre sua propagação (COSTA, 2019). O processo de fermentação consome a glicose e frutose, gerando álcool, CO₂ e calor (SANTOS, 2016). A produção de etanol não atinge 100% de eficiência, pois ocorre a contaminação bacterina, que se estabelece no ciclo através do caldo. Como consequência gera ácido lático e instalação de leveduras selvagens (KRONKA, 2021). Através dessa alimentação provida pelo caldo da cana, existe a passagem de leveduras selvagens, ou seja, se o processo se iniciou com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* não significa que até o final da safra a multiplicação dela ocorrerá, pois outro gênero pode tomar conta da fermentação (SANTOS, 2021).

No processo fermentativo, as leveduras conseguem adaptar-se em dois meios: aerobiose, ou seja, degrada completamente a glicose (quebrando todas as ligações de carbono) e depende do oxigênio (atrai os elétrons para produzir bastante ATP), produzindo assim energia necessária para a reprodução celular e baixo resultado de etanol, e a anaerobiose que ocorre ao contrário, pois não necessita de oxigênio e o objetivo é produzir etanol e CO₂ (SAMPAIO, 2021).

O estresse da levedura é proporcional a sua multiplicação, sendo do gênero *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, que melhor desempenha essa função devido a sua resistência em relação a outras leveduras (SILVA, 2018).

É através da viabilidade da levedura que se consegue determinar se o rendimento da produção de álcool está em boas condições, pois é atrelado proporcionalmente o aumento da viabilidade com o aumento da geração de álcool (CUNHA et al., 2019). A viabilidade da levedura sofre declinação durante a safra devido a fatores relacionados a contaminação, características físico-químicas fora dos parâmetros, manuseio operacional incorreto, equipamentos sem assepsias corretas, entre outros, e como resultado ocorre uma fermentação lenta ou até mesmo sua paralisia.

Segundo Lira (2022) o rendimento fermentativo em uma usina é calculado pela quantidade de álcool produzido na fermentação, entrelaçado com a hipótese de que todo substrato seria convertido em álcool, caso ele não fosse perdido, juntamente com os subprodutos e açúcares que não são transformados no processo.

Objetiva-se, neste trabalho, descrever um estudo sobre as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, mostrando através de dados analisados em laboratório e experiências vividas em campo industrial de uma usina de álcool e açúcar, os fatores que fazem decair a viabilidade do fermento, e que respostas rápidas e eficientes podem ajudar o processo fermentativo a não chegar na sua fase de degradação total. Através de avaliações de campo, há melhoramentos a serem pontuados e que poderão servir de ajuda para a indústria em questão.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido através da participação da autora em todo o processo de fermentação em uma usina de álcool e açúcar durante sete meses, desde o início da propagação do fermento (fim da entressafra) que ocorreu no dia 08/04/2022 até dia 09/10/2022, época que ocorreu a finalização da fermentação, obtendo-se assim uma boa quantidade de análises. Durante esse período foram extraídas e visualizadas diversas informações sobre momentos de altos e baixos picos da viabilidade, assepsia de equipamentos, rodadas de antibióticos, impacto gerado caso ocorra infecção, erros operacionais.

Os dados foram obtidos através da realização de análises microbiológicas de amostras de fermento, coletadas todos os dias somente uma vez, sempre às 8 horas, e eram levadas ao laboratório industrial dessa usina e anotado os resultados em uma planilha. Todos os dias eram dornas diferentes analisadas, pois cada uma possui seu ciclo e não morre sempre no mesmo horário. Juntamente com este trabalho de campo, foram desenvolvidas pesquisas no Google acadêmico, onde foram encontrados diversos artigos para obter-se dados já estudados e essenciais sobre o tema desenvolvido.

MULTIPLICAÇÃO DO FERMENTO

A multiplicação do fermento ocorre antes de todos os processos (moenda, tratamento de caldo, fábrica de açúcar e caldeira) estarem em funcionamento, para deixar as dornas preparadas para o ritmo quando tudo estiver operando e não prejudicar a rampa de moagem. A etapa inicial para desenvolver a fermentação é a realização dos testes de estanqueidade (encher de água o equipamento) das serpentinas de resfriamento das 10 dornas, com o intuito de verificar se tem vazamento. Caso isso esteja ocorrendo haverá a contaminação da levedura através da água que passa dentro da serpentina com o objetivo de resfriar o fermento.

Em seguida realizou-se a assepsia com cloro, dois dias antes da multiplicação, em toda linha de fermento (dorna, cuba, sangria, mosto, ou seja, por toda área que irá passar o fermento), para eliminar qualquer vestígio de levedura da safra passada e de bactérias. Depois, houve apenas a passagem de água filtrada para retirar qualquer resíduo de cloro, pois a existência dele nos equipamentos oxida o inox, sendo prejudicial. Posteriormente, encheu-se as cubas de água filtrada, para descobrir a presença de algum vazamento, normalmente existem vazamentos em sua chapa lateral, devido a isso é necessário esse teste, para soldar caso exista alguma perfuração.

A iniciação da propagação do fermento ocorreu da seguinte forma: das três cubas existentes, colocou 10% (200 m³) de água filtrada na cuba 2, formando um “colchão d’água”, que é utilizado para hidratar o fermento. Logo depois, de maneira manual jogou-se 760 kg de levedura seca, que ficou cerca de 1 hora hidratando, com o misturador mexendo, pois ela estava hibernada e através dessa ação “acorda”, nesse momento é inexistente bactéria, ou seja, sua viabilidade está

100%. Como o objetivo é a multiplicação foi injetado ar para aumentar esse fator e fortalecer a membrana celular. Durante esse tempo dosou-se 3 L de antibiótico manualmente com balde, pois o fermento não tem resistência nenhuma nessa fase inicial, e como a alimentação estava prestes a acontecer essa ação gera um fortalecimento caso tenha bactérias no mosto.

Através da Figura 1 é possível visualizar a levedura fora de sua embalagem, já na Figura 2 ela está hidratada e com zero de contaminantes, pode-se dizer que sua viabilidade é de aproximadamente 99,9%, sua cor pode comprovar isso, pois está clara e não possui odor azedo.

Figura 1. Levedura antes de hidratação.



Fonte: a própria autora.

Figura 2. Levedura já hidratada.



