



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA



**BEATRIZ HELENA FREIRIA**

**LEVEDURA SELVAGEM: COMPARAÇÃO E ANÁLISE DE CONTAMINAÇÃO DO  
PROCESSO FERMENTATIVO PARA OBTENÇÃO DE ETANOL DE CANA-DE-  
AÇÚCAR**

UBERLÂNDIA - MG

2023

**BEATRIZ HELENA FREIRIA**

**LEVEDURA SELVAGEM: COMPARAÇÃO E ANÁLISE DE CONTAMINAÇÃO DO  
PROCESSO FERMENTATIVO PARA OBTENÇÃO DE ETANOL DE CANA-DE-  
AÇÚCAR**

Projeto de pesquisa desenvolvido para o Trabalho de Conclusão de Curso submetido à Faculdade de Engenharia Química – FEQUI-UFU para obter o título de BACHAREL em Engenharia Química

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros**

UBERLÂNDIA - MG

2023

## AGRADECIMENTOS

Diante de toda batalha que vivenciei até chegar nesta etapa da vida, primeiramente, agradeço a Deus por ter permitido que seus planos caminhassem junto com meus sonhos, pelas inúmeras conquistas durante a graduação, e por mais turbulento que foi passar por uma pandemia, minha fé e esperança de alcançar o sonhado diploma, não deixou de brilhar junto Dele. E assim, peço a Ele sabedoria, para aplicar todo o conhecimento adquirido nesta fase.

À minha família, obrigada pelo apoio, torcida e compreensão durante os tempos de ausência, sei que cada um de vocês torceram pela minha vitória profissional. Mas, em especial aos meus queridos pais, Valdir e Maria Alzira, que sempre deram apoio em todos meus sonhos e luta, mesmo distantes fisicamente vocês me fortaleceram por serem presentes o tempo todo, também pela educação e ensinamentos de vida. Agradeço as orações da minha mãe, que com toda certeza me deram força nos momentos mais difíceis e como ela sempre diz “terço na mão e joelho no chão, assim, nada será impossível”.

Não poderia deixar de citar meus amigos, gratidão por todo amor, força, compreensão, ensinamentos, conselhos, risadas, vocês foram essenciais para o meu crescimento na graduação.

Gostaria de agradecer aos professores da FEQUI por todo o conhecimento, ensinamento e ajuda no melhor desempenho do meu processo de formação e em especial à minha querida orientadora Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros, pelo acolhimento, apoio, prontidão, suporte e carinho que sempre me tratou.

À instituição de ensino Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, meu muito obrigada.

## RESUMO

A produção de etanol a partir da cana-de-açúcar desempenha um papel crucial no setor de biocombustíveis, promovendo a redução de emissões de gases de efeito estufa e a sustentabilidade energética. No entanto, a presença de leveduras selvagens durante o processo fermentativo pode resultar em contaminação e impactar negativamente a eficiência e qualidade do etanol produzido. Nesse sentido, a problemática que inspirou a criação deste trabalho foi apresentada por meio do seguinte questionamento: Quais são os caminhos distintos no processo de obtenção de etanol a partir da cana-de-açúcar que podem facilitar a entrada de levedura selvagem e quais melhorias podem ser identificadas para um bom desempenho do ciclo fermentativo? Portanto, o objetivo é encontrar soluções eficientes para o controle e prevenção dessa contaminação, visando aprimorar a qualidade e rentabilidade do processo de produção de etanol. O estudo foi realizado por meio de pesquisa de campo e compilação de dados laboratoriais em uma usina bioenergética em Goiás, ao longo de três meses de acompanhamento da safra. Foram analisadas as etapas do processo, desde a recepção da cana-de-açúcar até o tratamento do caldo, com foco na contaminação por leveduras selvagens. Também foi avaliada a importância da seleção adequada de levedura e assepsia para garantir a qualidade do etanol. Os resultados mostraram que a seleção adequada da levedura desempenha um papel fundamental na fermentação. Diferentes cepas de leveduras apresentam características distintas, como tolerância ao estresse e eficiência de conversão de açúcares, sendo essencial escolher uma linhagem que atenda aos requisitos específicos da usina. Além disso, a assepsia adequada, por meio da limpeza e esterilização dos equipamentos, é crucial para evitar a contaminação por leveduras selvagens, que pode comprometer a fermentação e reduzir a eficiência do processo. A análise comparativa dos anos de produção revelou os benefícios de uma fermentação de qualidade, livre de floculação e contaminação por leveduras selvagens. Uma fermentação eficiente resulta em maior aproveitamento dos açúcares presentes no mosto, contribuindo para uma maior produção de etanol. Por outro lado, a presença de floculação e contaminação por leveduras selvagens pode causar perdas significativas na produção e eficiência do processo. Portanto, é essencial implementar práticas adequadas de seleção de levedura, assepsia e controle de fermentação para maximizar a eficiência do processo e obter um etanol de alta qualidade. Investir na escolha cuidadosa da levedura e na manutenção de condições sanitárias adequadas traz benefícios significativos, como maior produtividade, menor perda de matéria-prima e melhoria da qualidade do produto final. Ao alcançar uma fermentação de qualidade, livre de floculação e contaminação por leveduras selvagens, as usinas de etanol em Goiás podem contribuir positivamente para a indústria de biocombustíveis.

**Palavras-chave:** Fermentação. Etanol. Qualidade da Produção. Prevenção de Contaminação.

## **ABSTRACT**

*The production of ethanol from sugarcane plays a crucial role in the biofuel sector, promoting the reduction of greenhouse gas emissions and energy sustainability. However, the presence of wild yeasts during the fermentation process can result in contamination and negatively impact the efficiency and quality of the produced ethanol. In this regard, the issue that inspired this study was presented through the following question: What are the distinct paths in the process of obtaining ethanol from sugarcane that can facilitate the entry of wild yeast, and what improvements can be identified for a good performance of the fermentation cycle? Therefore, the objective is to find efficient solutions for the control and prevention of this contamination, aiming to enhance the quality and profitability of the ethanol production process. The study was conducted through field research and compilation of laboratory data at a bioenergy plant in Goiás, over a three-month period of crop monitoring. The process stages were analyzed, from sugarcane reception to juice treatment, with a focus on contamination by wild yeasts. The importance of proper yeast selection and asepsis to ensure ethanol quality was also evaluated. The results showed that appropriate yeast selection plays a fundamental role in fermentation. Different yeast strains exhibit distinct characteristics, such as stress tolerance and sugar conversion efficiency, making it essential to choose a lineage that meets the specific requirements of the plant. Furthermore, proper asepsis through equipment cleaning and sterilization is crucial to avoid contamination by wild yeasts, which can compromise fermentation and reduce process efficiency. Comparative analysis of production years revealed the benefits of quality fermentation, free from flocculation and contamination by wild yeasts. Efficient fermentation leads to better utilization of sugars in the must, contributing to increased ethanol production. On the other hand, the presence of flocculation and contamination by wild yeasts can cause significant losses in production and process efficiency. Therefore, it is essential to implement appropriate practices for yeast selection, asepsis, and fermentation control to maximize process efficiency and obtain high-quality ethanol. Investing in careful yeast selection and maintaining proper sanitary conditions brings significant benefits, such as increased productivity, reduced raw material loss, and improved quality of the final product. By achieving quality fermentation, free from flocculation and contamination by wild yeasts, ethanol plants in Goiás can positively contribute to the biofuel industry.*

**Keywords:** *Fermentation. Ethanol. Production Quality. Contamination Prevention.*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1 - Representação da recepção, preparo e extração.....	32
Ilustração 2 - Tratamento de caldo para produção de etanol .....	34
Ilustração 3 - Multiplicação de fermento .....	35
Ilustração 4 - Preparação do mosto .....	37
Ilustração 5 - Processo Fermentativo .....	39
Ilustração 6 - Processo Álcool Hidratado .....	40
Ilustração 7 - Processo Álcool Anidro .....	41
Ilustração 8 - Permanência e porcentagem das leveduras A e B no processo de produção do etanol .....	50
Ilustração 9 - Comparação entre o rendimento da fermentação entre os anos de 2021 e 2022 ..	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplo de extração eficiente .....	32
Tabela 2 - Valores dentro das normas padrões da usina de Goiás.....	44
Tabela 3 - Resultados de dez meses da safra 21/22 utilizando a levedura A.....	45
Tabela 4 - Resultados de sete meses da safra 22/23 utilizando a levedura B .....	46

## LISTA DE ABREVIACOES

<b>Aneel</b>	Agencia Nacional de Energia Elétrica
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>Cm</b>	Centímetro
<b>CO<sub>2</sub></b>	Gás Carbnico
<b>COI</b>	Centro de Operações Interno
<b>DNA</b>	cido Desoxirribonucleico
<b>EPE</b>	Empresa de Pesquisa Energética
<b>ETA</b>	Estação de Tratamento de água
<b>GW</b>	GigaWatts
<b>GWh</b>	GigaWatts-Hora
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>Kg</b>	Quilograma
<b>Kgf</b>	Quilograma-força
<b>MEG</b>	Monoetilenoglicol
<b>PCTS</b>	Pagamento Cana Teor Sacarose
<b>POL</b>	teor de sacarose aparente na cana
<b>Proálcool</b>	Programa Nacional do álcool
<b>RPE</b>	Recepção, Preparo e Extração
<b>Rpm</b>	Rotações Por Minuto
<b>TCH</b>	Toneladas de Cana por Hora
<b>TWh</b>	TeraWatt-hora
<b>US\$</b>	Dólar americano

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	04
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	06
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	07
<b>LISTA DE ABREVIACÕES</b> .....	08
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>1.1.2 Objetivos</b> .....	12
1.1.2 Objetivo Geral.....	12
1.1.2 Objetivos Específicos.....	12
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	13
<b>2.1 Cultura da cana-de-açúcar e o etanol brasileiro</b> .....	13
<b>2.2 Fermentação - agente principal</b> .....	17
2.2.1 Processo Batelada .....	17
2.2.2 Processo de Batelada Alimentada .....	18
2.2.3 Processo Contínuo .....	19
<b>2.3 Biodiversidade de leveduras</b> .....	20
2.3.1 Leveduras Seleccionadas .....	20
2.3.2 Leveduras Nativas.....	22
2.3.3 Leveduras Floculantes .....	23
<b>2.4 Recirculação de leveduras</b> .....	24
<b>2.5 Fatores que afetam a eficiência da fermentação etanólica</b> .....	27
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	30
<b>4 ETAPAS DE PRODUÇÃO DO ETANOL NA USINA ANALISADA</b> .....	30
<b>4.1 Recepção, preparo e extração</b> .....	30
<b>4.2 Tratamento de caldo</b> .....	33
<b>4.3 Fermentação</b> .....	34
4.3.1 Multiplicação de fermento .....	34
4.3.2 Processo Mosto .....	36
4.3.3 Processo fermentativo .....	38
<b>4.4 Destilação</b> .....	39
<b>5 ANÁLISE DOS RESULTADOS OBTIDOS ENTRE AS SAFRAS – ANOS 2021 E 2022</b> .....	42

<b>5.1 Importância da escolha de uma levedura adequada e a realização correta da assepsia, antes de iniciar a produção .....</b>	<b>42</b>
5.1.1 Avaliação comparativa.....	43
5.1.2 Permanência e Porcentagem das leveduras no processo de fermentação .....	50
5.1.3 Rendimentos das safras nos anos de 2021 e 2022 .....	52
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>56</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A produção de etanol por meio da cana-de-açúcar desempenha um papel fundamental no setor de biocombustíveis, contribuindo para a redução das emissões de gases de efeito estufa e promovendo a sustentabilidade energética (PEREIRA *et al.*, 2019). No entanto, a presença de leveduras selvagens durante o processo fermentativo pode resultar em contaminação e impactar negativamente a eficiência e a qualidade do etanol produzido.

Nesse contexto, Ribeiro (2019) comenta que a comparação e análise da contaminação do processo fermentativo por leveduras selvagens torna-se essencial para identificar os principais fatores que influenciam a ocorrência dessas contaminações, bem como suas consequências no rendimento e na qualidade do etanol obtido. Compreender e controlar a presença de leveduras selvagens é crucial para otimizar a produção de etanol e garantir a sua viabilidade econômica.

A importância desse estudo reside na busca por soluções eficientes para o controle e prevenção da contaminação por leveduras selvagens, visando melhorar a qualidade e a rentabilidade do processo de produção de etanol. Distintas cepas de leveduras exibem características variadas, como tolerância ao estresse e eficiência de conversão de açúcares, tornando imprescindível a escolha de uma linhagem que atenda aos requisitos específicos da usina. Além disso, a aplicação correta de assepsia, através da higienização e esterilização apropriadas dos equipamentos, desempenha um papel crucial na prevenção da contaminação por leveduras selvagens, as quais podem prejudicar a fermentação e reduzir a eficiência do processo.

Dessa forma, a compreensão aprofundada da contaminação por leveduras selvagens no processo fermentativo de mosto derivados da cana-de-açúcar é fundamental para o avanço científico e tecnológico na área, além de apresentar potenciais benefícios econômicos e ambientais. A análise comparativa proposta neste estudo contribuirá para o desenvolvimento de práticas mais eficientes e sustentáveis na produção de etanol, impulsionando o setor de biocombustíveis rumo a uma matriz energética mais limpa e renovável.

Portanto, a pergunta de pesquisa central deste trabalho é: Quais são os caminhos distintos no processo de obtenção de etanol a partir da cana-de-açúcar que podem facilitar a entrada de levedura selvagem e quais melhorias podem ser identificadas para um bom desempenho do ciclo fermentativo?

A importância desse estudo no Brasil reside no papel estratégico do etanol como fonte de energia renovável, considerando o país como um dos principais produtores mundiais, utilizando a cana-de-açúcar como principal matéria-prima. A compreensão e controle da contaminação por leveduras selvagens no processo fermentativo são cruciais para a indústria sucroenergética brasileira (FONTANETTI, 2017). A contaminação pode afetar negativamente a produtividade e a qualidade do etanol, resultando em perdas econômicas e comprometendo a competitividade do setor. Além disso, o estudo contribui para a inovação, a capacitação de profissionais e o desenvolvimento científico e tecnológico do país, fortalecendo a posição do Brasil como líder na produção sustentável de biocombustíveis (CAMILOTI, 2015).

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo Geral**

Diante da teoria posta, o presente trabalho teve como objetivo analisar e comparar caminhos distintos no processo do etanol, obtido através da cana-de-açúcar, para verificar as condutas que facilitarão a entrada da levedura selvagem no processo. Além de identificar melhorias para um bom desempenho do ciclo fermentativo.

### **1.1.2 Objetivos Específicos**

- Descrever o processo de fabricação do etanol, em uma usina no estado de Goiás;
- Executar uma avaliação comparativa de diferentes anos de produção de uma usina durante a safra, considerando os aspectos positivos e as contrapartidas associados a uma fermentação de qualidade, livre de floculação e contaminação por leveduras selvagens, além de avaliar a eficiência do processo produtivo. E também pontuar a importância da escolha de uma levedura adequada e a realização correta da assepsia, antes de iniciar a produção;

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Cultura da cana-de-açúcar e o etanol brasileiro

Desde tempos antigos, há evidências do consumo de alimentos fermentados pelos sumérios, egípcios e babilônicos. Bebidas como vinho e cerveja, bem como alimentos como pão e queijo, são consumidos desde os primórdios da agricultura, mas na época não se compreendia completamente o processo de fabricação desses produtos (AMORIM, 2005).

No século XIX, o processo de fermentação começou a ser compreendido pelo cientista Louis Pasteur. Enquanto estudava os problemas na produção de vinho e cerveja, Pasteur descobriu que um tipo de levedura produzia vinho de qualidade, enquanto outro tornava-o azedo. Essa descoberta permitiu entender que a fermentação estava associada ao crescimento das leveduras e que, se expostas a uma grande quantidade de oxigênio, produziriam dióxido de carbono e água em vez de álcool. Dessa forma, Pasteur definiu que a fermentação alcoólica é o mecanismo utilizado pelos seres vivos para produzir energia na ausência de oxigênio (PEREIRA *et al.*, 2019).