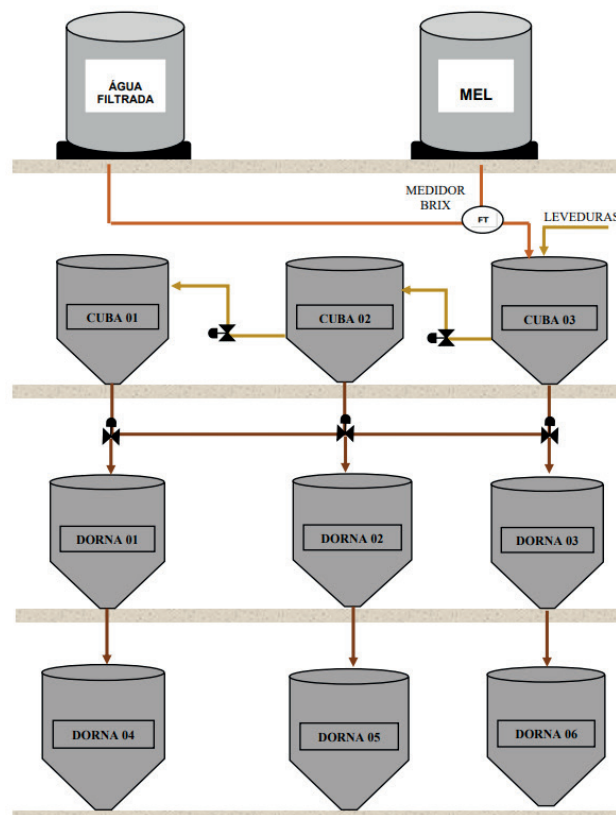
Fonte: a própria autora.

Após todo esse procedimento inicia-se a alimentação. Nessa fase dosou 120L de nutrientes para fortalecer o fermento. Segundo Santos (2008), as leveduras necessitam de fontes de carbono, vitaminas e nutrientes. Esses nutrientes influenciam na multiplicação e desenvolvimento das células, juntamente com o melhoramento da capacidade de transformar açúcar em álcool.

O mosto que alimenta é obtido da seguinte forma: há o tanque de mel estocado da safra passada que estava 6 meses guardado (dias antes de iniciar a alimentação há a necessidade de recircular esse mel para não ocorrer sua degradação e testar as bombas para comprovar se não estão travadas) e um tanque de água filtrada, as linhas se cruzam, onde ocorre a mistura dos dois, como de início ainda não tinha caldo da moenda, misturou com água, mas futuramente existe essa troca. O °Brix inicial desse mosto tem que estar em torno de 10 a 12°Bx. Nessa fase a alimentação ocorre de forma lenta, pois o objetivo é que esse fermento se propague e não que gere álcool e CO₂. Então esse mosto começa a alimentar a cuba 2 (inicial), quando ela chega no nível desejado (aproximadamente 85%), ocorre a manobra do primeiro corte que segue para as outras duas cubas, o mosto está em torno de 14 a 15°Bx, esse processo de encher as cubas, dura em torno de 2 a 3 dias. Quando as mesmas estiverem no nível apropriado, o segundo corte é feito para as dornas 1, 2 e 3, e após atingirem o nível o terceiro corte é manipulado para as dornas 4, 5 e 6, nas dornas o mosto já está entre 20 e 22 °Brix. As dornas de 1 a 8 possuem 480 m³ e a dorna 9 e 10 possuem 550 m³. Todo esse procedimento de cortes é elaborado para que quando iniciar a moagem de cana, já tenha donas para serem alimentadas pelo caldo + mel (mosto).

Em seguida, depois de finalizar os cortes, alimenta-se todas. Quando já consumiram todo açúcar que suportam, elas “morrem” (cada dorna tem seu ciclo) e ficam no meio alcoólico que produziram. Então o próximo passo é centrifugar, como está no início a concentração de fermento é mínima (2% a 3% aproximadamente), apresenta fisionomia bem “aguada”, e o bico utilizado na centrífuga é o menor. Conforme esse fermento vai aumentando a concentração durante os dias, esse bico é alterado para um maior. Nas centrífugas ocorre a separação do vinho a destilar que segue para destilaria e o levedo concentrado volta para a cuba de passagem, onde recebe água filtrada para diluir e H₂SO₄ para correção de pH. Essas passagens de fermento através de cubas e dornas são ilustradas na Figura 3.

Figura 3. Divisão do fermento.



Fonte: a própria autora.

FERMENTAÇÃO DURANTE A SAFRA

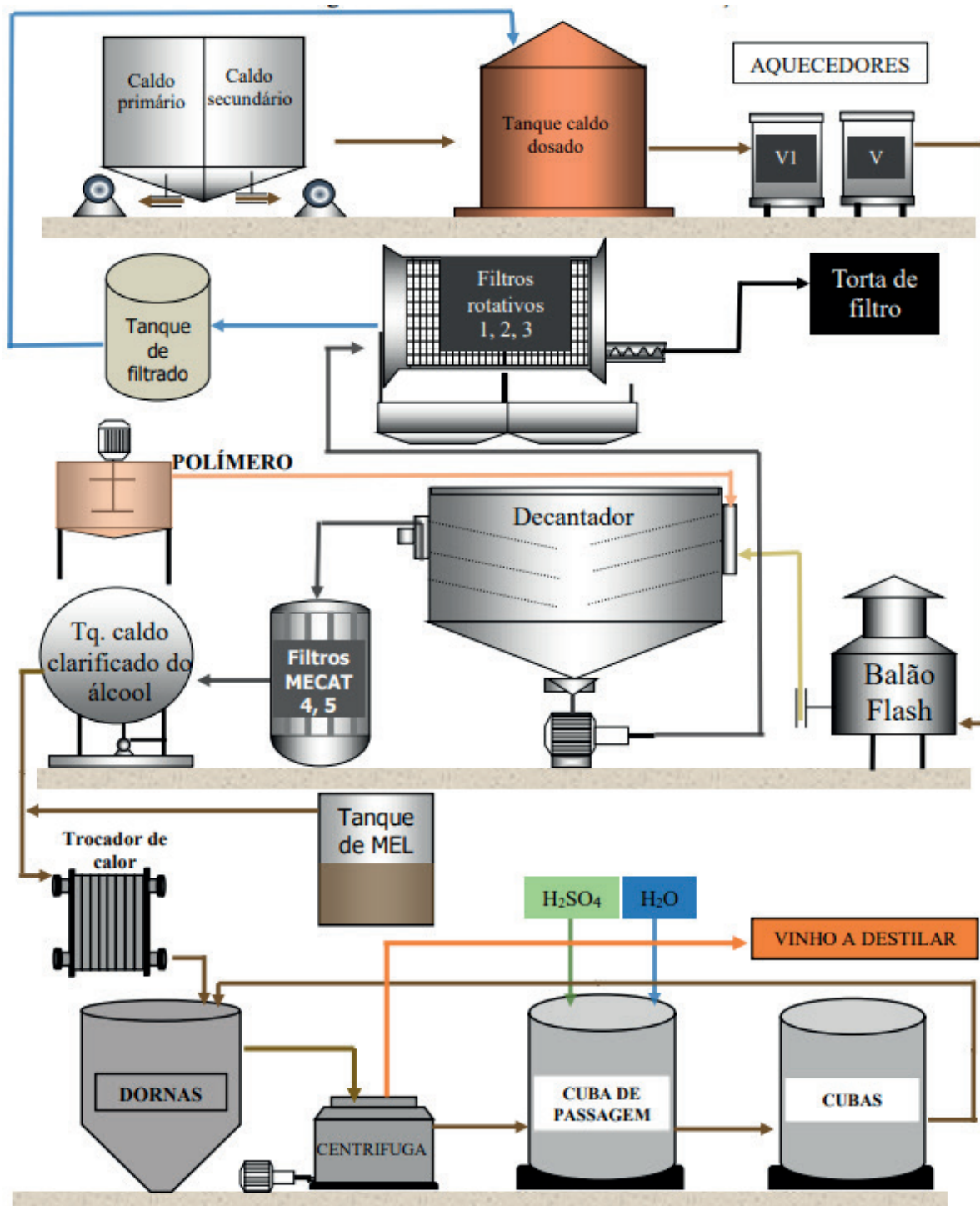
A moenda extrai o caldo da cana-de-açúcar e gera caldo primário e secundário. O secundário segue para o tanque de dosado (mistura do secundário com o caldo filtrado), que vai para os aquecedores e devem ter uma temperatura de 105°C para extinguir todas as bactérias. O aquecimento é primordial para a retirada dos gases pelo balão de flash (flasheamento) retirando-se todo ar (O₂) presente no caldo. Na decantação, se deixar entrar ar junto com o caldo (devido a temperatura baixa) nos decantadores, o bagacilho vai subir junto com esses gases e acaba sujando o caldo. Em seguida desloca-se para o decantador convencional, onde recebe polímero que junta toda sujeira, pesando-a e conseqüentemente decantando-a, assim o caldo fica mais limpo. Os mecat's são a última etapa de filtragem do caldo, onde é retirada as impurezas que passaram pelo decantador, sendo em maior parte bagacilho. Por fim, chega no tanque de caldo clarificado do álcool.