Urbano, Pinto e Baelo (2011) realizaram um estudo no qual observaram que no sistema microaeróbico e aeróbico, houve conversão mínima. Observou-se que não ocorreram mudanças significativas enquanto havia oxigênio presente no meio; porém, com a retirada do oxigênio, iniciou-se a produção de etanol. À medida que a concentração de etanol aumentou, o crescimento de processos celulares anaeróbios diminuiu devido à inibição da levedura causada pela presença de etanol. Nos sistemas microaeróbico e aerado, a levedura demonstrou não utilizar a via glicolítica. Em vez disso, com o fornecimento de oxigênio, a levedura utilizou a via de respiração celular, que é energeticamente mais favorável e, conseqüentemente, não produziu uma quantidade substancial de etanol, resultando em baixa conversão.

O procedimento de fermentação etanólica, segundo Pereira *et al.*, (2019), é um processo biológico anaeróbico que converte açúcares, como a glicose e a frutose, em energia celular, etanol e dióxido de carbono, através das seguintes reações químicas.



A etapa de conversão do açúcar em etanol, CO<sub>2</sub> e energia é composto por uma sequência de 12 reações, que são catalisadas por enzimas específicas. O desempenho da fermentação é influenciado por diversos fatores, como nutrientes, minerais, vitaminas, inibidores, pH,

temperatura, entre outros, que podem estimular ou inibir a ação enzimática. A metabolização dos açúcares produzirá diferentes produtos dependendo das condições ambientais do meio fermentativo. Como a levedura é um organismo facultativo, na fermentação alcoólica ocorrerá produção de biomassa (em aerobiose) e, em maior proporção, a conversão em etanol e CO<sub>2</sub> (em anaerobiose).

O objetivo primário da levedura é metabolizar o açúcar de forma anaeróbica para produzir energia na forma de ATP, a qual é utilizada para executar diversas atividades fisiológicas e biossínteses vitais para a sobrevivência, crescimento e reprodução celular. O etanol e o CO<sub>2</sub> produzidos durante este processo bioquímico são excretados como produtos residuais e não possuem utilidade metabólica para as leveduras em condições anaeróbicas (LIMA *et al.*, 2001).

Ao levar em consideração o objetivo metabólico das leveduras, que é crescer e se reproduzir, a produção industrial de etanol se baseia na capacidade de adaptação desses microrganismos. Para isso, são alteradas as condições físico-químicas do meio fermentativo de forma a atingir a conversão alcoólica desejada, sem comprometer as necessidades metabólicas das leveduras.

Na década de 1970, o etanol ganhou destaque após a crise do petróleo, que era a principal fonte de energia na época, provocar aumentos significativos nos índices inflacionários. Como alternativa, surgiu o Programa Nacional do Álcool (Proálcool) na segunda metade da década, com o intuito de substituir os combustíveis fósseis por combustíveis derivados de origem vegetal, incentivando a produção de álcool para atender as demandas internas e externas. No entanto, naquela época, toda a frota de veículos era movida por combustíveis fósseis, e foi apenas na década de 1990 que começaram a ser realizados testes de implementação e produção em larga escala de veículos movidos a etanol (PEREIRA *et al.*, 2019).

No cenário atual, o Brasil detém uma das maiores extensões de plantações de cana-de-açúcar do planeta, o que o torna o principal produtor global de açúcar e etanol (VIDAL, 2022). Segundos dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2022), o Brasil produziu, em 2021, 715.659.212 toneladas de cana-de-açúcar, o que equivale a mais de setenta e cinco milhões de reais.

A cana-de-açúcar, em sua forma natural, pode ser utilizada como pastagem para animais ou como matéria-prima na elaboração de diversos produtos, incluindo a rapadura e o melado. Apesar dessas aplicações bastante valorizadas, o agronegócio da cana-de-açúcar possui uma relevância enorme para o Brasil, notadamente no âmbito econômico e social. Tanto o consumo

interno quanto a demanda internacional por açúcar e etanol contribuem para a geração de renda e empregos essenciais ao crescimento do país (FONTANETTI, 2017).

Desde a introdução da cana-de-açúcar no Brasil, houve uma multiplicação das indústrias que utilizam a cultura. Novas técnicas foram adotadas e o país atingiu altos índices no mercado internacional, fornecendo matéria-prima para a produção de etanol, açúcar e aguardente (SILVA, 2010). No entanto, além desses produtos, os subprodutos e resíduos da cana-de-açúcar também são aproveitados na fabricação de ração animal, como fertilizantes para as lavouras e na cogeração de energia elétrica. Em 2014, a geração de energia pelas usinas sucroalcooleiras no Brasil teve um aumento de 7,28%. Em 2015, a cogeração de energia elétrica saltou de 18.929,60 gigawatts-hora (GWh) para 20.228,69 GWh (NOVACANA, 2016), demonstrando o potencial desse setor.

Segundo Pereira *et al.* (2019), a produção de álcool como fonte de energia sofreu grandes adaptações em seu processo produtivo com a introdução dos carros *flexfuel*. Essa mudança impulsionou o crescimento progressivo da produção nacional de açúcar, que por sua vez, contribuiu para a geração de energia mais eficiente. Quanto à geração de eletricidade no cenário nacional, em 2016, a geração total de energia foi de 578,9 TWh, sendo que o bagaço da cana-de-açúcar contribuiu com 35,236 TWh, ocupando o terceiro lugar entre as outras fontes de energia.

De acordo com informações da Empresa de Pesquisa Energética (EPE), a capacidade de geração de energia pelas usinas brasileiras atingiu 12,1 gigawatts (GW) em agosto de 2021, conforme dados registrados pela Agência Nacional de Energia Elétrica (Aneel). Esse número indica um aumento de 30% em relação ao registrado em 2016, segundo as instituições envolvidas (NOVACANA, 2022).

Conforme dados divulgados no site do Estadão (2022), apenas 60% das 369 usinas de açúcar e etanol em operação no Brasil disponibilizaram o excedente em energia elétrica em 2021. Se todas as usinas utilizassem o potencial de produção de energia, o total disponibilizado à rede elétrica poderia alcançar 151 mil GWh, equivalente a cerca de 26% do consumo energético anual do país. Esse potencial de geração de energia renovável e sustentável, proveniente do bagaço da cana-de-açúcar, é duas vezes maior que a Usina de Itaipu e cinco vezes maior que a Usina de Belo Monte.

Além disso, no ano de 2022, a exportação de etanol do Brasil apresentou um crescimento de 26,3% em relação ao ano anterior, totalizando 2,43 bilhões de litros e se aproximando do recorde histórico de 2,64 bilhões de litros registrado em 2020. Esse aumento nas exportações resultou em uma receita acumulada de US\$ 1,76 bilhão, representando um aumento anual de

65,7%. Os principais destinos das exportações brasileiras de etanol foram a Coreia do Sul, com aproximadamente 756,95 milhões de litros, seguida pelos Estados Unidos, com cerca de 695,64 milhões de litros, e pelo Japão, com cerca de 451,31 milhões de litros, seguidos pelas Filipinas, com aproximadamente 102,85 milhões de litros, e a Índia, com cerca de 89,94 milhões de litros (NOVACANA, 2023).

Em média, cada tonelada de cana-de-açúcar processada pelas usinas resulta em 71 quilos de açúcar e 42 litros de etanol (NOVACANA, 2016). O etanol é produzido a partir da biomassa da cana-de-açúcar e tem o potencial reconhecido de sequestrar o carbono da atmosfera, ajudando a reduzir os efeitos do efeito estufa e suas consequências prejudiciais para o meio ambiente, como o aumento da temperatura que afeta negativamente o clima global.

A produtividade do cultivo de cana-de-açúcar é determinada pela interação entre o clima, o solo e as variedades da espécie *Saccharum officinarum*. No Brasil, a produção de cana-de-açúcar é disseminada em todo o território e gera um alto valor econômico, especialmente na região Sudeste (IBGE, 2022). O rendimento da cultura está diretamente relacionado à seleção cuidadosa da variedade apropriada, à quantidade de chuvas, à temperatura e às propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, bem como à resistência a herbívoros e doenças (VIDAL, 2022).

Segundo Góes-Favoni (2018), o rendimento do etanol é uma medida da eficiência da produção de etanol a partir da matéria-prima utilizada. Geralmente é expresso em porcentagem e representa a quantidade de etanol produzido em relação à quantidade de açúcares fermentáveis presentes na matéria-prima. O rendimento do etanol pode ser afetado por diversos fatores, como a qualidade da matéria-prima, o tipo de levedura utilizado, as condições de fermentação, entre outros. Um alto rendimento é desejado para maximizar a produção de etanol e tornar o processo mais econômico.

## **2.2 Fermentação - agente principal**

O termo fermentação tem origem no latim *fervere*, que significa ferver, em referência à aparência observada na ação das leveduras em um meio açucarado, devido à liberação de CO<sub>2</sub> (VASCONCELOS, 2012). O processo fermentativo de produção do etanol pode ser conduzido de diversas formas, conforme descrito a seguir:

### 2.2.1 Processo Batelada

A fermentação em batelada, também chamada de fermentação descontínua, consiste em uma série de etapas segundo Carvalho e Sato (2001): Inicialmente, o mosto é misturado ao fermento em uma dorna para iniciar a fermentação, proporcionando as condições ideais para o microrganismo, durante o processo fermentativo, se necessário, é adicionado um dispersante ou antiespumante para inibir ou conter a formação de espuma, respectivamente. Ao final da fermentação, a dorna é esvaziada e o meio fermentado segue para tratamentos finais, onde a dorna vazia é então lavada para que possa ser carregada novamente com mosto e fermento, iniciando outro ciclo fermentativo.

De acordo com Carvalho e Sato (2001), o processo de fermentação descontínua apresenta algumas vantagens, como manter um volume constante durante a fermentação, diminuir o risco de contaminação e oferecer maior flexibilidade operacional. No entanto, esse método pode apresentar algumas desvantagens, como baixos rendimentos e/ou produtividades devido à adição única do substrato no início da fermentação, o que pode causar efeitos inibitórios ou desviar a produção. Além disso, há "tempos mortos" no processo, como o tempo de carga e descarga da dorna e o tempo correspondente à lavagem.

Durante uma fermentação em batelada, a quantidade de massa dentro do recipiente permanece constante ao longo do processo, uma vez que não há entrada ou saída de massa, a menos de antiespumante e gases. Esse processo foi bastante utilizado na produção de etanol nas destilarias brasileiras até o início dos anos 60, podendo ser operado em sistemas de cortes ou de cultura pura. No sistema de cortes, o volume do caldo é dividido em duas dornas após a primeira fermentação, sendo completado com mosto e deixado fermentar até o fim do substrato. Já no sistema de cultura pura, é adicionada uma nova cultura em cada fermentação, a qual é misturada ao mosto até completar o volume da dorna e deixada fermentar. Contudo, ambos os sistemas demandam tempo significativo, já que é necessário limpar o reator e carregar o mosto e o inóculo para cada batelada (SONEHO, 2016).

### 2.2.2 Processo de Batelada Alimentada

Por sua vez, o processo batelada alimentada é uma variação do processo de fermentação em batelada, onde o substrato é adicionado de forma controlada ao longo do tempo, ao invés de ser adicionado de uma só vez no início da fermentação. Isso permite que a fermentação ocorra

por um período mais longo e com maior eficiência, resultando em um aumento na produtividade e no rendimento do processo (BORGES, 2008).

O processo de batelada alimentada é caracterizado por algumas etapas distintas. Em primeiro lugar, uma cultura de células é transferida de um tanque de tratamento para os fermentadores. Em seguida, o meio de cultura é adicionado gradualmente em pequenas quantidades até que o volume desejado seja alcançado. Quando o substrato é convertido em produto, o líquido fermentado é enviado para a centrífuga, onde as células de levedura são separadas e, em seguida, tratadas antes de serem utilizadas para iniciar um novo ciclo. Este processo é utilizado na produção de etanol em larga escala, oferecendo uma alternativa eficiente à fermentação em batelada clássica, pois permite a otimização das condições produtivas, a maximização da produtividade e a redução dos custos laboratoriais (COSTA, 2017).

No processo batelada alimentada, o fermento é adicionado à dorna contendo uma pequena quantidade de substrato, e posteriormente, o substrato é adicionado em pequenas quantidades de forma constante durante o processo fermentativo. Isso é feito através de um sistema de alimentação contínuo, que monitora a concentração de substrato na dorna e ajusta a taxa de alimentação para manter uma concentração ótima para o microrganismo (BORGES, 2008). A alimentação do tanque tem uma duração que varia de 4 a 6 horas. Após a conclusão da alimentação, o processo prossegue em modo de batelada (segundo estágio) até que todo o substrato seja consumido (VELOSO, 2019). Conforme mencionado pelo autor, observam-se efeitos inibitórios do substrato em concentrações acima de  $150,0 \text{ g.L}^{-1}$ .

Uma das principais vantagens do processo batelada alimentada é a possibilidade de controlar o crescimento celular e o metabolismo, o que permite a produção de uma maior quantidade de produto com maior qualidade. Além disso, o processo é mais flexível do que o processo contínuo, já que é possível interromper a alimentação a qualquer momento e fazer ajustes no processo (SANTOS *et al.*, 2015).

Porém, assim como qualquer outro processo, o processo batelada alimentada também apresenta algumas desvantagens, como a necessidade de equipamentos e controles mais sofisticados e a possibilidade de formação de espuma e contaminação do meio de cultura. Por isso, é importante avaliar as características do processo e escolher a melhor opção para a produção de determinado produto (SANTOS *et al.*, 2015).

Segundo Silva *et al.* (2018), operação de um biorreator em modo batelada alimentada enfrenta desafios na maximização da produtividade, ou seja, determinar a melhor forma de alimentação do substrato para obter a maior produtividade no menor tempo possível. Nesse contexto, é preciso considerar diversas restrições, tais como balanços de massa, volume

máximo do biorreator, limites mínimos e máximos de vazão de alimentação de substrato, entre outras possíveis, a fim de garantir o bom desempenho do processo.

De acordo com a Fermentec (2018a), a grande maioria das destilarias brasileiras, cerca de 85%, utilizam o processo de fermentação em batelada alimentada. No entanto, existe um número significativo de destilarias que optam por fermentações contínuas, representando cerca de 15% do total. Portanto, embora o processo de batelada alimentada seja amplamente utilizado, a fermentação contínua vem se mostrando uma alternativa viável e vantajosa em termos de produtividade e custos de investimento e operação, atraindo cada vez mais a atenção dos produtores de etanol.

O objetivo da adição gradual de substrato à dorna durante a etapa de batelada alimentada é minimizar o impacto da inibição causada pelo substrato na levedura e direcionar o metabolismo microbiano para a via de formação do produto de interesse (VELOSO, 2019). A próxima seção aborda de forma mais detalhada sobre esse processo contínuo.

### 2.2.3 Processo Contínuo

De acordo com Lima (2001), a fermentação contínua é realizada por meio da alimentação constante de uma dorna com substrato em fluxo contínuo, em uma concentração adequada ao microrganismo responsável pela fermentação. Ao mesmo tempo, o meio fermentado é retirado continuamente e em igual proporção, passando por um processo de centrifugação antes de ser encaminhado para a destilação.

A fermentação contínua consiste em uma operação em que a alimentação e a retirada do produto são realizadas de forma ininterrupta e com a mesma vazão, mantendo o volume do reator constante. Essa modalidade apresenta versatilidade quanto à forma de operação, geralmente com 4 ou 5 reatores em série, podendo ou não haver reciclo da levedura. Em relação ao processo em batelada, a fermentação contínua oferece diversas vantagens, tais como o menor volume de reator, maior produtividade e custo reduzido de investimento e operação (ZANARDI; COSTA JÚNIOR, 2018).

A fim de alcançar o estado estacionário, no qual as variáveis de estado permanecem constantes, é essencial manter o volume da dorna constante no processo de fermentação contínua. De acordo com Facciotti (2001), as principais vantagens do processo contínuo são o aumento da produtividade, devido à redução dos tempos ociosos, a obtenção de um fermentado uniforme que facilita a recuperação do produto final, a manutenção das células em um estado fisiológico constante, permitindo estudos de regulação metabólica e otimização da composição

do meio de cultura, a possibilidade de integração com outras operações contínuas na linha de produção, o uso de controles avançados e a necessidade reduzida de mão de obra.

Segundo Pereira, Maci e Gimenez (2020), o processo contínuo apresenta vantagens em relação aos processos em batelada, pois permite otimizar as condições de produção, gerando maior produtividade e uniformidade do produto, além de reduzir os custos com mão de obra e simplificar a sanitização das dornas. O processo contínuo é caracterizado pela alimentação constante de substrato, inóculo e nutrientes na dorna, permitindo a manutenção das condições ideais de fermentação ao longo do tempo. Dessa forma, é possível obter uma produção mais estável e consistente, com menor variabilidade entre lotes. Além disso, o processo contínuo permite um controle mais preciso das variáveis de processo, o que aumenta a eficiência e a qualidade da produção.

No entanto, de acordo com Facciotti (2001), a fermentação contínua também apresenta algumas desvantagens, mencionadas a seguir: maior investimento inicial na construção da planta; possibilidade de surgimento de mutações genéticas espontâneas, que podem resultar na seleção de mutantes menos produtivos; maior risco de contaminações; dificuldades de manutenção do estado estacionário em situações como formação de espuma, crescimento de microrganismos nas paredes das dornas ou nos sistemas de entrada e saída de líquido.

## **2.3 Biodiversidade de leveduras**

A fim de estabelecer uma conexão coesa sobre modos de operação em batelada alimentada e contínuo, é relevante destacar a importância da seleção adequada de leveduras no contexto dos processos contínuos. Sendo assim, a seguir foram apresentadas discussões sobre os tipos de leveduras que podem ser utilizadas na produção de etanol.

### **2.3.1 Leveduras Seleccionadas**

Leveduras seleccionadas são cepas de leveduras específicas que foram isoladas, cultivadas e adaptadas para uma determinada aplicação industrial, como por exemplo na produção de etanol, bebidas alcoólicas, pães, queijos, entre outros. Essas leveduras foram seleccionadas por sua capacidade de fornecer um perfil sensorial desejado, alta eficiência na conversão do substrato em produto final, resistência a condições adversas e outras características desejáveis (AMORIM, 2013).

Na indústria de bebidas alcoólicas, as leveduras selecionadas são frequentemente utilizadas para a produção de cervejas, vinhos, destilados e outras bebidas fermentadas. O uso de leveduras selecionadas garante a consistência na qualidade do produto final, ao mesmo tempo em que melhora a eficiência do processo de fermentação. Essas cepas de leveduras foram selecionadas e adaptadas para as condições específicas de produção de cada tipo de bebida alcoólica, resultando em produtos com aroma, sabor e aparência desejados pelo consumidor (AMORIM, 2013).

O uso de leveduras selecionadas também pode reduzir o tempo necessário para a fermentação, aumentar a produção de álcool, diminuir o consumo de substrato e minimizar o risco de contaminação bacteriana. Em contraste, o uso de leveduras nativas ou selvagens pode levar a variações no perfil sensorial do produto final, baixa eficiência na conversão do substrato e riscos de contaminação bacteriana, o que pode levar a problemas de qualidade e segurança alimentar (ESTEVINHO, 2015).

O uso de leveduras selecionadas é uma prática comum na indústria de bebidas alcoólicas e em outras indústrias que utilizam a fermentação como processo de produção. Essas cepas de leveduras oferecem benefícios em termos de consistência na qualidade do produto final, eficiência do processo e segurança alimentar (ESTEVINHO, 2015).

As leveduras do gênero *Saccharomyces* são as mais utilizadas pelas destilarias brasileiras na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, devido a uma combinação de características que favorecem o processo fermentativo. Essas leveduras são capazes de metabolizar a sacarose e produzir etanol e gás carbônico em ambiente anaeróbico, apresentando rápida conversão dos açúcares em etanol, alta tolerância ao produto formado, osmotolerância, tolerância a altas temperaturas e atividade celular em ambiente ácido (GÓES-FAVONI *et al.*, 2018).

O grupo *Saccharomyces sensu stricto* é composto por uma variedade de espécies de leveduras, desde aquelas com uso industrial e laboratorial, como a *Saccharomyces cerevisiae*, até aquelas encontradas em áreas ambientais limitadas. Apesar dessa diversidade, todas as espécies compartilham características favoráveis, como facilidade de propagação em laboratório, genomas relativamente pequenos e curtos tempos de geração, tornando-as atraentes para estudos genômicos comparativos e evolutivos. Essas características permitiram a obtenção de uma quantidade sem precedentes de informações genômicas sobre essas leveduras, proporcionando uma base sólida para investigações comparativas mais amplas (MANDUJANO, 2018).

Por sua vez, a espécie *Saccharomyces cerevisiae* é uma das leveduras mais importantes e historicamente associada às atividades humanas, como a produção de cerveja, vinho e pão. Além do seu papel na indústria, a biologia eucariótica da *S. cerevisiae*, facilidade de propagação e genética bem estabelecida tornaram-na um sistema modelo de estudo intensivo. Atualmente, sua sequência genética está totalmente disponível, e a riqueza desses dados genômicos está fornecendo informações sem precedentes sobre processos biológicos que impulsionaram a especiação e evolução, tanto no ambiente natural quanto em resposta a forças seletivas, incluindo as decorrentes da domesticação histórica das leveduras pelo homem. Essa compreensão mais profunda pode ser aplicada em processos industriais, como a produção de bioetanol para uso como combustível (MANDUJANO, 2018; RUCHALA *et al.*, 2020).

### 2.3.2 Leveduras Nativas

Leveduras nativas são aquelas que ocorrem naturalmente no ambiente e não foram selecionadas ou modificadas pelo homem. Elas podem ser encontradas em diferentes substratos, como frutas, grãos, plantas e solo. Na produção de etanol, as leveduras nativas podem ser encontradas naturalmente na cana-de-açúcar e outras matérias-primas utilizadas para a fermentação (ROSSI, 2009).

As leveduras nativas e selvagens podem ser diferenciadas com base em suas características fermentativas, sendo que as leveduras selvagens apresentam características inadequadas para o processo de fermentação alcoólica. Geralmente, essas leveduras não pertencem ao gênero *Saccharomyces* e são consideradas "oportunistas", ou seja, são capazes de dominar o processo apenas em condições anormais, como baixas concentrações de etanol, paradas prolongadas ou sequenciais, entre outras (TOGNETE, 2017).

Embora as leveduras selecionadas sejam geralmente preferidas na produção de etanol, as leveduras nativas podem apresentar algumas vantagens em relação a elas, como uma maior adaptação ao ambiente local e uma maior diversidade genética, o que pode resultar em uma melhor eficiência da fermentação (ROSSI, 2009). No entanto, é importante ressaltar que determinadas cepas de leveduras autóctones têm o potencial de contribuir positivamente para o processo fermentativo, uma vez que apresentam a capacidade de metabolizar os açúcares pentoses, constituídos por cinco carbonos (MENEZES; CASTRO; ROCHA, 2021).

Segundo Menezes, Catro e Rocha (2021), essa habilidade permite a utilização mais eficiente da biomassa celulósica na produção de etanol, o que pode resultar em um aumento significativo na produtividade. Dentre as principais linhagens de leveduras selvagens

reconhecidas nesse contexto, destacam-se a *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus* e *Spathaspora arborariae*. No entanto, as leveduras nativas também podem apresentar algumas desvantagens, como uma menor tolerância ao estresse e uma maior variabilidade em relação à qualidade e quantidade do produto final (ROSSI, 2009).

Além disso, um outro aspecto marcante dessas leveduras é a baixa tolerância ao etanol, requerendo concentrações reduzidas dessa substância para se multiplicarem. Por esse motivo, sua presença é menos comum em fermentações com altos teores de etanol, o que pode resultar em uma melhoria das condições do processo. A presença desses microrganismos afeta negativamente a produção e o rendimento dos processos fermentativos (TOGNETE, 2017).

Por causa dessas desvantagens, as leveduras nativas são geralmente consideradas como uma alternativa menos previsível e menos controlada do que as leveduras selecionadas. No entanto, em alguns casos, as leveduras nativas podem ser utilizadas com sucesso na produção de etanol, especialmente em regiões onde não há disponibilidade de leveduras selecionadas ou onde a diversidade de substratos é alta (ARGOTI, 2015).

### 2.3.3 Leveduras Floculantes

As leveduras floculantes são um tipo de levedura que tem a capacidade de se aglomerar em flocos no final da fermentação. Essa característica pode ser vantajosa na produção de cervejas e vinhos, pois esses flocos tendem a se depositar no fundo do fermentador, permitindo uma fácil separação do líquido clarificado (BELO, 2013).

A levedura floculante apresenta uma característica de grande relevância, que consiste na capacidade de suas células se agregarem e sedimentarem facilmente no caldo fermentado. Esse fenômeno permite a separação celular por meio de decantação, resultando em benefícios econômicos significativos para o processo, uma vez que a utilização de centrífugas, que demandam consumo energético adicional, torna-se desnecessária (GUIDINI, 2013).

As leveduras floculantes são geralmente divididas em dois tipos: as que formam flocos grandes e pesados, que são conhecidas como "floculantes fortes", e as que formam flocos menores e leves, conhecidas como "floculantes fracos". As leveduras floculantes fortes tendem a sedimentar mais rapidamente, enquanto as floculantes fracas tendem a permanecer suspensas por mais tempo (BELO, 2013).

A utilização de leveduras floculantes pode afetar as características organolépticas da bebida produzida, como aroma e sabor, já que essas leveduras têm uma menor produção de ésteres e outras substâncias voláteis. No entanto, isso pode ser vantajoso em alguns estilos de

cerveja, como as *lagers*, onde um perfil mais limpo é desejado. As leveduras floculantes podem ser encontradas naturalmente em muitas cepas de leveduras, mas também podem ser selecionadas e cultivadas para essa característica específica. O uso de leveduras floculantes pode ser particularmente útil em escala industrial, onde a rápida sedimentação e separação da levedura é importante para a eficiência do processo de produção (AMORIM, 2013).

De acordo com Camargos (2019), o uso de leveduras floculantes no processo contínuo de produção de etanol pode ter um impacto significativo, pois a floculação parece reduzir a lavagem de células. Além disso, a autora verificou que cepas de leveduras floculantes apresentam maior resistência ao estresse provocado pelo etanol, devido a floculação proteger as células que expressam FLO1 de ambientes estressantes.

Essa capacidade de floculação elimina a necessidade de utilização de centrífugas, equipamentos que são comumente empregados na recuperação das células de levedura dispersas, resultando em economia de custos relacionados à aquisição e manutenção dessas centrífugas, bem como no consumo de energia para a operação das mesmas. Portanto, a utilização de leveduras floculantes pode ser considerada uma abordagem ambientalmente correta no processo de fermentação (CRUZ, 2019). Conforme descrito por Guidini (2013), a incorporação de células de levedura com capacidade de floculação resulta em uma economia de aproximadamente 16% nos custos de processamento, bem como de 10% nos custos de instalação. Além de facilitar a etapa de separação entre o vinho e as células, a utilização de células floculantes possibilita sua aplicação em reatores de alta densidade celular, o que promove uma melhoria na produtividade de etanol e uma redução no tempo de fermentação.

Por sua vez, Santos *et al.* (2015) investigaram o comportamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* de característica floculante em relação ao pH inicial do meio de fermentação. Concluíram que o pH exerce forte influência sobre o comportamento floculante da levedura, uma vez que valores de pH de 4,0 tornaram o meio opaco e viscoso. Já para fermentações iniciadas em pH 5,0, foram observados maior rendimento e produtividade, sem desfloculação da levedura ao final do processo. Esses resultados mostram a importância do controle do pH durante a fermentação para a obtenção de um produto de qualidade.

## **2.4 Recirculação de leveduras**

No final da fermentação alcoólica em um processo industrial, é necessário separar as leveduras do produto ou resíduo resultante. Essas leveduras podem ser reutilizadas no processo, o que reduz os custos de reposição de fermento e melhora as condições de operação, uma vez

que os microrganismos reciclados não precisam consumir substrato para a fase de crescimento e já estão adaptados ao meio. É importante separar as células do produto para evitar a contaminação deste último (LIMA, 2004).

Para melhorar a eficiência da conversão ou aumentar a concentração celular dentro do reator, é comum o uso de reatores contínuos com reciclagem em diversos processos fermentativos, como a fermentação alcoólica e o tratamento de resíduos. O processo de reciclagem envolve a separação das células na saída do reator por meio de equipamentos como centrífugas, filtros e decantadores, seguido pelo retorno das células ao reator por meio de uma bomba. Isso permite a reutilização das células, resultando em menor custo de reposição de fermento e melhor adaptação dos microrganismos ao meio de cultivo. Nas usinas brasileiras, o processo de separação mais comum é a centrífuga, que separa as leveduras e o etanol no mosto fermentado (FURTADO; SCANDIFFIO, 2006).

Após a fermentação alcoólica, o vinho resultante é direcionado para as colunas de destilação, a última etapa do processo de produção de etanol. As células de levedura, por sua vez, passam por um tratamento rigoroso antes de retornarem ao processo de fermentação. Esse processo envolve diluição com água e adição de ácido sulfúrico para alcançar um pH de 2,5 ou menos (pH de 2 em caso de infecção bacteriana). Essa mistura de fermento diluído e acidificado é conhecida como "pé-de-cuba" e é mantida agitada por uma a três horas antes de ser reintroduzida no tanque de fermentação (FURTADO; SCANDIFFIO, 2006).

É comum utilizar o tratamento ácido para controlar a contaminação bacteriana presente no fermento de levedura. Esse processo pode reduzir em até 44,3% a presença de microrganismos indesejáveis, dependendo do tempo e da intensidade do tratamento. No entanto, quando a levedura flocula devido à ação das bactérias, o tratamento ácido pode dispersar tanto o fermento quanto as bactérias, sem eliminá-las completamente (SOUZA e MUTTON, 2004).

O uso do reciclo de fermento possibilita o processamento de uma maior quantidade de material em um reator contínuo, pois a corrente reciclada apresenta uma concentração celular mais elevada do que a saída do reator. Além disso, a taxa de diluição (ou vazão específica) também pode ser maior, resultando em maior produtividade (CARNERO, 2011).

Ao aumentar a taxa de reciclagem celular, é possível alcançar uma taxa de crescimento celular maior do que a taxa de diluição, reduzindo os efeitos de perturbações e aumentando a estabilidade do processo. Além disso, há economia de substrato, já que as células que entram no processo por meio de uma nova alimentação consomem substrato para crescer, enquanto as células recicladas já estão prontas para a fermentação e adaptadas ao meio. No entanto, é

importante lembrar que existem limites para a taxa de reciclagem em processos aeróbicos, pois à medida que a fração de células recuperadas aumenta, a concentração de células no meio cresce, o que pode tornar difícil o suprimento de oxigênio. Já em processos anaeróbicos, essa limitação não se aplica, mas existem outras limitações, como as associadas ao fornecimento de nutrientes (CARNERO, 2011).