O caldo clarificado do álcool juntamente com o mel que vem da fábrica de açúcar, geram o mosto, que servem para alimentar as dornas. Eles se cruzam através das tubulações, misturando-se dessa forma. Nesta etapa o mosto tem um brix e temperatura respectivamente de

9 e +/- 75°C á 80°C. Esse mosto segue para o trocador de calor, onde ocorre seu resfriamento através da água que vem das torres de resfriamento que é um circuito fechado, ou seja, passa no trocador e esquenta, em seguida vai para as torres e resfria, permanecendo nesse ciclo. Então, através dessa troca, o mosto fica com uma temperatura de aproximadamente de 28°C a 32°C para alimentar as dornas, pois assim evita proliferação de contaminantes.

As dornas são alimentadas através de uma vazão determinada, normalmente 250m³/h (a receita varia de acordo com a necessidade do processo) e estas vão produzindo álcool e CO₂, pois sua multiplicação não é mais o foco. Em um determinado momento, o fermento chega no seu ápice de se alimentar, o Brix começa a se repetir, simplesmente cessa essa ação e consequentemente para de produzir, ficando nesse meio alcoólico. Para não ter consequências negativas, como por exemplo matar a levedura, pode ficar nesse meio no máximo 1h, então inicia-se a centrifugação para separar o vinho a destilar (segue para destilaria) do levedo concentrado, aproximadamente 60%. Esse fermento segue para cuba de passagem que é sistema contínuo e este serve para diluição e pré-tratamento possuindo duas entradas: além do levedo, a entrada de ácido sulfúrico (para manter um pH de aproximadamente 2 que deixa o meio inadequado para bactérias) e água para manter uma concentração de 25%. Esse fermento segue para as cubas para dar o tempo de tratamento (entre 2h a 3h) vai para a cuba 3, a hora que dá um certo nível e manda pra 2, depois manda para 1. Nas cubas tem dosagem contínua de ácido sulfúrico para manter o pH de 2 obtido na cuba de passagem. E por fim, volta tratado para as dornas e o ciclo se repete. Como pode ser observado na Figura 2 a seguir.

Fluxograma 2: Funcionamento da fermentação.



Fonte: a própria autora.

Na alimentação das dornas quando o °Brix do mosto entra baixo, isso tem como consequência maior multiplicação da levedura, porém na safra o objetivo não é esse, e sim produzir álcool, então é necessário manter um °Brix acima de 20°Bx para se reproduzir menos e gerar mais álcool. Ou seja, quando o °Brix do mosto está baixo, a levedura entende que tem pouca

comida para uma população muito grande, então ela começa a se multiplicar mais com “medo” de morrer, pois entende que não tem comida para todo mundo. Quando o °Brix está ideal, ela fica confortável, produzindo bastante etanol e diminui o brotamento. A alimentação não pode ter velocidade rápida, pois gera maior quantidade de glicerol e baixo rendimento, e não pode ser lenta pois o álcool evapora e aumenta a probabilidade de contaminação.

ANÁLISE DOS FERMENTOS

As análises realizadas no fermento têm como objetivo descobrir o resultado dos seguintes componentes: pH, °Brix (quantidade de sólidos solúveis totais na amostra), concentração, viabilidade, brotamento, bastonetes, floculação e ácido láctico. Através da viabilidade é possível identificar as células vivas, células mortas, brotos vivos e brotos mortos. Também se realizou as análises do ácido láctico do mosto e o quanto tinha de cloro na água.

A primeira ação com a amostra de fermento é tirar seu pH no pHmetro, em seguida encher quatro cubetas dele e colocar na centrífuga por 10 minutos em uma rotação de 3000rpm, pois através disso descobre-se a concentração (separando e mostrando a quantidade de fermento e sobrenadante (água, álcool e resíduos existentes)), completando a cubeta de 15ml com fermento, e através do sobrenadante faz-se a acidez, coletando-o através de uma pipeta 20ml dele e 50ml de água destilada em um béquer, então é levado para ferver e em seguida vai colocando ácido e medindo quantas ml gasta até chegar em um pH de 8. O próximo passo é destilar o fermento para descobrir seu grau alcoólico (°GL).

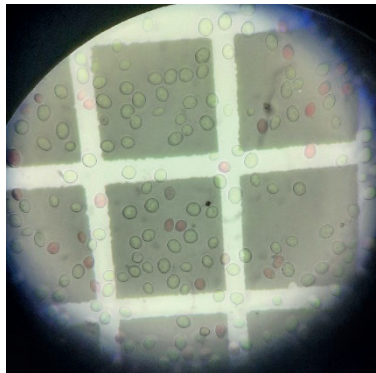
Em seguida a amostra de fermento é levada para a sala da microbiologia, sendo analisado a viabilidade (broto vivo, broto morto, células vivas e células mortas), bastonetes e ácido láctico. A diluição realizada nas análises é elaborada de acordo com a concentração do fermento, por exemplo, no início da safra o fermento tem uma baixa concentração portanto, uma diluição pequena. O manuseio correto impacta diretamente no espalhamento das células do fermento que serão posteriormente lidas no microscópio, caso contrário elas ficam juntas e dificultam a contagem. Entre células vivas e mortas o ideal é contar aproximadamente 500.

Para se analisar a viabilidade todos os dias há a necessidade de preparar a solução trabalho, que é resultado da junção de 0,1 ml de eritrosina + 0,5 ml da solução tampão de fosfato, essas suas soluções são estoques (puras) e ficam na geladeira até chegar seu fim. Em seguida, homogeneiza ambas e obtém-se a solução trabalho.