Portanto, é fundamental buscar um equilíbrio entre as estratégias adotadas na nutrição de levedura para maximizar o rendimento e a qualidade do etanol produzido, uma vez que a nutrição de levedura é um processo fundamental na produção de etanol, podendo ser feita a partir de matérias-primas como a cana-de-açúcar e o milho. O objetivo principal desse processo é fornecer aos microrganismos as condições ideais para um bom desempenho na fermentação, resultando em um maior rendimento e qualidade do etanol produzido. A nutrição de levedura foi desenvolvida no Brasil na década de 1970 pelo pesquisador Luiz Fernando Laranjeira (SILVA, 2010).

O processo consiste em fornecer às leveduras os nutrientes necessários para o seu crescimento e multiplicação, como nitrogênio, fósforo, vitaminas e minerais. A falta de algum desses nutrientes pode levar a um crescimento inadequado das leveduras, resultando em uma fermentação incompleta e baixo rendimento do etanol (SILVA, 2010). A nutrição de levedura é feita adicionando-se uma solução de nutrientes ao mosto (solução açucarada obtida a partir da cana-de-açúcar ou do milho). A quantidade e o tipo de nutrientes adicionados variam de acordo com a composição do mosto e o tipo de levedura utilizada. É importante ressaltar que o excesso de nutrientes pode ser prejudicial à fermentação, causando um aumento na produção de subprodutos indesejáveis (CARNERO, 2011).

Além da adição de nutrientes, outros fatores também são importantes na nutrição de levedura para a produção de etanol, como a temperatura, o pH e a agitação do mosto. Um controle adequado desses fatores pode garantir uma fermentação eficiente e de alta qualidade. (CARNERO, 2011).

De acordo com Camargos (2019), na produção de etanol, algumas destilarias utilizam exclusivamente o caldo, enquanto outras utilizam apenas o melaço como substrato. No entanto, a mistura dos dois substratos é considerada a melhor opção, uma vez que o caldo apresenta deficiências nutricionais que podem ser supridas pelo melaço. Por outro lado, o melaço contém um alto teor de sais minerais e compostos inibidores que podem levar à inibição das leveduras devido à pressão osmótica. A combinação dos dois substratos permite que as deficiências nutricionais sejam compensadas e que a pressão osmótica seja equilibrada, resultando em uma fermentação mais eficiente e produtiva. Esse ambiente estressante pode levar à diminuição da

produção de etanol e até mesmo à morte das células, afetando diretamente o rendimento e a qualidade do produto. Portanto, é importante buscar formas de minimizar esse estresse e melhorar a tolerância das leveduras a essas condições extremas (RIBEIRO, 2019).

## **2.5 Fatores que afetam a eficiência da fermentação etanólica**

Existem vários fatores que podem influenciar a fermentação do etanol, incluindo aspectos físicos, químicos e microbiológicos. Os fatores físicos envolvem a temperatura, pressão osmótica e outros, enquanto os químicos incluem o pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos e inibidores. Já os fatores microbiológicos incluem a espécie, linhagem e concentração de levedura, bem como a contaminação bacteriana. Todos esses fatores afetam diretamente a eficiência da conversão do açúcar em etanol e, conseqüentemente, o rendimento da fermentação. Para garantir a eficiência do processo, é importante monitorar regularmente variáveis como temperatura, densidade, pH, contaminação bacteriana, velocidade fermentativa e açúcares residuais, conforme destacado por Pereira, Macri e Gimenez (2020).

Os intervalos de temperatura ideais para a produção industrial de etanol variam de 26 a 35°C. Quando a temperatura ultrapassa esses valores, há maior probabilidade de contaminação bacteriana e a levedura se torna mais vulnerável à toxicidade do etanol. Diferentes temperaturas afetam as atividades metabólicas e o crescimento das leveduras, já que a exposição a altas temperaturas pode alterar elementos celulares, como proteínas e membranas plasmáticas. A temperatura é um dos principais fatores que influenciam a viabilidade celular, crescimento e capacidade fermentativa das leveduras. Todas essas considerações ressaltam a importância de manter temperaturas adequadas durante o processo de produção de etanol.

De acordo com Naves *et al.*, (2010) a fermentação ocorre em uma velocidade mais elevada à medida que a temperatura aumenta, porém, também há uma maior possibilidade de contaminação bacteriana. Além disso, a temperatura pode afetar a permeabilidade da membrana das leveduras, afetando a absorção de nutrientes e açúcar, o que pode levar a um tempo de fermentação mais longo do que o esperado, caso esteja muito baixa. Conforme Amaral (2009), apesar de haver mecanismos fisiológicos que regulam a temperatura interna das leveduras, um aumento no estresse celular pode ocorrer, resultando em um rápido declínio da viabilidade do microrganismo.

O pH é um fator crucial para as fermentações industriais devido à sua importância no controle da contaminação bacteriana e seus efeitos no crescimento e na taxa fermentativa das leveduras (NAVES *et al.*, 2010). As fermentações podem ocorrer em uma ampla faixa de

valores de pH. No entanto, a fermentação alcoólica começa com valores baixos de pH, geralmente os valores estão na faixa de 4,0 a 6,0 no início do processo, e termina em torno de 3,5 a 4,0. É importante notar que um pH baixo pode resultar em alguns efeitos indesejáveis, como a precipitação de nutrientes, como o potássio e o nitrogênio, que podem ser perdidos durante a fermentação. Isso pode afetar a eficiência da fermentação e a qualidade final do produto, como a sensibilidade do etanol produzido (AMARAL, 2009). Portanto, o controle adequado do pH é essencial para garantir uma fermentação eficiente e de qualidade.

O processo de fermentação nas indústrias ocorre em uma faixa mais elevada de pH (em torno de 4,5), o que beneficia a integridade fisiológica da levedura. Durante as fermentações, o pH pode variar devido a diversos fatores, tais como o consumo de diferentes fontes de nitrogênio, bem como à formação de ácidos, como acético, láctico, pirúvico e succínico (SOUSA; MONTEIRO, 2011). Como o pH do caldo de cana é naturalmente em torno de 5,5, a acidificação realizada antes da inoculação favorece a fermentação alcoólica e previne o crescimento de bactérias contaminantes.

Na produção industrial de etanol, é comum a presença de microrganismos que se originam do caldo da cana, incluindo níveis de bactérias como *Lactobacillus* e *Bacillus*. Estudos indicam que a contaminação bacteriana pode causar perdas no rendimento da fermentação, devido ao desvio da transformação das matérias-primas fermentáveis, como a sacarose, para a produção de outras substâncias indesejáveis, como os ácidos láctico e acético, é um fator prejudicial para a produção de álcool. Além disso, há a redução do rendimento da produção de álcool devido ao consumo parcial do produto pelas bactérias contaminantes, o que pode levar à diminuição da eficiência do processo e redução dos lucros (NAVES *et al.*, 2010; LINO *et al.*, 2021).

A manutenção da viabilidade das leveduras é crucial para o sucesso da fermentação alcoólica industrial. A viabilidade das leveduras está diretamente relacionada ao seu desempenho durante o processo de fermentação, sendo que uma maior viabilidade resulta em um melhor rendimento do processo. De acordo com Eliodório *et al.* (2022), a obtenção de elevada viabilidade celular e uma ótima sinergia entre rendimento e produtividade são aspectos indispensáveis para o êxito de um bioprocessamento voltado à produção em larga escala de compostos químicos, tais como o etanol combustível.

Cruz *et al.* (2014) demonstram que a viabilidade celular em sistemas de fermentação anaeróbicos reduz continuamente, mas permanece acima de 95% em condições aeróbicas em sistemas de fermentação a vácuo. A elevação da temperatura de fermentação também pode

levar a uma queda acentuada da viabilidade celular, devido ao aumento das taxas de produção e acumulação de etanol no meio e nas células.

Embora temperaturas mais baixas (15 a 20°C) apresentem maior rendimento alcoólico, a produção máxima pode ser alcançada em um período mais longo. Em temperaturas entre 25°C e 31°C, a taxa inicial de fermentação é maior, mas em temperaturas superiores a 35°C ocorre uma redução significativa na viabilidade celular (CRUZ *et al.*, 2014). Portanto, a viabilidade das leveduras é um fator de extrema importância no controle da fermentação alcoólica industrial.

Os fatores físicos, químicos e microbiológicos discutidos anteriormente desempenham um papel crucial no controle da fermentação do etanol. Tanto a temperatura quanto o pH são parâmetros essenciais a serem monitorados durante o processo de produção de etanol, a fim de garantir uma fermentação eficiente e de qualidade. A temperatura adequada é fundamental para o crescimento e a atividade metabólica das leveduras, enquanto o controle do pH é necessário para prevenir a contaminação bacteriana e manter a integridade fisiológica das leveduras.

No entanto, é importante ressaltar que esses fatores podem influenciar diretamente a viabilidade celular das leveduras. A viabilidade das leveduras é um indicador da saúde e do desempenho desses microrganismos durante a fermentação alcoólica. Altas temperaturas e variações extremas de pH podem levar a uma queda na viabilidade celular, resultando em um rendimento reduzido do processo. Por outro lado, temperaturas mais baixas podem prolongar o período de fermentação, mas também aumentam a viabilidade das leveduras.

Dada a relevância da viabilidade das leveduras no contexto da fermentação alcoólica, é de suma importância a implementação de técnicas de avaliação adequadas. Nesse sentido, o capítulo subsequente abordará detalhadamente o percurso metodológico adotado nesta pesquisa, com o objetivo de monitorar o processo de produção de etanol, considerando aspectos como a obtenção de uma fermentação de alta qualidade, livre de floculação e contaminação por leveduras selvagens, além da avaliação da eficiência global do processo produtivo.

### 3 METODOLOGIA

O trabalho em questão foi desenvolvido por meio de uma pesquisa de campo e compilação de dados laboratoriais em escala industrial. Ao longo de três meses foi realizado o acompanhamento da safra em uma usina bioenergética localizada no estado de Goiás. Essa etapa consistiu em passar o turno de trabalho junto à operação em campo e à automação no Centro de Operações Interno (COI).

A usina selecionada é composta por oito setores distintos, a saber: 1) Recepção, Preparo e Extração (RPE); 2) Tratamento de Caldo (com linhas separadas para produção de álcool e fabricação de açúcar); 3) Fábrica de Açúcar; 4) Fermentação; 5) Destilaria; 6) Caldeira; 7) Geração de Energia; e 8) Estação de Tratamento de Água (ETA). Durante o acompanhamento, foram dedicados em média de 10 a 12 dias para cada setor. Contudo, neste estudo, estão detalhados somente os setores que interferem diretamente e possuem influência na produção de etanol hidratado e anidro, com foco especial no setor fermentativo.

A abordagem adotada foi comunicativa, visando à convivência e ao aprendizado das atividades realizadas durante um turno de trabalho. Ao finalizar cada etapa de observação em campo, foi realizada a descrição detalhada das atividades por meio de texto, acompanhado de um fluxograma ilustrativo. Ao término da primeira etapa, com o conhecimento adquirido, foi realizado um comparativo com estudos previamente conduzidos sobre os aspectos que favorecem a entrada de leveduras selvagens no processo, juntamente com a importância da escolha adequada da levedura e a correta assepsia.

Na terceira etapa, foi feito um comparativo entre as safras de 2021/22 e 2022/23, em relação à persistência da levedura selecionada, A e B, nos processos. Foram realizadas análises mensais das principais variáveis que influenciam os resultados do trabalho. Essas variáveis incluem a análise de floculação nas dornas e sua influência na centrifugação, impactando o teor de levedura no vinho e no creme. Além disso, foi analisado o teor alcoólico na cuba, de acordo com o BRIX do mosto de alimentação, bem como a acidez sulfúrica, que indica infecções e atua como agente de floculação. Também foram realizadas análises microbiológicas de viabilidade e brotamento para avaliar o desempenho da levedura selecionada, bem como a medição do teor alcoólico do vinho destinado à destilaria. Por fim, foi feita uma análise do rendimento das duas safras, levando em consideração a marca do fermento utilizado.

## **4 ETAPAS DE PRODUÇÃO DO ETANOL NA USINA ANALISADA**

Durante o desenvolvimento deste estudo, foram realizadas visitas a uma indústria de produção de etanol, a fim de coletar dados e informações relevantes para a análise dos resultados. A análise dos resultados coletados permitiu obter um panorama completo do desempenho da indústria em termos de eficiência, qualidade do produto e conformidade com as normas estabelecidas. Dessa forma, foi possível avaliar aspectos como o rendimento da fermentação, a concentração de etanol obtido, a viabilidade das leveduras utilizadas, a presença de contaminação bacteriana, entre outros parâmetros relevantes.

Com base nos dados coletados e nas análises realizadas, torna-se possível identificar pontos fortes e áreas que necessitam de aprimoramento na indústria em estudo. Essa análise crítica dos resultados obtidos é fundamental para promover melhorias contínuas no processo produtivo, visando alcançar níveis ainda mais altos de eficiência, produtividade e qualidade do etanol produzido. Diante disso, a presente seção apresenta uma descrição minuciosa do processo de produção de etanol na usina em foco nesta pesquisa, abrangendo desde a chegada da cana-de-açúcar no pátio industrial até a etapa de destilação. Serão considerados aspectos fundamentais, como a fermentação e o tratamento do caldo, a fim de fornecer uma visão abrangente do fluxo produtivo adotado pela usina.

### **4.1 Recepção, preparo e extração**

O processo de recepção da cana na usina envolve a etapa de descarregamento e desfibração, enquanto a extração é realizada por meio da difusão e secagem do bagaço. A capacidade máxima de processamento nessa etapa é de 500 toneladas de cana por hora (TCH).

A cana-de-açúcar, proveniente do corte mecânico, chega ao pátio da usina por meio de caminhões canavieiros, onde aguarda para ser processada. Para verificar a quantidade de cana que será introduzida no processo, os caminhões, que possuem duas carretas com aproximadamente 35 a 40 toneladas cada, são direcionados à balança. Caso seja selecionado, um boletim de análise é gerado por meio da passagem pelo laboratório PCTS (Pagamento Cana Teor Sacarose), que coleta amostras para determinar o teor de sacarose, peso do bolo úmido, BRIX e pH.

O descarregamento da cana é realizado utilizando um guindaste do tipo hilo, onde a carreta tomba sobre uma mesa alimentadora que possui uma rotação entre 26 e 28 rotações por minuto (rpm). Dessa forma, a área de recepção da usina pode receber cerca de 6 a 7 caminhões

por hora. A mesa alimentadora tem a função de transportar a cana até um esteirão metálico, onde alguns pedaços de cana são separados e recolhidos pela água de lavagem, que os leva de volta para a esteira. Toda a água de lavagem da cana é direcionada para um tanque de sedimentação e retorna ao processo de forma tratada. Durante o processo de lavagem, é adicionado cal para corrigir o pH do tanque.

O colchão de cana uniforme que se forma no esteirão metálico é conduzido ao desfibrador, mas antes passa pelo adensador (rolo oco de “dentes”) que nivela a cana para entrar no rolo alimentador, até chegar ao desfibrador, rolo com 8 eixos e 72 martelos gerado por 6000 cv, no qual a estrutura do colmo da cana é desintegrada por completo.

Na saída do desfibrador, está localizado o soprador que faz a limpeza da esteira de borracha e metálica e junto a ele está o espalhador que separa os bagaços. A cana desfibrada, de valor entre 88 e 92% (valores, maior que 92% não gera uma extração de caldo eficiente, pois as células tendem a ficar muito abertas e menor que 88% de abertura da fibra, gera transbordamento no difusor, pois o caldo tende a ficar ralo – análise da célula feita no *Open Cell*) que vai para esteira passa por um eletroímã que faz a coleta de material indesejado no meio da cana e a partir disso, inicia-se a etapa da extração.

No difusor acontece a lixiviação, que é o arraste da sacarose pela água e caldo menos concentrado. Com isso, ao sair da esteira principal a cana cai na esteira transversal que regula a altura do colchão de cana e esse excesso vai em direção a esteira de retorno, cujo seu final é após o eletroímã.