Posteriormente coloca-se 1ml da solução no tubo de ensaio. A amostra de fermento é diluída com água de acordo com a sua concentração, sendo adicionada papaína, para desflocular as células. Depois de agitar bem, coloca-se 1ml do fermento diluído juntamente no tudo de ensaio.

Essa junção feita no tubo de ensaio é posicionada com o auxílio de uma micropipeta entre a lamínula e a Câmara de Neubauer. O excesso é enxugado, pois as células ficam se movimentando e dificulta a contagem. O óleo de imersão é pingado em cima do campo de contagem, que é onde vai deslizar o microscópio, ajudando a ter uma melhor visualização. A Figura 4 é a imagem que se obtém das células através do microscópio.

Figura 4 – Visibilidade das células de determinado fermento.



Fonte: a própria autora.

Inicia-se a contagem dentro dos campos, das células vivas (são as verdinhas), células mortas (são as vermelhinhas), broto vivo (são as células pequenas verdes que estão grudadas nas células maiores, quando ela cresce se desprende e é considerada célula viva) e o broto morto (célula pequena vermelha que está grudada em uma célula maior vermelha (ambas mortas)). Essa contagem é inserida no boletim para se obter um controle e não se perder contando, posteriormente esses números são inseridos nas fórmulas, obtendo-se os valores finais. O cálculo utilizado para descobrir a porcentagem da viabilidade, ocorre através da equação matemática (1):

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \frac{N^{\circ} \text{ de células vivas}}{N^{\circ} \text{ cél. vivas} + N^{\circ} \text{ cél. mortas}} \cdot 100 \quad (1)$$

Durante a fase de brotamento, a célula está se desenvolvendo e isso gera um aumento da velocidade entre a taxa de álcool por levedura. Sendo importante não a estressar e uma forma de melhorar isso é a aplicação de oxigênio, que as ativa e inibe parte do stress (LEITE et al., 2019). O brotamento são as células que ainda estão se multiplicando, sendo necessário ter um padrão mínimo, porque pode ocorrer delas só se multiplicarem e não produzirem a quantidade de álcool suficiente. Então a partir da equação matemática (2) é possível encontrar as células que estão se multiplicando, só envolve brotos vivos, sendo representada como:

$$\% \text{ Brotamento} = \frac{N^{\circ} \text{ de brotamento vivos}}{N^{\circ} \text{ cél. vivas}} \cdot 100 \quad (2)$$

Segundo Cardoso (2022, p.14) o broto é formado quando a célula da levedura está na fase G1 onde ela está com suas funções normais e passa para a fase S ocorrendo a duplicação da cromatina (responsável pela atividade células) e a síntese de DNA, ocorrendo assim a divisão da célula e indo para fase G2 onde tem maior produção de ATP, crescendo até iniciar a mitose, ou seja, uma célula se divide em duas células idênticas, nascendo assim o broto.

A viabilidade de brotamento é um cálculo que envolve brotos vivos e brotos mortos, nesse caso quanto maior o valor, melhor porque significa que possui mais brotos formando do que brotos morrendo. Então a equação matemática (3) indica quanto tem de brotos vivos em relação aos mortos. Sendo:

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

O número de células vivas é calculado através da equação matemática (4):

$$\frac{N^{\circ} \text{ células vivas}}{\text{ml}} = \frac{\text{Total de células vivas}}{\text{Total de retículos contados}} \cdot 4.000 \cdot D \cdot 10^3 \quad (4)$$

Os bastonetes são as infecções que surgem nas células do fermento, e para descobrir a porcentagem sobre a quantidade deles é realizada uma análise separada da viabilidade. É colocado 1ml de azul de metileno em uma cubeta e adiciona-se junto 1ml da amostra de fermento diluído. Ambos são agitados e através do apoio de uma micropipeta é sobreposto na lamínula 0,003ml, pinga-se uma gota óleo de imersão para realizar a leitura.

A equação matemática (5) é utilizada para cálculo dos bastonetes:

$$\frac{\text{Bastonete}}{\text{ml}} = \left((Fm \cdot \left(\frac{1}{\text{Volume da amostra}} \right) \cdot (M) \cdot (D)) \right) \quad (5)$$

Volume da amostra = 0,003

FM = fator do microscópio (15719)

M = Total de bastonetes vivo / número de campos contados

D = diluição utilizada

O ácido láctico está sempre presente na fermentação, pois o mosto possui (devido ao mel que vem da fábrica de açúcar e do caldo que possui leveduras selvagens e realiza vários caminhos até chegar na fermentação), e nas dornas ele pode aumentar se não controlar através de

temperatura, asepsia de dornas etc. Ele é o subproduto da fermentação, que não é utilizado, aumentando a acidez do meio e conseqüentemente afetando a viabilidade da levedura. Devido a isso a análise do ácido láctico é muito importante e para realizá-la utiliza-se o aparelho medidor, Figura 6, que possui o local onde adiciona-se fita (descartáveis), onde “pingos” de fermento são colocados, realizando-se assim a medição.

Figura 6 – Fita com fermento no interior equipamento



Fonte: a própria autora.

O resultado é obtido em mmol/L, sendo necessário multiplicar por 90 para obter o resultado em ppm (partes por milhão). Para o cálculo utiliza-se a equação matemática (6):

$$\text{Ácido Láctico [ppm]} = (\text{Leitura lactímetro}) \left[\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right] \cdot 90 \quad (6)$$

RESULTADOS E DISCUSÃO

A Tabela 2 demonstra a média (soma dos valores diários) obtida de cada variável que é essencial para o bom funcionamento da fermentação, do mês de abril que foi o início da propagação até o mês de outubro onde ocorreu a finalização da mesma. Os resultados são os seguintes:

Tabela 2. Resultados das análises microbiológicas.

	PADRÃO	ABR.	MAIO	JUN.	JUL.	AGO.	SET.	OUT.
pH	2,0 a 4,5	4,67	4,46	4,49	4,39	4,53	4,44	4,39
BRIX	2,0 a 3,0	2,15	3,11	3,04	2,84	2,76	2,75	2,41
LEVEDO (%)	7,0 a 11,0	4,59	9,4	9,68	9,06	9,82	9,27	7,9
VIABILIDADE (%)	≥ 70,00	91,73	63,21	68,98	63,79	66,8	60,81	61,12
BROTAMENTO (%)	7,0 a 12,0	8,44	10,95	8,86	9,4	10,34	10,22	9,76
N° CÉLULAS VIVAS	N/A	724,05	568,77	708,07	573,07	513,71	451,84	405,28
N° CÉLULAS MORTAS	N/A	107,7	331,83	320,25	325,03	264,46	291,16	269
N° BROTOS VIVOS	N/A	53,8	59,5	59,78	51,6	50,32	43,72	39,43
N° BROTOS MORTOS	N/A	12,75	45,6	43,89	42,23	37,28	35,44	28
CÉL/mL	> 10 ⁸	3,78.10 ⁸	4,68.10 ⁸	6,16.10 ⁸	5,11.10 ⁸	4,94.10 ⁸	3,84.10 ⁸	3,30.10 ⁸
BASTONETES/ mL	< 5.10 ⁶	4,05.10 ⁶	7,25.10 ⁶	3,84.10 ⁶	1,90.10 ⁶	2,13.10 ⁶	4,47.10 ⁶	7,36.10 ⁶
ÁCIDO LÁTICO (ppm)	≤ 500	644,35	803,03	505,8	367,03	403,2	560,52	627,71
FLOCULAÇÃO (%)	< 50	9,9	14,17	60,35	71,5	84,46	81,6	88,43

Fonte: a própria autora.