O bagaço que entra no difusor é percolado por água de embebição com temperatura entre 90-95°C, o condensado, que vai para os captadores e é retornado para o próximo distribuidor. Uma bomba retira o caldo do captador e envia ao distribuidor seguinte, ocorrendo um esgotamento contra a corrente. Os dez primeiros captadores recebem o caldo de recirculação e nos próximos quatro, o caldo bombeado passa por aquecedores verticais antes de enviar ao distribuidor e nos dois últimos, o caldo com maior teor de sacarose após passar pela peneira rotativa, é bombeado para tratamento de caldo e posterior produção de álcool e açúcar.

Dentro do difusor, estão alocadas as roscas afofadoras, que possuem o papel de descompactar o bagaço para obter uma eficiência melhor de extração. Ao sair do difusor, o bagaço passa por um rolo flutuante que tem o papel de retirar uma pequena parcela de umidade, variando valores de 8-10% de retirada, e vai direto para o descarregador rotativo que faz a alimentação do bagaço no terno de secagem. Primeiramente, tem-se o desaguador, constituído por dois rolos que diminui a umidade em 75% e no segundo terno, tem-se a moenda com 4

rolos, de pressão, superior, inferior e saída), nesta etapa já existe a redução de 48-52% de umidade, com valor de umidade final de 55-62%.

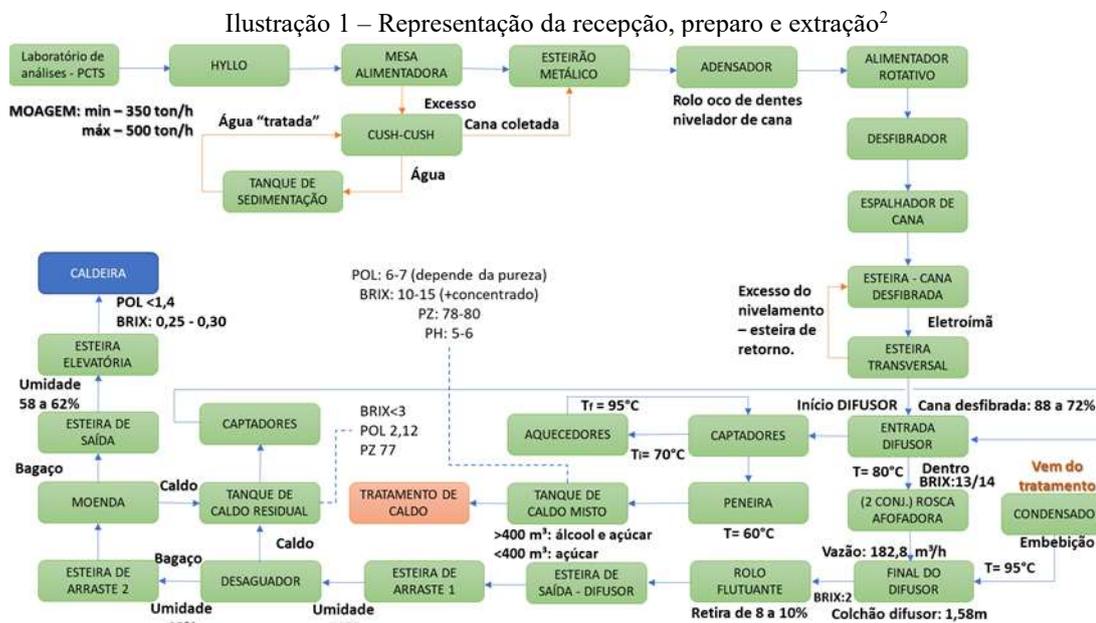
Após completar o processo de secagem, o caldo resultante da prensagem retorna para ser utilizado na etapa de embebição no difusor, enquanto o bagaço é transportado por uma esteira elevatória até o setor da caldeira, onde será utilizado como combustível. A Tabela 1 apresenta os elementos e valores necessários para alcançar uma extração eficiente por difusão.

Tabela 1 – Exemplo de extração eficiente. <sup>1</sup>

Bagaço final	POL	Umidade	BRIX	Fibra
	0,99 (<1,40)	53,82 (até 55%)	0,20	46,18
Lavagem da cana	pH - entrada	pH - saída	POL-entrada	POL-saída
	6,59	6,92	1,40	1,54
Caldo Misto	BRIX	POL	Pureza	pH
	Entre 12-13	10,23	78-80	5,60
Residual - Perdas	BRIX	POL	Pureza	-
	< 3,0	2,12	77	

Fonte: A Autora, 2023

Por sua vez, a Ilustração 1 fornece detalhes sobre os equipamentos e o processo envolvido na recepção, preparo e extração



Fonte: A Autora, 2023

<sup>1</sup> Dados de processo coletados na pesquisa de campo da usina do estado de Goiás. POL: porcentagem aparente de sacarose no caldo; Umidade: porcentagem de água na cana; BRIX: mede o teor de sacarose; Fibra: parte da cana insolúvel em água; pH: especificação de acidez ou basicidade; Pureza: porcentagem de sacarose nos sólidos de solução sacarina.

<sup>2</sup> Os blocos de cores diferentes são apenas para diferenciar os setores da usina. A cor verde é padrão para o processo descrito.

## 4.2 Tratamento de caldo

Esta etapa é composta pelas atividades de preparo e dosagem de cal, aquecimento do caldo, clarificação, filtração do lodo, pré-evaporação e evaporação do caldo, as duas últimas pertencentes ao tratamento de caldo para fabricação de açúcar.

O caldo proveniente da extração, alocado no tanque de caldo misto, vai direto para o setor de tratamento de caldo que passa por dois ciclos, o de fabricação de açúcar com adição de leite de cal para controle de pH, e o processo de etanol, que é o intuito do trabalho.

Do tanque de caldo misto, o caldo é bombeado até os aquecedores, do tipo casco e tubo, a fim de elevar a temperatura, com início 62,8°C, por efeito de troca térmica com vapor de escape e a finalidade de facilitar a eliminação das impurezas na decantação e reduzir os microrganismos presentes no caldo. Ao sair do aquecimento com 107°C, o caldo passa pelo balão *flash*, onde são liberadas todas as partículas em suspensão das bolhas de ar que ali estão agregadas e que impediriam a deposição das partículas de bagacilho durante a clarificação, se não fosse retirado o ar. Acima do ponto de ebulição para haver o “*flasheamento*”, o controle é feito somente pela temperatura.

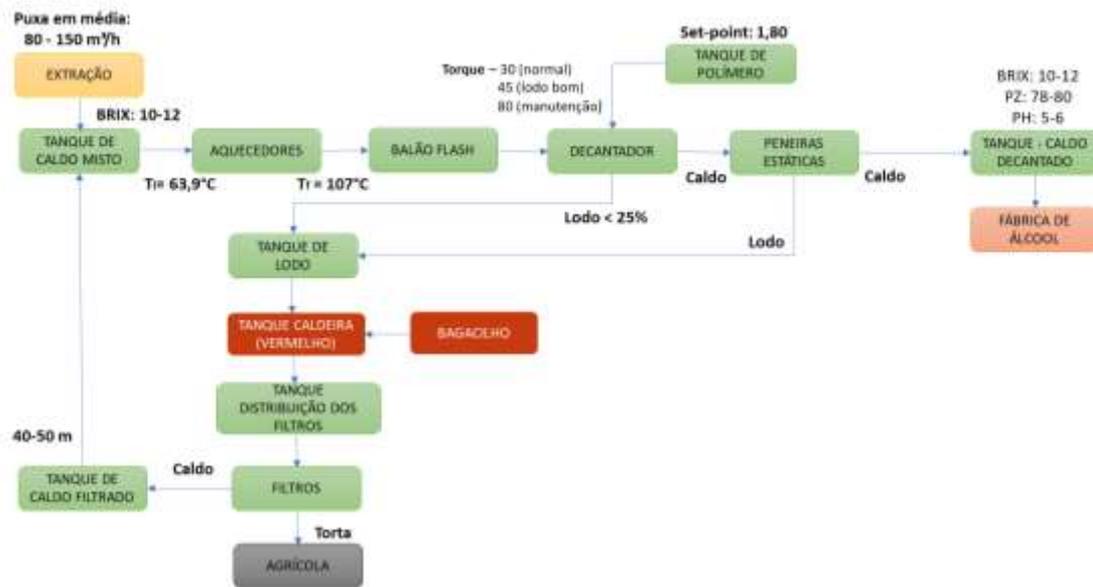
Na entrada do decantador, é adicionado polímero, que tem a função de agrupar partículas, deixando-as mais densas, o que facilita sua sedimentação??, decantando, e esse processo é feito sob agitação. O caldo decantado passa pelas peneiras estáticas, em que fica retido bagaço/lodo e as impurezas, e cai diretamente no tanque de caldo decantado. O material retido é raspado manualmente pelo operador, diretamente para o tanque de lodo, junto com o que sai do fundo da decantação.

O lodo removido dos decantadores possui uma considerável quantidade de açúcar que deve ser retornado ao processo na forma de caldo filtrado, uma tubulação transporta este lodo até outro tanque, em que é feito uma dosagem de bagacilho, para encorpar e facilitar o processo de filtração à pressão negativa na tela. A torta seca vai para o setor agrícola e o caldo extraído retorna ao tanque de caldo misto. Como garantia de uma boa filtração, o sistema deve apresentar baixa perda de sacarose na torta do filtro, caldo filtrado com baixa turbidez e alta taxa de retenção de material insolúvel.

Até finalizar este processo de decantação, quanto maior for mantido a temperatura, melhor para o processo, podendo haver perdas significativas de açúcar. Desse tanque, após ser peneirado, o caldo com BRIX de 10 a 12, se divide e parte vai para fermentação e outra segue no processo evaporativo.

Nesta seção do processo, o tratamento do caldo tem como objetivo principal a remoção de materiais em suspensão, contaminantes e produtos que possam gerar espuma. No entanto, não há interesse em eliminar os nutrientes benéficos para a fermentação, portanto a etapa de evaporação não é realizada. Na Ilustração 2, são apresentados os equipamentos e o processo detalhado do tratamento do caldo para a fermentação, fornecendo um guia visual do fluxo das operações e dos diferentes componentes envolvidos.

Ilustração 2 – Tratamento de caldo para produção de etanol<sup>3</sup>



Fonte: A Autora, 2023

## 4.3 Fermentação

### 4.3.1 Multiplicação de fermento

A multiplicação do fermento é um processo realizado apenas uma vez, no início da safra. A base estimada é de 200 kg de fermento seco para produzir 4 toneladas de fermento, e esse processo consiste na hidratação do fermento seco por meio de sua diluição em água e adição de uma solução açucarada. Isso resulta no aumento da população de levedura presente.

Inicialmente, a água é aquecida e enviada para a cuba onde ocorrerá a diluição do fermento. Aguarda-se a ativação do fermento e, em seguida, realiza-se a alimentação com água e mel final, com um teor de açúcar (BRIX) entre 6 e 8, proveniente da Fábrica de Açúcar. É

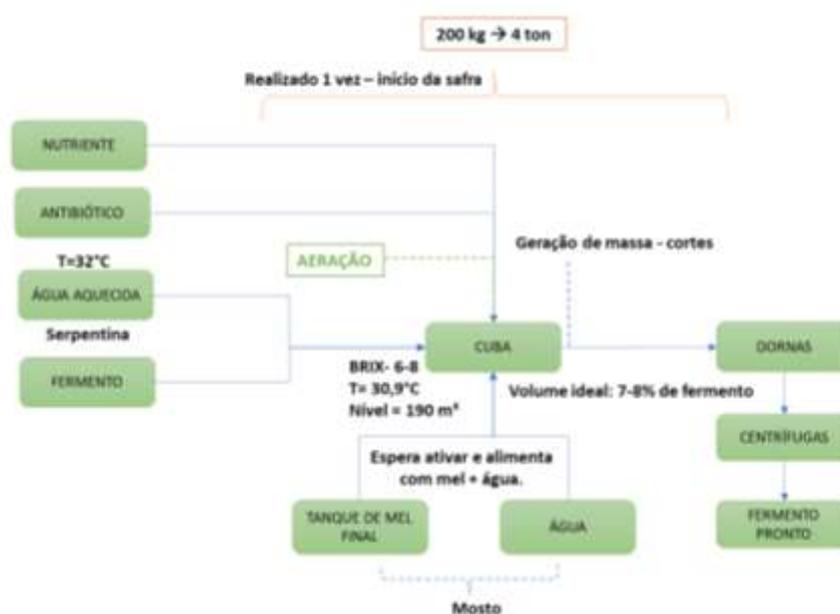
<sup>3</sup> Os blocos de cores diferentes são apenas para diferenciar os setores da usina. A cor verde é padrão para o processo descrito.

importante manter esse valor de BRIX baixo para garantir que ocorra apenas a multiplicação das leveduras. A temperatura recomendada para esse processo é em torno de 30,9°C.

Na cuba, também é feita a dosagem de nutrientes. À medida que o número de células de levedura se multiplica, ocorrem cortes no volume do levedo formado até que seja alcançado um volume suficiente para alimentar três cubas e fazer a passagem para as dornas, onde ocorrerá a centrifugação. Assim que a dorna atinge o final do seu ciclo e a atividade fermentativa se encerra, o volume ideal de fermento chega a cerca de 7-8%.

Na Ilustração 3 é apresentada uma representação visual do processo de multiplicação do fermento, ilustrando as etapas e os equipamentos envolvidos nesse processo.

Ilustração 3 – Multiplicação de fermento



Fonte: A Autora, 2023

A multiplicação de fermento é um processo fundamental na produção de bebidas fermentadas, como cerveja e vinho. O objetivo dessa etapa é aumentar a quantidade de células presentes no fermento, garantindo uma fermentação eficiente e uma maior produção de álcool e outros compostos desejáveis.

O processo de multiplicação do fermento geralmente começa com a hidratação do fermento seco. O fermento seco é diluído em água, proporcionando um ambiente favorável para a ativação das leveduras presentes nele. Essa etapa é importante para reidratar as células de levedura, permitindo que elas se tornem metabolicamente ativas.

Após a hidratação, é comum adicionar uma solução açucarada ao fermento para fornecer nutrientes e energia para as leveduras. A presença de açúcares na solução estimula o

crescimento e a multiplicação das leveduras, resultando em um aumento significativo no número de células.

Durante a multiplicação, é necessário controlar a temperatura do processo, uma vez que diferentes cepas de leveduras têm faixas de temperatura ótimas para o crescimento. A temperatura recomendada varia dependendo do tipo de levedura e do produto desejado. Manter a temperatura adequada é fundamental para obter uma multiplicação saudável e eficiente.

À medida que as leveduras se multiplicam, é necessário realizar cortes no volume de fermento para manter a proporção correta de células e nutrientes. Essa prática ajuda a controlar a qualidade e a saúde do fermento, evitando a multiplicação exagerada da levedura e o acúmulo de subprodutos indesejáveis.

Após a fase de multiplicação, o fermento resultante é utilizado para a fermentação da bebida desejada. A quantidade de fermento multiplicado é determinada com base na escala de produção e nas características específicas do processo de fermentação.

A multiplicação de fermento é uma etapa crucial na indústria de bebidas fermentadas, pois influencia diretamente a qualidade, o sabor e o teor alcoólico do produto. Um fermento saudável e bem multiplicado contribui para uma fermentação consistente, além de oferecer maior controle sobre as características organolépticas da bebida.

#### 4.3.2 Processo Mosto

Está contido no tanque de mosto: caldo, água filtrada, pré-evaporado e condensado (o uso do condensado somente se faz necessário quando falta água no processo). Nesta etapa o BRIX com valor mais alto, tende a gerar menos mel e para fazer o ajuste desse BRIX, variação de 24, faz-se a dosagem de mel final, proveniente da Fábrica de Açúcar, por sucção de bomba. Assim, o mosto é formado e tem-se o princípio da base de alimento para as leveduras que produz o etanol.

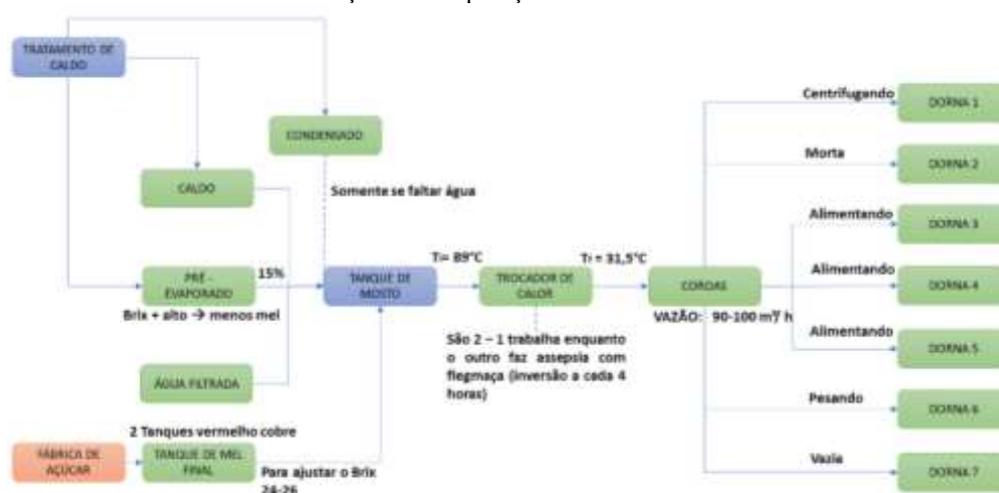
Após passar pelo ajuste do BRIX, esse mosto passa por processo de resfriamento em trocadores de calor do tipo placa, resfriando de 89°C à 31,5°C, etapa importante para controle de temperatura fermentativa. Em cima dos trocadores de calor, estão localizadas coroas que tem a função de direcionar esse caldo para as dornas, que são 7. A forma de trabalho dessas dornas é dividida em 4 etapas: Primeiro, uma dorna é utilizada para separar o que é vinho do creme de fermento, por meio de um processo chamado centrifugação. Essa separação é importante para obter um vinho de qualidade e garantir a eficiência do processo. Em seguida, uma dorna é utilizada para a etapa chamada "morta". Nesse momento, a levedura já consumiu todo o açúcar

presente no meio de fermentação. Essa etapa é importante para verificar se a fermentação foi concluída e se a levedura desempenhou seu papel na transformação do açúcar em etanol.

Posteriormente, temos três dornas em que ocorre a etapa de alimentação. Nessa fase, é adicionado mais açúcar ao meio de fermentação para que a levedura continue a produzir etanol. Essa etapa é essencial para manter a atividade fermentativa e garantir uma boa produção de etanol. Uma dorna é reservada para a etapa de pesagem, na qual é feita a medição do "BRIX". Essa medição é importante para acompanhar o progresso da fermentação e garantir que a concentração de açúcares esteja adequada para a produção de etanol.

Por fim, tem-se uma dorna vazia, que não está em operação. Essa dorna serve como um espaço para futuras fermentações e permite uma melhor organização do processo produtivo. Vale ressaltar que, quando ocorre a floculação, ou seja, quando as leveduras se agregam formando flocos, não é possível realizar a pesagem do BRIX em uma dorna. Isso porque a floculação dificulta a medição precisa da concentração de açúcares. Na Ilustração 4, destaca-se o processo de preparação do mosto de alimentação.

Ilustração 4 – Preparação do mosto<sup>4</sup>



Fonte: A Autora, 2023

<sup>4</sup> Os blocos de cores diferentes são apenas para diferenciar os setores da usina. A cor verde é padrão para o processo descrito.

### 4.3.3 Processo fermentativo

O processo fermentativo mais utilizado em usinas é o de *Melle-Boinot*, em que, o fermento utilizado para fermentação é separado por centrifugação, tratado e reutilizado durante o período de safra. O processo analisado utiliza-se batelada alimentada em dornas fechadas, sendo, alimentação em uma única dorna e com tempo de espera para o açúcar ser consumido pela levedura. O processo considera-se “morto” após não ter nenhum açúcar na dorna e o vinho bruto é centrifugado dividindo assim o produto em levedo, que é recuperado para voltar ao processo, e o vinho centrifugado, que segue para a destilaria.

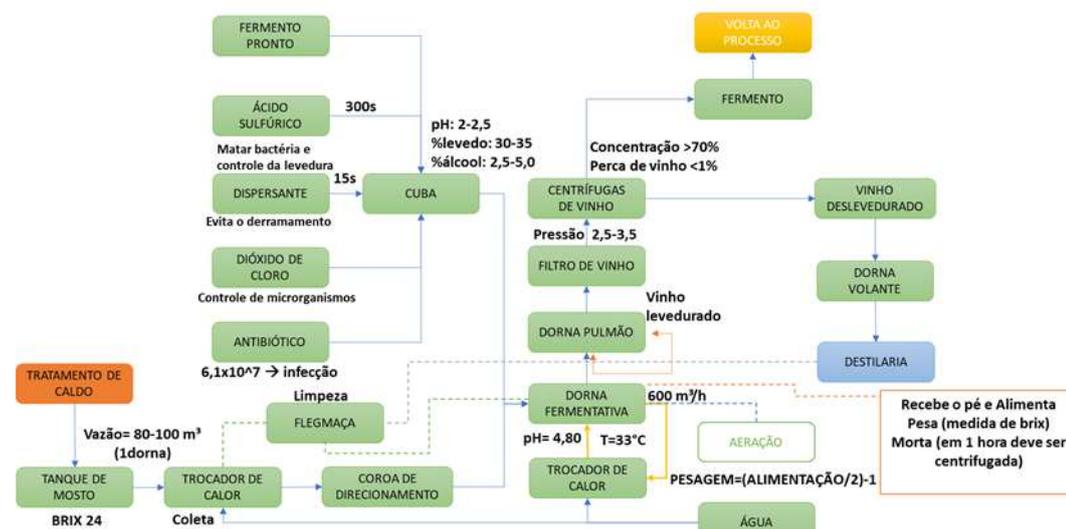
O mosto é enviado à dorna, na qual já foi adicionado o fermento, iniciando a fermentação. Durante o processo, faz-se o acompanhamento do BRIX e da temperatura do vinho em fermentação, durante esse processo ocorre intensa liberação de gás carbônico que é conduzido por tubulações a uma torre de recheio para lavagem e recuperação do álcool evaporado.

Existe o resfriamento do vinho, nos trocadores de calor contracorrente, essa etapa ocorre por causa da grande quantidade de calor liberada no processo fermentativo e de se ter a precaução e manter uma temperatura baixa, de 32°C.

O tempo de fermentação varia de 4 a 10 horas, ao final deste período todo o açúcar já foi consumido e ao considerar uma dorna “morta”, o teor médio de álcool nestas dornas é de 7% a 10%, e a mistura recebe o nome de vinho fermentado/vinho bruto.

O vinho bruto é armazenado na dorna pulmão, pelo período de no máximo 1 hora, que faz a alimentação das centrífugas. Antes do vinho bruto ser centrifugado, ele passa por filtros para retirada de impurezas vindas do caldo, tais como bagacilho/terra. Durante a centrifugação o vinho bruto é separado, por densidade, nas correntes de vinho centrifugado e creme de levedura.

O vinho delevedurado/centrifugado, ao sair das centrífugas, vai para a dorna volante, e por meio de bombeamento chega no aparelho de destilação. A levedura recuperada, antes de retornar ao processo, passa pelas cubas para receber um tratamento apropriado. Durante o tratamento, o fermento é diluído com água e ácido sulfúrico até, normalmente, pH de 1,6 a 3,0. Esta suspensão de fermento diluído e acidificado permanece em agitação e aeração de duas a quatro horas com finalidade de estimular a multiplicação, antes de retornar à dorna de fermentação. Assim, Na Ilustração 5, está disposto a fermentação para obtenção de etanol.

Ilustração 5 – Processo Fermentativo<sup>5</sup>

Fonte: A Autora, 2023

#### 4.4 Destilação

Baseada nas diferenças de volatilidade dos componentes da mistura líquida, a destilação é uma operação unitária.

Nas colunas, é utilizado vapor de vegetal de  $0,9 \text{ kgf/cm}^2$  e vapor de  $10 \text{ kgf/cm}^2$  que aquece o vinho e produz: álcool etílico hidratado; álcool etílico anidro; óleo fúsel. Como subprodutos da produção de álcool hidratado, nas colunas A e B, respectivamente, são formadas vinhaça e flegmaça.

O vinho proveniente da dorna volante, vai todo para o aparelho de destilação. Inicialmente passa no condensador para troca térmica até atingir uma temperatura de  $74^\circ\text{C}$ , e em sequência passa no trocador de calor, para haver troca térmica com a vinhaça e assim estar pronto para adentrar na coluna A.

Nesta coluna, no topo é identificado a flegma (álcool + água) e no fundo a vinhaça, porém, acima desse topo é retirado o álcool de cabeça (considerado sujo) que é direcionado até a coluna D (continuação da A). Esse vapor alcoólico que entra na coluna D, passa no

<sup>5</sup> Os blocos de cores diferentes são apenas para diferenciar os setores da usina. A cor verde é padrão para o processo descrito.

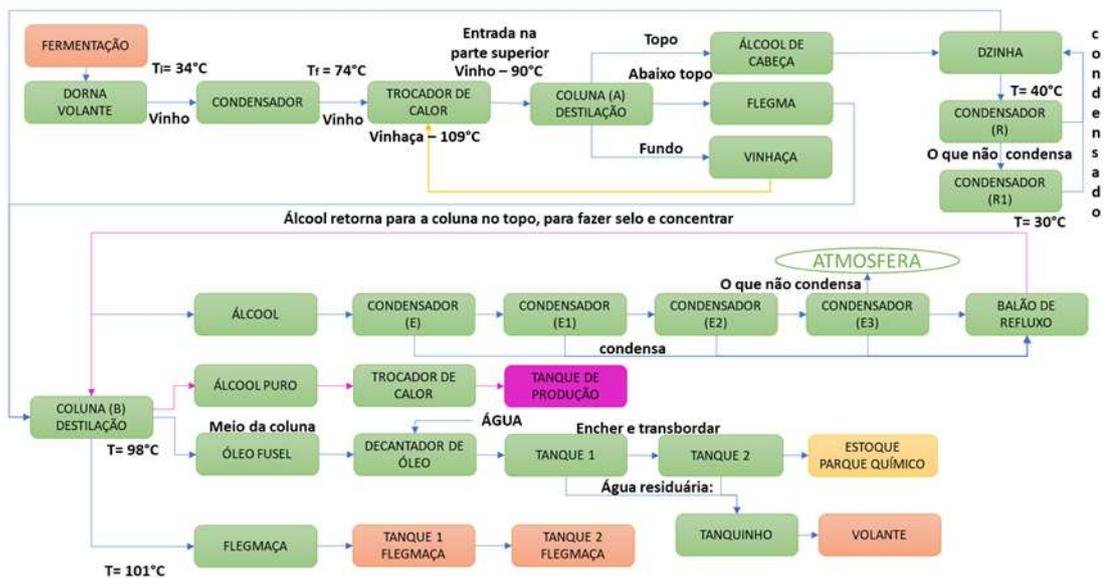
condensador R, o que não condensa, continua até o R1 e o que ainda resta, retorna para D e adentra a coluna B.

A vinhaça, após passar por um processo de resfriamento, é utilizada como fertilizante natural na irrigação de cana e a flegmaça é reaproveitada para limpeza e desinfecção das dornas para uma nova fermentação.

A coluna B é alimentada com, flegma e álcool de segunda, o seu princípio de funcionamento é basicamente, o álcool sobe através das bandejas, a água desce e no meio fica o óleo fúsel. O álcool que sai no topo passa pelos condensadores “E” e tudo que condensa vai para o balão de refluxo que devolve o álcool para a coluna no topo para fazer um tipo de selo e concentrar álcool puro em duas bandejas, que passa por um trocador de calor tipo placas, e segue para o tanque de produção; e no fundo da coluna, está a flegmaça.

O óleo fúsel, passa pelo decantador de óleo, juntamente com água, para melhor separação. Daqui ele passa no tanque 1, que transborda no 2 e vai para o estoque no parque químico. A água que sai do decantador, retorna para dorna volante. Na Ilustração 6 está o desenvolvimento da fabricação do álcool hidratado.

Ilustração 6 – Processo Álcool Hidratado<sup>6</sup>



Fonte: A Autora, 2023

Para produzir álcool anidro desidrata-se o álcool hidratado em uma coluna de desidratação, na qual o monoetilenoglicol (MEG), produto sequestrante de água, é alimentado

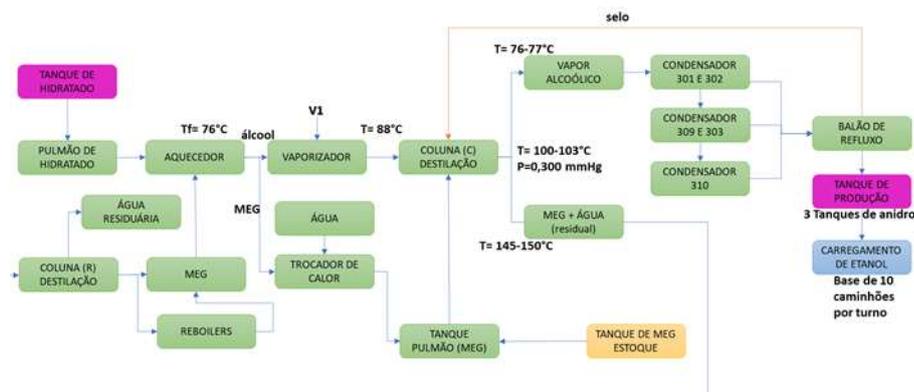
<sup>6</sup> Os blocos de cores diferentes são apenas para diferenciar os setores da usina. A cor verde é padrão para o processo descrito.

no topo da coluna e o álcool a ser desidratado é alimentado 1/3 abaixo do topo. O MEG absorve e arrasta a água para o fundo da coluna e os vapores de álcool anidro saem pelo topo.

Após sair da coluna de desidratação, o álcool anidro é condensado e enviado para armazenamento. A mistura contendo água, MEG e uma pequena quantidade de álcool é enviada para uma coluna de recuperação de MEG, onde é separada a água e o álcool contido na mistura. O álcool é reutilizado no processo de destilação de álcool hidratado, e o MEG retorna ao processo de desidratação. Na Ilustração 7, está o desenvolvimento para obtenção de álcool anidro.

Os álcoois produzidos, hidratado e anidro, são quantificados através de tanques calibrados e são bombeados para armazenagem. Destes tanques, o álcool segue por gravidade até a bomba da plataforma de carregamento, onde é carregado em caminhões.

Ilustração 7 – Processo Álcool Anidro<sup>7</sup>



Fonte: A Autora, 2023

<sup>7</sup> Os blocos de cores diferentes são apenas para diferenciar os setores da usina. A cor verde é padrão para o processo descrito.

## 5 ANÁLISE DOS RESULTADOS OBTIDOS ENTRE AS SAFRAS – ANOS 2021 E 2022

### 5.1 Importância da escolha de uma levedura adequada e a realização correta da assepsia, antes de iniciar a produção

A escolha adequada da levedura e as realizações corretas da assepsia antes de iniciar a produção são aspectos de extrema importância na indústria fermentativa. Esses processos influenciam diretamente na qualidade e na eficiência da fermentação, além de garantir a segurança microbiológica dos produtos (BURPHAN *et al.*, 2018). Neste contexto, serão observados cinco pontos que ressaltam a importância dessas práticas.