No mês de abril a viabilidade estava no seu ápice, pois era a época que ocorreu sua propagação, ou seja, possuía muitas células vivas, porém ela não fica 100% pois a alimentação possui acidez, ácido lático, entre outros. A média do ácido lático ficou acima do padrão, devido a várias ocorrências, no dia 13/04/2022 ainda não tinha começado a alimentação das dornas, ou seja, não era para ter ácido lático alto, porém as mesmas tiveram, como por exemplo a dorna 1 que deu 657 e a dorna 3 que estava 747, sendo contaminadas através do ar. Sucedeu-se no decorrer do mês a quebra do decantador 2 do açúcar, houve a necessidade de mantê-lo parado por uns dias para manutenção, e conseqüentemente aumentou a vazão de caldo vindo da moenda para o decantador 1 do álcool, devido a isso o vapor para aquecer esse caldo não estava sendo suficiente, não atingindo a temperatura necessária para extinguir a maioria dos microrganismos que estão presentes no caldo.

Outro fator encontrado, é a falta de cleaning place (CIP), ou seja, limpeza que ocorre nos equipamentos através da passagem de água quente. Não foi realizado nos trocadores de calor, sendo um erro operacional. O CIP geralmente é feito quando acaba a centrifugação ou até mesmo antes de iniciar a alimentação no final de cada ciclo, com uma duração de aproximadamente 40 minutos, com condensado (água muito quente). Os problemas que impactam no CIP muitas vezes são bombas quebradas, bicos de limpeza quebrados ou sujos, válvulas em falhas. A correção disso envolve manutenções preventivas nos equipamentos, rotinas de limpeza e inspeção

nos bicos. Ocorre também por ordem de gestão, ou seja, por achar que não há necessidade de fazer todo o ciclo do CIP ou como alternativa quando o processo está muito cheio, com o intuito de não perder tempo, já começa a alimentar as dornas. A solução para isso seria melhores instruções aos operadores.

A porcentagem de levedo possui essas extremidades como padrão, pois as leveduras utilizam açúcar para se manterem vivas e se multiplicarem. Quanto maior a quantidade de levedo, maior será a perda de açúcares para manutenção das células, formação de subprodutos e estresse celular, diminuindo a formação de etanol. Pode-se notar que somente no mês de abril ele estava baixo, pois o fermento ainda não estava bem concentrado. Nos demais meses, os valores ficaram dentro do desejado.

Do mês de maio até outubro a viabilidade manteve-se abaixo de 70%. Como a intenção é produzir álcool, o fermento que é multiplicado, tira-se o excesso e manda para a fábrica de levedura para secar, decaindo a viabilidade. As dosagens de dióxido para controle microbiológico, afeta a viabilidade, diminuindo-a. A temperatura das dornas é a variável que mais influência, se ela está alta favorece as bactérias pois ficam mais rápidas que a levedura, e em temperaturas baixas a atividade das leveduras diminuem. Durante a safra, o fato mais decorrente é quando as válvulas das serpentinas são abertas somente quando a temperatura da dorna já está em um grau alto e como é um grande volume, até o resfriamento agir, sobe mais a temperatura prejudicando a viabilidade.

A alimentação e a quantidade adequada são essenciais para a viabilidade, pois a membrana da levedura é permeável seletiva, então controla o que entra dentro dela. O ideal é açúcar, então ela fica nesse meio, o açúcar entra e vai produzir o etanol e excreta-o. Porém quando tem um mosto de baixa pureza e muitos sais, ela vai selecionar açúcar e juntamente os sais entram, e isso começa a prejudicá-la, podendo causar floculação ou inibição, decaindo assim a viabilidade.

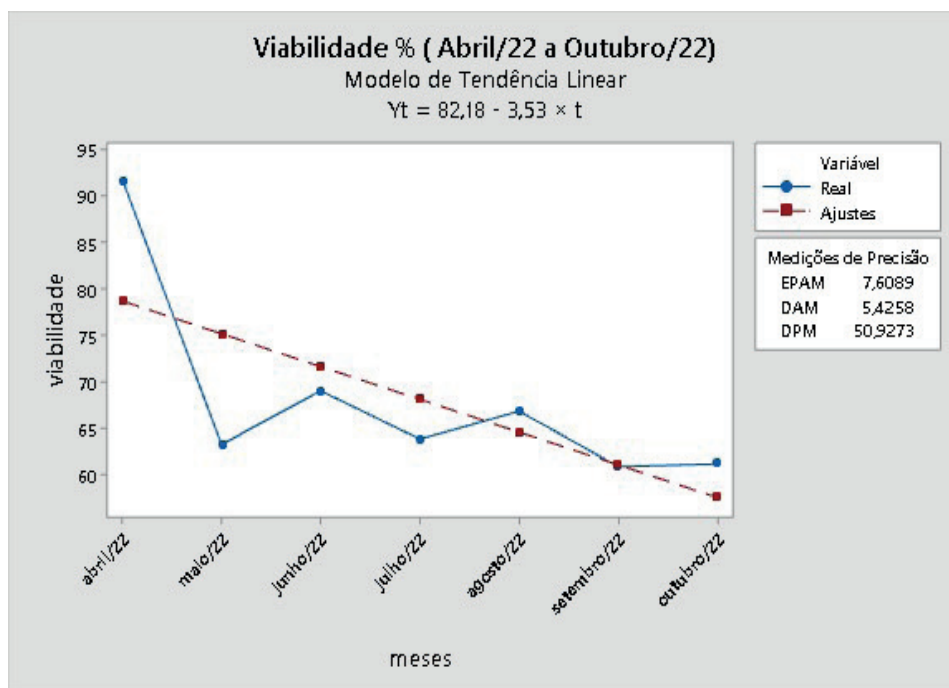
As dornas 9 e 10 são mais eficientes pelo fato de possuírem trocador de calor, assim, quando sua temperatura começa a crescer, as válvulas de água do trocador, que são automáticas, já vão se abrindo, tendo um maior controle. E o contrário também, quando a temperatura começa a diminuir, as válvulas começam a se fechar.

A contaminação aumenta com temperaturas acima de 32°C e com a queda do PH, sendo necessário a utilização de antibiótico para melhorar. Quando o fermento demora para cessar de gerar álcool, causa um aumento nas infecções também (PEREIRA et al.,2020).