Em primeiro lugar, a escolha criteriosa da levedura é crucial para o sucesso da fermentação. Diferentes cepas de leveduras apresentam características específicas, como tolerância a diferentes condições de pH, temperatura e concentração de nutrientes. Segundo Burlani (2014) ao selecionar uma levedura correta para o processo desejado, é possível otimizar o processo fermentativo, maximizando a produção de compostos desejáveis e minimizando a formação de subprodutos tóxicos. A escolha adequada da levedura também contribui para a consistência do produto, garantindo a repetibilidade e a uniformidade das características sensoriais.

Com isso, na usina do estado de Goiás, em que foi realizado a pesquisa de campo, acontece uma escolha criteriosa com relação à levedura selecionada que iniciará a multiplicação, estando pronta para gerar o álcool. Assim, no ano de 2021, foi selecionado uma levedura do Tipo A<sup>8</sup>, e em 2022, alterou para o Tipo B<sup>1</sup>, marcas diferentes, porém com o mesmo intuito fermentativo.

Uma assepsia adequada é fundamental para prevenir a contaminação e garantir a qualidade microbiológica dos produtos fermentados. A contaminação por microrganismos pode levar à produção de compostos *off-flavors*, perda de eficiência da fermentação e riscos à saúde dos consumidores. Portanto, a realização correta da assepsia, envolvendo a limpeza e o transporte adequado de equipamentos, utensílios e ambiente de trabalho, é essencial para evitar a introdução de microrganismos e manter a integridade microbiológica durante todo o processo fermentativo (CARVALHAES, 2020).

Além disso, uma assepsia adequada antes do início da produção contribui para a esterilização dos materiais utilizados no processo fermentativo. Essa prática torna-se

---

<sup>8</sup> As leveduras do Tipo A e B não podem ser especificadas durante a análise deste trabalho

especialmente crucial em situações que envolvem o uso de técnicas assépticas, nas quais a contaminação cruzada, processo pelo qual microrganismos indesejados são transferidos de uma fonte contaminada para uma área ou substrato anteriormente livre de contaminação, pode ocorrer facilmente. Ao garantir a higiene dos equipamentos, recipientes e insumos utilizados, é possível prevenir a antecipação de microrganismos indesejáveis do tipo bactérias, leveduras e bolores, e garantir a segurança do processo, minimizando os riscos de contaminação durante a fermentação (AMARAL, 2012).

Realizando esta observação em campo, somente comprova toda teoria da literatura, pois uma assepsia que deixa de ser realizada, com condensado com temperatura mediana, abaixo de 90°C, passando pelas tubulações e tanques, pode acarretar na contaminação bacteriana, mas também deixar o processo em condições favoráveis para entrada de levedura nativa/selvagem.

A escolha de uma levedura adequada e as realizações corretas da assepsia também estão diretamente relacionadas à produtividade e à eficiência da fermentação. Uma seleção de acordo com as características do processo fermentativo pode apresentar maior resistência a condições adversas, como altas concentrações de etanol, pH ácido ou temperatura elevada. Isso resulta em um melhor desempenho da levedura durante a fermentação, com maior velocidade de fermentação, menor tempo de processamento e maior rendimento dos produtos desejados (TEIXEIRA, 2021).

### 5.1.1 Avaliação comparativa

Utilizando dados reais de safras de uma usina de produção de açúcar, álcool e bioenergia, no estado de Goiás, buscou-se neste tópico analisar questões relacionadas ao rendimento fermentativo, floculação e entrada de levedura selvagem no processo e o porquê elas permanecem no processo, comparando duas safras.

As células de leveduras que habitam nas donas fermentativas devem possuir uma ampla capacidade de suportar grandes oscilações de processo. De maneira padrão, no processo acompanhado, a levedura deve possuir desempenho excelente quando exposta a altas temperaturas, baixo pH, baixa inibição por substrato e produto, além de apresentar rendimentos satisfatórios em etanol e pouca exigência nutricional. E ainda assim, ser capaz de suportar variações da composição da matéria prima.

Uma vez que, desde a plantação da cana-de açúcar, variações de como foi a colheita, manual ou mecanizada, período de colheita, solo, pragas na lavoura, carga microbiana e forma de extração, pelo melaço com os produtos secundários (ácido lático, acético, fórmico). Esses

componentes podem fornecer condições favoráveis para o crescimento de leveduras selvagens, as quais podem competir com a levedura selecionada para o processo e afetar negativamente o rendimento fermentativo. Portanto, é essencial considerar esses fatores externos ao selecionar e ajustar as condições de fermentação, a fim de minimizar a entrada de leveduras selvagens e garantir um rendimento fermentativo consistente e de qualidade.

Os dados avaliados foram porcentagem de floculação, teor de levedo no vinho de levedurado e no creme após centrifugação, viabilidade e brotamento por análise microbiológica, teor alcoólico na cuba e no vinho, brix de alimentação (mosto), acidez sulfúrica que indica contaminação bacteriana e o rendimento fermentativo. Na Tabela 2, está indicado os valores padrão, da usina do estado de Goiás.

Tabela 2 – Valores dentro das normas padrões da usina de Goiás

Parâmetros <sup>9</sup>	Valores de Referência
Floculação %	0
Teor de levedo no vinho de levedurado %	< 1,0
Teor de levedo no creme %	75
Viabilidade %	70-95
Brotamento %	5-30
Teor alcoólico cuba - GL	3-5,50
Brix alimentação %	18-24
Teor alcoólico vinho - GL	5-12
Acidez sulfúrica g/L	1,30-2,50

Fonte: A Autora, 2023

A safra de 2021/22 teve seu início em 20/03/2021 parando a moagem para entrar na entressafra em 05/12/2021. Neste ciclo foi utilizada a levedura selecionada do tipo A, que prometia uma fermentação com alto rendimento e controle da contaminação, reduzindo perdas e custos de produção, com as seguintes características: alto teor de trealose nas células, menor formação de espuma e conseqüentemente menor uso de antiespumante, resistência a oscilação e pH, não é de característica floculante, resistente a altas temperaturas, elevado rendimento fermentativo, tolerante a altos teores de etanol, alta capacidade de predominância, mantém a

<sup>9</sup> Floculação (%): Mede a capacidade das células de levedura de se aglutinarem e formarem flocos durante o processo fermentativo; Teor de levedo no vinho de levedurado (%): Indica a porcentagem de levedura presente no vinho resultante da fermentação; Teor de levedo no creme (%): Refere-se à proporção de levedura encontrada no creme formado durante a fermentação; Viabilidade (%): Representa a porcentagem de células de levedura vivas e capazes de realizar a fermentação; Brotamento (%): Avalia a capacidade das células de levedura de formar brotos ou novas células durante o processo fermentativo; Teor alcoólico cuba - GL: Indica o teor alcoólico do líquido presente na cuba de fermentação, expresso em graus Gay-Lussac (GL); BRIX alimentação (%): Mede o teor de açúcar presente na solução alimentada para o processo fermentativo, expresso em porcentagem de sacarose; Teor alcoólico vinho - GL: Refere-se ao teor alcoólico do vinho resultante da fermentação, expresso em graus Gay-Lussac (GL); Acidez sulfúrica (g/L): Mede a concentração de ácido sulfúrico presente no mosto ou vinho durante o processo fermentativo, expresso em gramas por litro (g/L).

viabilidade alta durante a safra e possui maior velocidade fermentativa, ou seja, consome mais rápido o açúcar, altamente tolerantes ao *stress* da fermentação, persistentes, não floculam e são dominantes em relação às contaminantes e seu formato que chega até a usina é de levedura seca.

Por meio da Tabela 3, compilou-se os resultados das análises dos parâmetros da fermentação industrial, em média, durante os 10 meses da safra 21/22, utilizando a levedura A.

Tabela 3 - Resultados de dez meses da safra 21/22 utilizando a levedura A

Levedura A - 2021 <sup>10</sup>									
Mês	Floculação %	Teor de levedo no vinho delevedurado %	Teor de levedo no creme %	Viabilidade %	Brotamento %	Teor alcoólico cuba - GL	BRIX alimentação %	Teor alcoólico vinho - GL	Acidez sulfúrica g/L
Março	0,00	0,56	55,19	96,90	13,89	6,84	16,9	6,25	1,98
Abril	28,30	0,48	73,40	75,13	12,44	8,55	20,1	8,41	3,12
Mai	37,90	0,30	67,34	65,88	12,56	8,97	19,81	8,99	3,51
Junho	34,18	0,33	61,53	75,17	13,43	8,65	19,71	8,52	2,94
Julho	34,86	0,30	61,49	75,87	13,15	9,19	20,37	9,11	2,88
Agosto	34,66	0,27	58,88	74,74	12,74	9,49	20,64	9,37	2,74
Setembro	35,01	0,25	57,60	75,28	12,91	9,59	20,9	9,52	2,62
Outubro	35,05	0,23	57,17	73,35	12,59	9,54	20,87	9,45	2,66
Novembro	34,97	0,23	56,94	70,67	12,19	9,49	20,73	9,39	2,62
Dezembro	34,89	0,23	56,9	70,37	12,87	9,47	20,71	9,37	2,62

Fonte: A Autora, 2023

A safra de 2022/23 teve seu início em 06/04/2022 parando a moagem para entrar na entressafra em 16/11/2022. O uso da levedura selecionada do Tipo B nesta produção apresentou diversas características vantajosas. Entre elas, destaca-se aumento no rendimento de etanol devido à redução da via metabólica para a produção de glicerol. Esse crescimento no rendimento foi observado na faixa de 1,5 a 2,0%. Além disso, a levedura Tipo B demonstrou uma redução de 15% na produção de glicerol em comparação à levedura Tipo A.

Outro benefício da levedura Tipo B foi a sua capacidade de permanecer dominante no processo por mais de 120 dias, o dobro do tempo em relação à levedura Tipo A. Além disso, essa cepa apresentou uma velocidade de conversão três vezes maior que a levedura Tipo A. Ela também mostrou resistência a temperaturas semelhantes à levedura A, porém, apresentou uma resistência à acidez uma vez menor que a do tipo A.

A levedura Tipo B demonstrou alta resistência a choques de pH, estresse e contaminação bacteriana, além de possuir menor probabilidade de entrada de leveduras nativas indesejadas. Isso garante uma melhor cinética de fermentação. Vale ressaltar que essa cepa está disponível

<sup>10</sup> Dados de desempenho da Levedura A ao longo de 2021. Os dados incluem floculação, teor de levedo no vinho e no creme, viabilidade, brotamento, teor alcoólico na cuba, BRIX na alimentação, teor alcoólico no vinho e acidez sulfúrica.

em formato de levedura seca, facilitando o seu manuseio e aplicação no processo produtivo. É importante mencionar que essa cepa de levedura pode ser reciclada e mantida estável por vários ciclos fermentativos, resultando em um aumento contínuo no rendimento ao longo do tempo.

Os resultados da análise referente à levedura Tipo B foram registrados na Tabela 4, representando uma média ao longo dos 7 meses da safra 22/23, em que a levedura do tipo B foi utilizada.

Tabela 4 - Resultados de dez meses da safra 21/22 utilizando a levedura B

Levedura B - 2022 <sup>11</sup>									
Mês	Floculação %	Teor de levedo no vinho de levedurado %	Teor de levedo no creme %	Viabilidade %	Brotamento %	Teor alcoólico cuba - GL	BRIX alimentação %	Teor alcoólico vinho - GL	Acidez sulfúrica g/L
Abril	5,71	0,78	79,39	83,76	20,74	3,28	20,42	9,16	1,78
Maio	16,97	1,22	79,34	83,77	22,04	3,16	21,09	9,48	1,87
Junho	33,03	1,13	81,54	87,10	19,13	2,92	20,71	8,83	1,67
Julho	22,23	0,81	81,34	87,14	18,35	3,31	22,81	10,15	1,78
Agosto	20,37	0,75	76,30	78,85	15,95	3,41	24,29	11,15	1,79
Setembro	42,73	0,26	45,58	71,89	14,52	4,38	24,11	10,36	2,04
Outubro	52,61	0,13	42,98	67,87	13,26	3,95	23,76	9,57	2,16
Novembro	53,13	0,11	43,87	70,20	11,12	4,13	23,68	9,60	2,22

Fonte: A Autora, 2023

As leveduras selecionadas para o uso nas duas safras, possuem a características de não serem floculantes, porém tudo depende se terá entrada de leveduras nativas, além da contaminação microbiológica e o estresse quanto ao processo. A floculação possui grande impacto na fermentação, principalmente na centrifugação, pois os bicos da centrífuga não estão adeptos para centrifugar uma massa “pesada”, o que gera redução da concentração de levedo. Também causa redução da superfície de contato entre levedura e mosto, aumenta o tempo de fermentação, sendo necessário utilizar um maior volume de ácido, e consequências mais graves como morte de leveduras, o que inibe a fermentação e abaixa o rendimento.

A análise dos resultados nas Tabelas 3 e 4 revelam algumas considerações importantes em relação ao desempenho das leveduras ao longo dos meses de safra. Observa-se que, no primeiro mês, houve um bom desempenho em termos de floculação, especialmente com o uso da levedura A. No entanto, ao longo dos meses, foi constatada uma deterioração na floculação com o uso da levedura B. Como a análise de floculação é feita por turnos, o compilado de dados

<sup>11</sup> Dados de desempenho da Levedura B durante o ano de 2022. Os dados apresentados incluem floculação, teor de levedo no vinho e no creme, viabilidade, brotamento, teor alcoólico na cuba, BRIX na alimentação, teor alcoólico no vinho e acidez sulfúrica.

em média mostra valores alterados, de acordo com o padrão, mas, a explicação é em torno da variação dessa média, que exemplifica uma floculação acentuada.

A levedura A, manteve um padrão de até 30-35% de floculação mensal durante toda a safra, Tabela 3, indicando que a floculação esteve controlada, porém somente em maio uma alteração significativa de quase 40%, o que retrata a desconfiança da entrada de levedura selvagem de característica floculante no processo. Já a levedura B, esteve controlada no quesito floculação nos cinco primeiros meses, em média de valores no máximo 30%, Tabela 4. Porém, a partir de setembro até o final da safra, reporta-se um descontrole floculativo, com média de até 54%, com pressuposto de que a levedura selvagem de característica floculante tenha dominado o processo fermentativo.

Pela análise da acidez sulfúrica, apresentada na Tabelas 3 e 4, tem uma indicação do nível de infecção no processo. A contaminação pode ser inoculada no mosto de alimentação, água de diluição do fermento e de acordo com má assepsia das dornas, que gera incrustação e formação de biofilmes, portanto, contaminação alta acarreta maior consumo de antibióticos e ácido. Essas bactérias afetam o rendimento por conta da floculação, que gera interação entre a parede celular de bactérias e leveduras e gera produção de ácidos orgânicos, como consequência desvio de açúcar e inibição do trabalho fermentativo.

O princípio subjacente é a ação enzimática da levedura na hidrólise da sacarose, resultando no consumo de glicose e frutose. A efetividade do processo de hidrólise enzimática é afetada por condições otimizadas, incluindo fatores como temperatura, tempo, pH, carga enzimática e concentração do substrato (AZHAR *et al.*, 2017).

Esse processo também proporciona um ambiente propício para o crescimento de bactérias, que competem por nutrientes e substratos. Ao comparar as safras, observa-se um controle bacteriano mais eficiente na safra 2022/23. Por outro lado, na safra anterior, os resultados mensais indicam uma resposta inadequada aos antibióticos utilizados, o que justifica a manutenção constante da floculação no processo fermentativo.

Assim, pela comparação de safras, nota-se um melhor controle bacteriano em relação a resposta ao antibiótico utilizado como tratamento na de 2022/23, analisado nos resultados de acidez sulfúrica, Tabela 4. Já no ano de 2021, a média mensal não mostra uma boa resposta ao tratamento antibiótico, com valores de acidez sulfúrica superiores a 2,50 g/L, o que justifica a floculação constante do processo.