A viabilidade é afetada por diversas formas de contaminação, que podem ocorrer através da baixa temperatura no tratamento do caldo (não extinguindo assim a maioria dos microrganismos), assepsias com deficiência nas dornas, trocadores de calor e linhas de passagem, erros operacionais, temperatura das dornas, elevado nível de residual de cloro na água, pH, tempo de dornas “mortas”, vazões baixas ou altas de alimentação, entre outros fatores. Essas questões

geram um baixo rendimento alcoólico, e geralmente são tratadas através de antibióticos. Se a viabilidade decair, conseqüentemente terá uma quantidade menor de levedura para consumir determinada vazão de açúcar, gerando uma fermentação lenta, podendo estressar a mesma, e assim ter floculação ou até mesmo parada de “trabalho”, gerando no final subprodutos como por exemplo o glicerol. Através da Figura 7 é possível visualizar a queda da viabilidade durante a safra, onde a linha de tendência (vermelha) mostra a diminuição a uma taxa constante, como mostra a seguir.

Figura 7. Gráfico do declínio da viabilidade



Fonte: a própria autora.

Os erros de operação impactam na viabilidade, no mês de julho ocorreu esse desvio através da manobra cotidiana de passar caldo quente como forma de uma assepsia, parando todo sistema de resfriamento do mosto e deixando passar por 10 minutos caldo entre aproximadamente de 75°C até 82°C. Porém devido a um erro do operador nas alterações do parâmetro, ao invés de passar por 10min, ficou quase 1h acontecendo essa situação. Esse caldo vai para as dornas e a alimentação com temperatura alta e por muito tempo, acaba matando as células. Os erros operacionais encontrados são tanto pela falta de atenção dos operadores em campo quanto dos que estão no painel. Sendo necessário ter sinergia entre eles, ou seja, comunicação constante, harmonia na operação, mantendo sempre a atenção. O operador do campo sempre verificar se as manobras ordenadas, estão realmente acontecendo. Em relação aos operadores do painel, uma maneira de evitar erros é colocar travas no sistema que impeça algum comando fora do padrão estabelecido.

Durante a safra por diversas vezes houve derramamento de dornas, devido a erros operacionais dos indivíduos que ficam na central de operação industrial (COI), não ficando atentos com o transmissor de nível, eletrodo de antiespumante (pois quando a espuma ultrapassa o nível aceitável, e atinge esse eletrodo, automaticamente é dosado o antiespumante), as válvulas de antiespumante fechadas, vazão demais na dorna, bicos de antiespumante entupido, dosagem errada de dispersante, gerando assim percas ao processo.

Segundo Santos (2021) através do mosto, que possui o caldo da cana-de-açúcar, leveduras de diferentes gêneros podem penetrar na fermentação, dominando o espaço e assim, trocando-se aos poucos a *Saccharomyces cerevisiae*.

A floculação no mês de abril e maio era mínima, devido ao fato de ser início da fermentação e estar envolvida no processo somente a levedura selecionada. Porém, a partir do mês de junho fica explícito que ocorreu a chegada da levedura selvagem de característica floculante, e ela foi se multiplicando em um ritmo que houve o desaparecimento da *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, mantendo assim a floculação elevada até o final da safra, não existindo uma forma de controle.

As leveduras selecionadas que deram origem a fermentação da safra 21/22, não ficam vivas o ano todo, foram sendo substituídas aos poucos pelas leveduras selvagens que vem junto da cana-de-açúcar. Essa levedura selvagem que se instalou na fermentação desta usina de álcool e açúcar possui característica floculante, que é negativa para o processo, então através da análise de floculação foi possível ter o acompanhamento da sua conquista de território na fermentação, pois a porcentagem da floculação de junho para frente vem mantendo-se elevada. É possível notar através das análises, que antes desse mês, na época em que a levedura selecionada dominava o espaço, a floculação só ficava alta devido a infecção (bastonetes) que gera ácido láctico, sendo uma medida proporcional entre ácido láctico e floculação. Essas individualidades, podem ser representadas a partir da Figura 8 onde as leveduras se floculam envolta do bastonete como forma de defesa, pois existe a bactéria (em vermelho) e as células da levedura (verde) se juntam para combater ela, e a Figura 9 onde a levedura selvagem é floculada por finalidade própria, sem nem mesmo estar infectada:

Figura 8 – Bastonete sendo combatido pelas leveduras selecionadas



Fonte: a própria autora.

Figura 9 – Leveduras selvagens



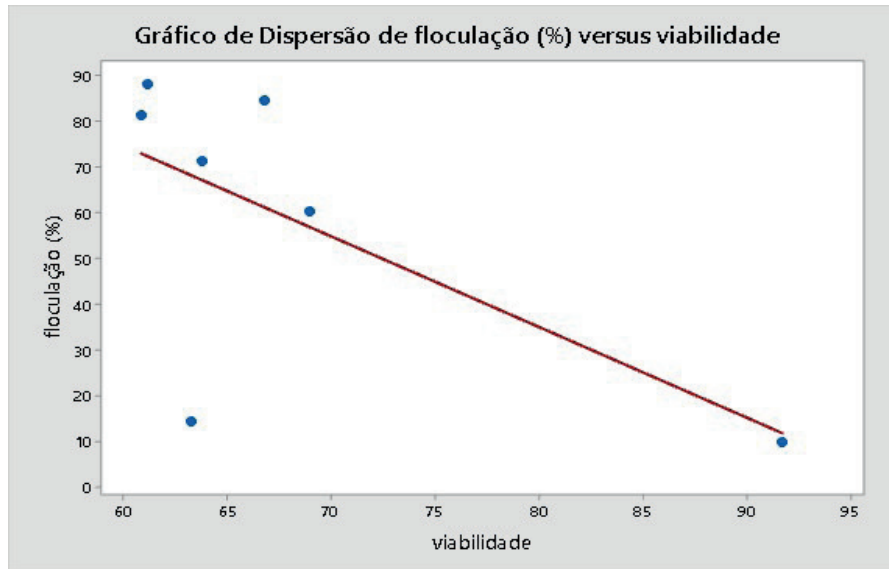
Fonte: a própria autora.

A levedura selvagem presente nessa usina, devido a floculação prejudica a centrifugação das dornas, retornando mais vinho para dorna e indo menos para a destilaria, porque ela decanta, ficando embaixo fermento e em cima vinho, portanto na centrifugação não tem concentração quando chega na parte do vinho e manda para cuba. Porém, os aspectos positivos dessa levedura é que ela é mais resistente as bactérias do que a selecionada e produz mais levedura também.

A solução para a floculação seria a adição de ácido sulfúrico que serve para ajustar o pH e diminuir a floculação, porém não adianta quando se tem a característica floculante, pois se posteriormente aumentar o pH minimamente, a levedura já flocula novamente. O H^+ que é liberado na solução aquosa com o ácido, quebra a ligação de uma levedura com a outra, ou seja, quando mais baixo o pH, maior quantidade de H^+ livre no meio.

Através da Figura 10, é possível verificar que a correlação entre viabilidade e floculação possui relação negativa, ou seja, R mais próximo de -1. Isso ocorre devido ao fato de que enquanto uma variável está com tendência a aumentar (floculação) a outra diminui (viabilidade). O gráfico é representado a seguir:

Figura 10. Correlação negativa entre floculação e viabilidade.



Fonte: a própria autora.

Quando a usina para em decorrência de chuva ou parada programada (manutenções), ou seja, quando vai ficar mais de 12h parada, ocorre de não ter caldo da cana-de-açúcar pois não está moendo. E conseqüentemente a fermentação fica alimentando as dornas somente com o mel que vem da fábrica de açúcar, misturado com a liquidação dos pré evaporadores e decantadores. Quando a liquidação dos equipamentos se encerra, é necessário centrifugar as dornas que estavam sendo alimentadas, guardando o vinho de levedurado para quando retornar à produção ser destilado. E o fermento, como é uma quantidade muito grande, não cabe somente nas cubas de tratamento, então guarda nas dornas vazias, então ele fica parado lá, corta ácido sulfúrico e todo tipo de dosagem que serve para tratamento dele. Se ocorre a dosagem de ácido sulfúrico com ele parado e sem estar alimentando, gera o risco de matar o fermento. Devido a todo esse caso, ocorre o aumento da infecção e a viabilidade decai. Poderia ocorrer a dosagem de antibiótico durante essa etapa, porém como o custo é alto, ela não é realizada.

Outra interferência que pode afetar a viabilidade, é tempo de residência do fermento na dorna, quando o mesmo já parou de se alimentar e ficou envolvido no meio alcoólico. Inicialmente causa o estresse na levedura se ultrapassar de 2h e isso levará a morte e conseqüentemente decairá a viabilidade. Pois ocorre momentos em que a usina para de moer e ficará assim por menos de 12h, e muitas vezes ocorreu de a levedura ficar parada no meio alcoólico, e também por desarmar as centrífugas. Quando a parada é mais de 12h realiza-se o processo de liquidação da fermentação, tirando todo álcool do fermento e guardando ele para utilizar quando a moagem voltar. Quando é menos de 12h não dá tempo de realizar esse processo, sendo mais conveniente manter o fermento no meio alcoólico.

A Tabela 3, expõe os dias do mês de outubro, que sucedeu as análises do dia 01 até o dia 07, devido a finalização da safra.

Tabela 3 – Resultados do mês de outubro

Dorna	Brix	pH	Levedo	Viabilidade	Brotamento	Bastonetes	Ác. láctico	Floculação
D8	2,22	4,54	6,67%	65,3%	6,76%	1,82.10 ⁷	1953ppm	94%
D1	2,14	4,3	7,33%	57,9%	10,21%	9,40.10 ⁶	792ppm	90%
D9	2,29	4,39	6,67%	60,79%	12,24%	7,50.10 ⁶	398ppm	95%
D2	2,36	4,42	8,67%	69,16%	10,15%	2,50.10 ⁶	324ppm	88%
D7	3,14	4,29	10%	60,67%	7,78%	5,40.10 ⁶	261ppm	90%
D4	2,37	4,44	6,67%	62,21%	10,32%	5,40.10 ⁶	351ppm	90%
D10	2,37	4,33	9,33%	51,81%	10,9%	3,10.10 ⁶	315ppm	72%

Fonte: a própria autora.

A safra finalizou dia 07/10/2022. Durante esse período a fermentação ficou recebendo como alimento a liquidação dos equipamentos do setor tratamento de caldo e fábrica de açúcar. Quando finalizou toda a liquidação, todo o fermento que estava nas dornas não seguiu para as centrifugas, encaminhou-se direto para a destilaria para realizar sua queima e cessar a fermentação. O fermento que estava nas cubas, já havia sido centrifugado e estava sendo realizada a dosagem de ácido sulfúrico para em seguida mandar para a fábrica de levedura, porém o atomizador da fábrica quebrou e o fermento seguiu para destilaria também. Mandar fermento direto para a destilaria, suja muito todos os aparelhos e linhas. Dia 09/10/2022, as 00:09h a penúltima dorna estava sendo destilada, abaixo segue o andamento:

- Dornas 1, 3, 6, 9 e 10 estavam vazias
- Dorna 2 estava cheia de fermento
- Dorna 4 sendo destilada
- Dornas 5 sendo realizado CIP
- Dorna 7 e 8 com água

Em torno das 05:36h do dia 10/10/22 não havia mais dornas com fermento, e já estava ocorrendo a passagem de água na linha de alimentação do mosto e nos trocadores de calor.

O aparelho nº02, dia 08/10/2022 foi passado soda e desalcoolizado. O aparelho nº04 foi iniciada a soda dia 09/10/2022 as 21:50h, e as 02:30h começou sua desalcoolização e finalizou as 21:15h. Por volta das 06:45h zerou o °Gl da água do aparelho 1. Finalizando assim toda fervura de água.

INFLUÊNCIAS DO pH

Pereira, Macri e Gimenez (2020, p. 49) afirmam “O pH de uma solução, permite identificar a concentração de íons de hidrogênio na solução. O pH varia com a temperatura e com a presença de substância dissolvidas com a solução”.

Segundo Francisco (2017) a enzima invertase realiza o rompimento da glicose gerando frutose e sacarose. Localizando-se na parede da célula da levedura, portanto, se modifica em pH ácido, podendo diminuir ou extinguir sua atuação sob a célula. Outras enzimas e proteínas sofrem alterações em pH extremos do meio.

A fermentação desenvolve melhor suas funções entre o pH de 4,00 a 5,00. Já as bactérias aumentam e se fortalecem em pH de 4,00 a 8,00, portanto, manter uma fermentação abaixo dessa faixa diminui a contaminação, porém a levedura deixa de atuar com boa eficiência (MARTINS, 2022, p.21).

Segundo Acqua Nativa, quando as leveduras estão alimentando-se nas dornas e produzindo, o pH ideal é de 4,5 a 5,00. Quando o fermento vai para as cubas para ser tratado o ideal de pH é entre 2,5 a 3,00. E durante a multiplicação do fermento pode variar de 5,0 a 6,0.

O fermento que ocupa as cubas recebe ácido sulfúrico para manter seu pH próximo de 2,0, isso ocorre para extinguir as bactérias, devido ao pH baixo o meio fica extremamente ácido. Porém esse nível é agressivo para a levedura, derrubando a viabilidade. Essa ação é uma redução de danos, pois mesmo que afeta a viabilidade da levedura, a quantidade de células de bactérias que vão ser destruídas é maior que a quantidade de células de leveduras.

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA

A temperatura está diretamente ligada a velocidade de desempenho das leveduras. Em condições abaixo de 30°C suas funções são suspensas. Já acima de 34° C o meio fica propício para a instalação de bactérias (MARTINS, 2022).

Segundo Silva (2019) com a temperatura inadequada, as leveduras ficam com seu metabolismo lento e demoram para consumir os açúcares disponíveis. Com o controle de 32°C, gera-se um maior rendimento.

A fermentação é uma reação exotérmica, portanto a geração de calor deve ser proporcional ao consumo de açúcar. O fermento busca atingir uma temperatura entre 27°C a 30°C, porém quando começa a alimentação nas dornas, eles ficam agitados para consumir o mosto, esquentando esse meio, e subindo a temperatura. A infecção é outro ponto que faz aumentar a temperatura, e a infecção sempre vai existir, sendo baixa ou alta, então para controlar ela é através da temperatura para não ter que usar antibiótico (alto valor de compra).

A temperatura nas dornas interfere negativamente no rendimento fermentativo, a usina em estudo tem como objetivo manter um set point de aproximadamente 33°C. Os biorreatores (dornas) são pintados inteiro de brancos, para diminuir a absorção de calor do ambiente externo, diminuindo a possibilidade de aumento da temperatura por esse aspecto e do álcool produzido ser evaporado com maior facilidade.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os dados analisados, foi possível comprovar que a média da viabilidade da fermentação nessa usina de álcool e açúcar sofreu queda durante a safra, os fatores que mais prejudicam foram a temperatura e as leveduras selvagens, sendo levado em consideração que tiveram maior frequência no cotidiano do setor. Porém os outros pontos também possuem consequências negativas e não devem ser desprezados. Esse acompanhamento é importante pois assim consegue-se detectar o rendimento e a eficiência do processo, buscando minimizar as perdas e garantindo sua melhoria.

Os melhoramentos que poderiam ocorrer estão ligados a instalação de trocadores de calor nas dornas numeradas de 1 a 8 que ainda são resfriadas com serpentinas, podendo ocorrer a contaminação caso ocorra algum rompimento, e também compromete a temperatura pois quando a mesma começa a subir, é mais lenta a ação de abrir a água nas serpentinas, pois as válvulas são manuais, podendo assim, não abrir o necessário que necessita ou ultrapassar. O ideal seria dois trocadores por dorna, pois assim, quando suja um o outro entra em atividade. Outro ponto seria o método como o caldo e o mel, que são oriundos de linhas distintas, se misturam no processo produtivo, é necessária uma melhora no processo de fusão dessas linhas para haver uma melhor homogeneização na formação do mosto. Para melhoramento na limpeza e evitar corrosão das chapas das dornas, o ideal seria revestir o interior das dornas com a resina epóxi, essa película melhora a eficiência do processo, diminuindo contaminações.

As limitações encontradas na elaboração desse trabalho é que durante as análises diárias, não foi possível analisar sempre a mesma dorna, pois elas completam seus ciclos de forma independente, dificultando mostrar até a diferença de eficiência entre uma dorna com trocador de calor e outra com serpentina.

Este trabalho buscou contribuir com o setor da fermentação em usinas de álcool e açúcar, através de um estudo de caso que avaliou por 7 meses os parâmetros que influenciam na viabilidade da levedura contribuindo assim para melhoria de processos e trabalhos futuros.

Como sugestão de futuros trabalhos, seria de grande relevância buscar alternativas para minimizar os impactos na fermentação nos momentos em que a usina para pôr consequências de chuvas ou por longas paradas programadas, no caso, mais de 12 horas.

Outra sugestão de futuros estudos seria o pesquisador acompanhar o processo produtivo em uma usina, mantendo a coleta do fermento sempre da mesma dorna, para que os estudos tenham menos variáveis influenciáveis.

REFERÊNCIAS

- CARDOSO, Luiz Henrique. Avaliação do impacto da inativação de genes associados ao estresse celular em *Saccharomyces cerevisiae*. 2022.
- Cana-de-açúcar: Conab divulga mapa das usinas ativas do Brasil. **ESTADÃO**, São Paulo, 13 jul. 2021.
- COSTA, Emerson Rodrigues. **Modelagem e simulação do processo de fermentação alcoólica na indústria sucroalcooleira**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso. Brasil.
- DA CUNHA, Luan Régis Rodrigues et al. Monitoramento da viabilidade e contaminação bacteriana de um fermento de levedo industrial. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 12, p. 28582-28593, 2019.
- DA SILVA, SILVIO EDUARDO TEIXEIRA PINTO; SERPA, ERIC CORRÊA ALONSO; RANGEL, YGOR PEIXOTO. Análise de Desempenho de um Motor De Combustão Interna Do Ciclo Otto Utilizando Como Fonte Energética Gasolina E Uma Mistura Gasolina-Etanol. **Perspectivas Online: Exatas & Engenharias**, v. 9, n. 25, 2019.
- DIAS, Diogo Lopes. Gasolina ou etanol: qual é o melhor combustível? Manual da Química.
- FRANCISCO, Bruno. **Efeito do pH na Morfologia da Levedura**. LinkedIn, 2017.
- KRONKA, Andrei Mocheuti. Estudo de antimicrobianos naturais sobre bactérias Gram+(lactobacillus) usados para controle e descontaminação da fermentação alcoólica. 2021.
- MF LEITE, L.; AP LIMA, E. A APLICAÇÃO DA FERRAMENTA HAZOP NO PROCESSO DE OPERAÇÃO DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA. 2019.
- MONITORAMENTO de ph e temperatura em dornas e processos fermentativos. *Acqua Nativa*, monitoramento ambiental.
- LIRA, Elielson da Silva. Perdas na cadeia produtiva do setor da destilaria. 2021.
- MARTINS, Thayná Terezinha Marques et al. Processos e análises no monitoramento de uma usina de álcool. 2022.
- MORENO, Thiago. Etanol ou gasolina: quando vale a pena abastecer com cada combustível? **Cnn Brasil**. São Paulo, 27 jun. 2021.
- NACHILUK, K. Alta na Produção e Exportações de Açúcar Marcam a Safra 2020/21 de Cana. **Publicado por: Análises e Indicadores do Agronegócio, São Paulo**, v. 16, n. 6, p. 1-5, 2021.
- PEREIRA, Danilo Aparecido; VIEIRA, Rita de Cássia Macri; GIMENEZ, Alex Zerbinatti. FATORES QUE AFETAM A FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA. **Ciência & Tecnologia**, v. 12, n. 1, p. 44-55, 2020.
- SAMPAIO, Arthur Borges et al. Controle estatístico de contaminantes na fermentação alcoólica em uma usina de etanol de milho. 2021.

SANTOS, Alessandra Marques dos et al. Estudo da influência da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada. 2008.

SANTOS, Camila Oliveira dos et al. Diagnóstico e avaliação da influência de contaminantes selvagens durante etapas do processo produtivo do etanol. 2021.

SANTOS, Mágda Correia dos et al. Condução de fermentação etanólica contínua com o uso de antibiótico. 2016.

SILVA, Lincon Felipe Lima. Produção de fenóis voláteis por isolados de *Dekkera bruxellensis* da fermentação etanólica e efeitos sobre uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae*. 2018.

SILVA, Marlon Vinicio Pinheiro da. Comportamento da fermentação alcoólica para produção de cachaça com e sem controle da temperatura em diferentes concentrações de brix e pH. 2019.