Após a centrifugação, tem-se de um lado saindo vinho, que vai para dorna volante, e do outro o creme que faz o processo de recirculação. Então, se tiver muito levedo no vinho ou pouco no creme significa que a centrifugação não está eficiente e está gerando perdas de

processo, além de ser justificado por conta de falha na máquina, pode ser também que o creme esteja em floculação.

Na Tabela 3 e 4, são apresentados os valores percentuais de leveduras no vinho, sendo o padrão desejável inferior a 1, conforme indicado na Tabela 2. Analisando os resultados para a levedura tipo A, observa-se que todos os meses, em média, estavam dentro do padrão estabelecido, evidenciando uma eficiente centrifugação do vinho para remoção das leveduras. Por outro lado, para a levedura Tipo B, os meses, maio e junho, apresentaram médias de perdas significativamente mais altas que o padrão 1%, com 1,22% e 1,13%, respectivamente, o que confirma o desempenho menos satisfatório nesses períodos.

Além das leveduras, as bactérias também podem estar presentes no processo de produção de etanol, sendo algumas delas importantes para a produção de subprodutos, como ácido láctico e acético, enquanto outras podem causar contaminações indesejadas, prejudicando a qualidade e rendimento da produção. Os processos microbiológicos envolvidos na produção de etanol são complexos e devem ser controlados de forma precisa para garantir uma fermentação eficiente e de alta qualidade. Alguns dos fatores que afetam o crescimento e desempenho das leveduras incluem a temperatura, pH, concentração de açúcares, presença de nutrientes, oxigênio e estresse celular (GÓES, 2018).

Assim, se tratando de análise microbiológicas, duas importantes neste trabalho são a viabilidade e brotamento, Tabela 3 e 4. O Brotamento é a forma como as leveduras se multiplicam, processo no qual na superfície da célula adulta, desenvolve-se uma pequena célula que se transformará em uma nova. O valor padrão é de 5 a 30%, dependendo de como está a demanda fermentativa, sendo assim, os dois tipos de levedura reagiram bem no quesito reprodução.

A viabilidade celular, que representa a porcentagem de células vivas em uma cultura, é um parâmetro importante na análise microbiológica. Para determinar a viabilidade, realiza-se a contagem das células e, em seguida, calcula-se a proporção em relação ao total. Geralmente, uma cultura com mais de 70% de viabilidade é considerada adequada para reutilização. No contexto da produção de etanol, os dois tipos de levedura utilizados apresentaram uma boa viabilidade, ou seja, uma alta porcentagem de células vivas em relação ao total. Isso é um indicativo positivo, pois a viabilidade celular está diretamente relacionada ao desempenho das leveduras durante o processo fermentativo.

Embora seja desafiador manter a temperatura ideal nas dornas de fermentação, que pode chegar a até 35°C, a usina em questão conseguiu obter bons resultados nesse aspecto. Mesmo em um clima localmente quente, no qual a temperatura ambiente é elevada, a usina demonstrou

eficiência em controlar a temperatura nas dornas. Isso é de extrema importância, uma vez que a temperatura é um fator fundamental para a viabilidade celular, crescimento e capacidade fermentativa das leveduras. Quanto maior a viabilidade, melhor o rendimento do processo de fermentação. O monitoramento cuidadoso da temperatura e o uso de tecnologias adequadas de controle de temperatura contribuem para otimizar a viabilidade celular das leveduras, garantindo uma fermentação eficiente e, conseqüentemente, um maior rendimento na produção de etanol.

O BRIX de alimentação varia muito com a demanda do processo, porém teve em média, nas duas safras, um padrão de 18-24% (Tabela 2). Esse BRIX, vai interferir no teor alcoólico (GL) que estará na cuba, juntamente com a eficiência da centrifugação. Um exemplo claro está nos dados de processo das Tabelas 3 e 4, onde é possível observar que a safra de 2021/2022 apresentou um teor alcoólico significativamente mais elevado em comparação com a safra de 2022/2023. A má regulação das centrífugas pode resultar em uma menor eficiência de separação dos sólidos e líquidos, levando a uma maior presença de leveduras e resíduos no vinho. Isso pode contribuir para um aumento do teor alcoólico, uma vez que mais leveduras permanecem na cuba durante a fermentação.

Portanto, ambas as cepas de levedura demonstraram capacidade de produção de álcool, como pode ser observado nas Tabelas 3 e 4, que apresentam os valores de teor alcoólico no vinho antes de entrar na dorna volante, onde aguarda para ser destilado. É importante ressaltar que esses valores médios se encontram dentro dos padrões estabelecidos pela usina localizada no estado de Goiás.

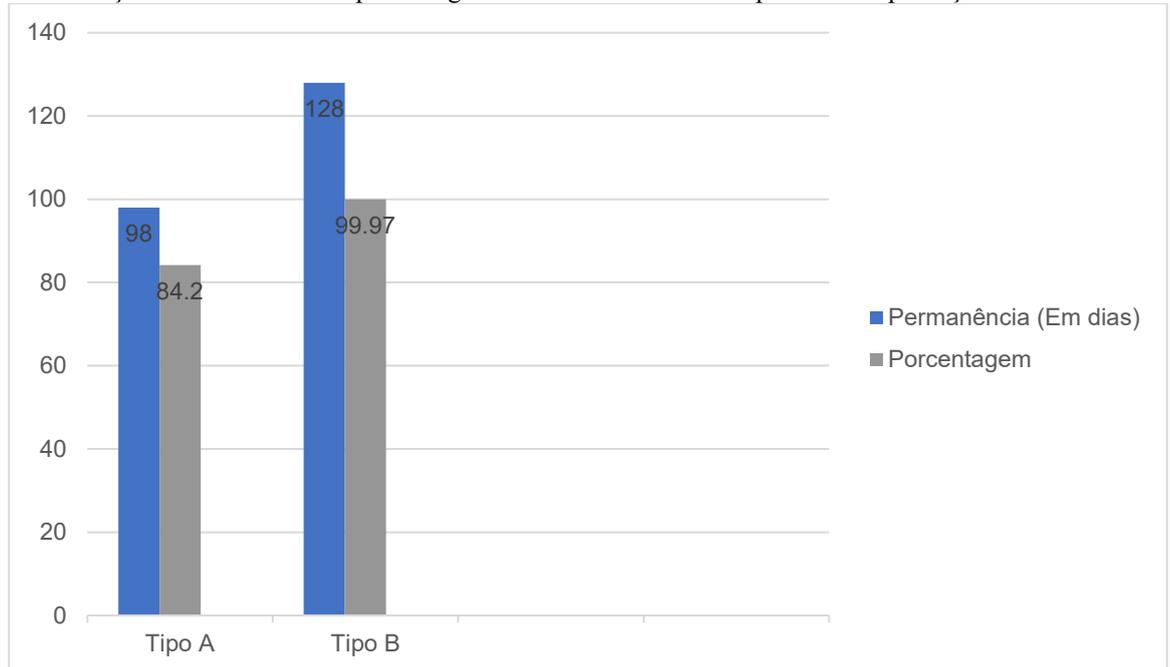
### 5.1.2 Permanência e Porcentagem das leveduras no processo de fermentação

Na Ilustração 8 foram fornecidas informações sobre a presença e a dominância da levedura selecionada ao longo do processo de fermentação, bem como o momento em que a levedura nativa passou a predominar. Essa análise é realizada por meio de dois métodos: cariotipagem, utilizado na usina em estudo, e análise do DNA mitocondrial. Durante os meses de safra em ambos os anos, foram realizadas coletas de amostras em intervalos de 15-20 dias. Essas amostras foram enviadas para um laboratório externo, uma vez que a unidade industrial não realiza esse tipo de procedimento analítico.

A análise por cariotipagem consiste na extração de uma pequena amostra do domínio de levedura, na qual os cromossomos contendo material genético são separados em um campo elétrico, gerando variações de tamanho semelhantes a um padrão digital. Essa abordagem

permite a fácil identificação e separação das diferentes leveduras presentes no processo fermentativo. Por outro lado, a análise do DNA mitocondrial envolve a extração do DNA das mitocôndrias da levedura, que é então cortado em pontos específicos utilizando enzimas de restrição (LIBERAL *et al.*, 2005). Os fragmentos de DNA resultantes são posteriormente separados em campo elétrico, possibilitando a obtenção de um tipo de código de barras de identificação único para cada levedura presente na amostra (FERMENTEC, 2018).

Ilustração 8 - Permanência e porcentagem das leveduras A e B no processo de produção do etanol



Fonte: A Autora, 2023

A levedura do Tipo A teve sua permanência exclusiva, de 84,2%, no processo por 98 dias. Com a dominância da selvagem, a partir do mês de junho de 2021, já não era possível constatar mais a Tipo A, a centrifugação já não estava mais eficiente e a levedura nativa não se adaptou as condições de processo, o que justifica o alto teor de álcool na cuba, sendo necessário levar o fermento à “morte”, sem mais recirculações e a necessidade de trazer de outra unidade o fermento de processo deles, para dar continuidade na safra, dose de fermento já multiplicado e pronto para operar o processo. Duas carretas de fermento pronto, totalizando 92.000 kg, seguindo todo o cuidado de transporte, manuseio e assepsia, deu entrada na unidade estudada dia 28 e 29 de junho de 2021. A partir dessa troca, a fermentação seguiu com eficiência e a safra foi finalizada com o fermento de outra unidade, porém da mesma marca do Tipo A.

A levedura do Tipo B teve sua permanência exclusiva, de 99,97%, no processo por 128 dias. Com a dominância da levedura selvagem de característica floculante, a partir do mês de agosto de 2022, a centrifugação já não estava mais eficiente no final da safra, visto que os valores da análise de floculação com média alta nos meses de outubro e novembro, Tabela 4, pois quando a massa está floculada, a eficiência da centrífuga diminui, por fatores de regulagem de bico e massa não homogênea. Mesmo com a entrada da levedura selvagem, foi favorável as condições do processo e a safra de 2022/23 finalizada com a nativa, que teve a capacidade de se instalar, dominar e permanecer no processo por um maior tempo.

Essa diversidade microbiana pode influenciar positivamente a qualidade final dos produtos, seguramente para a formação de compostos voláteis e metabólitos. A capacidade de autossustentação é um quarto aspecto que torna o uso de levedura selvagem favorável. Uma vez estimulado no ambiente de fermentação, a levedura selvagem é capaz de se reproduzir e manter sua presença sem a necessidade de adição regular de novas leveduras (CUNHA *et al.*, 2019).

Isso proporciona uma maior flexibilidade na produção de bebidas fermentadas, uma vez que a levedura selvagem pode se adaptar a diferentes ambientes de fermentação, como temperatura, pH e composição nutricional. Outro aspecto relevante é a contribuição para a complexidade microbiológica dos produtos fermentados. A presença de leveduras selvagens em conjunto com outras bactérias e microrganismos presentes no ambiente resulta em uma fermentação mista (VICENTE, 2015).

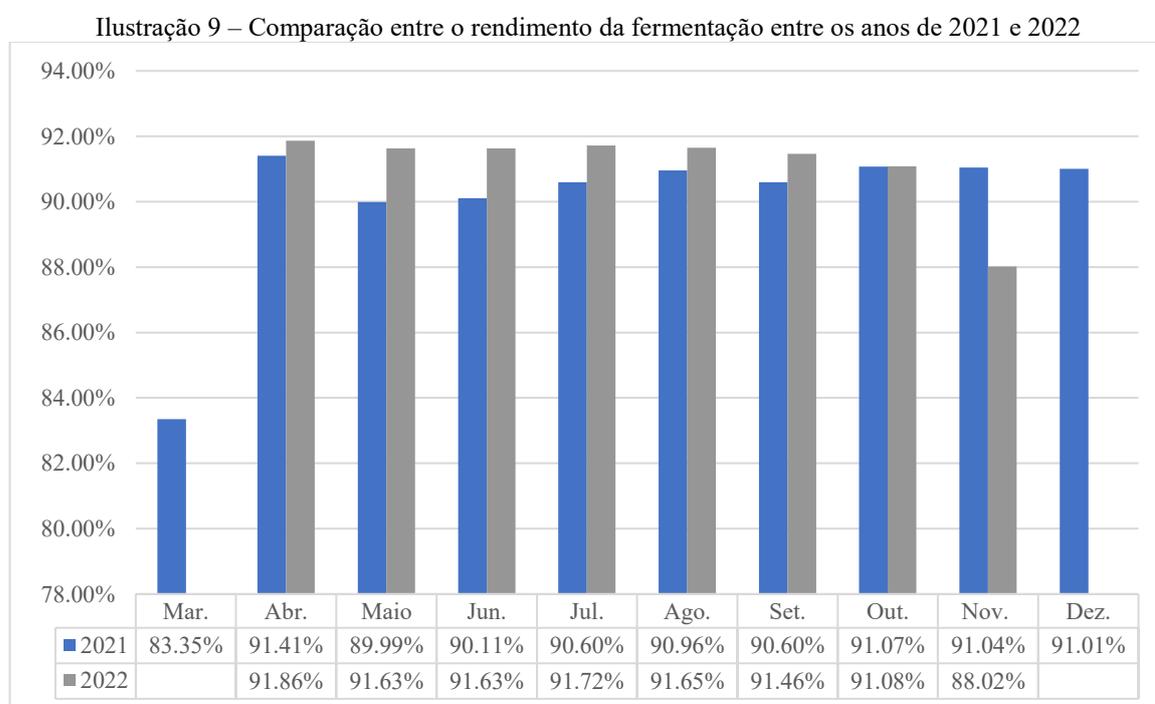
Tarefa muito difícil seria selecionar uma linhagem isolada que conseguiria persistir a todos distúrbios de processo, e isso torna-se raro unidades que trabalham apenas com um tipo de levedura. A única certeza que se tem, é que não existe uma linhagem natural capaz de prevalecer sobre as demais em qualquer tipo de processo.

Segundo Góes (2018) o rendimento do etanol é uma medida da eficiência da produção de etanol a partir da matéria-prima utilizada. Geralmente é expresso em porcentagem e representa a quantidade de etanol produzido em relação à quantidade de açúcares fermentáveis presentes na matéria-prima. O rendimento do etanol pode ser afetado por diversos fatores, como a qualidade da matéria-prima, o tipo de levedura utilizado, as condições de fermentação, entre outros. Um alto rendimento é desejado para maximizar a produção de etanol e tornar o processo mais econômico.

### 5.1.3 Rendimentos das safras nos anos de 2021 e 2022

A Ilustração 9 apresenta uma visão geral dos rendimentos médios mensais nas safras de 2021/22 e 2022/23. Com base nos números e dados discutidos anteriormente, é possível observar que a levedura do Tipo A apresentou bons rendimentos de etanol, com uma pequena queda quando a levedura selvagem não se adaptou ao processo. No entanto, ela rapidamente se recuperou e retomou um desempenho significativo. Vale ressaltar que a levedura do Tipo A demonstrou uma vantagem no rendimento de células, especialmente no processo de brotamento. Referente ao ano de 2022, é notável um excelente rendimento fermentativo, com exceção do último mês da safra, o mês de novembro. Nesse período, o rendimento foi de 88,02%, o que representa uma queda de 3,55% em relação à média dos outros sete meses. Vale ressaltar que todos esses sete meses apresentaram rendimentos acima de 91%, com uma média de 91,57%.

Esse resultado pode ser atribuído às condições da cana-de-açúcar, que podem gerar uma maior entrada de contaminantes no processo e intensificar a floculação, resultando em um desgaste mais acentuado nas centrífugas. Essa redução no padrão de centrifugação afeta diretamente a eficiência do processo e pode impactar negativamente no rendimento final.



Fonte: A Autora, 2023

Durante o ano de 2021, foram registrados rendimentos mensais de fermentação que variaram ao longo dos meses. Vamos analisar esses dados e explorar os movimentos do

rendimento, quantificar incrementos ou decréscimos e calcular as médias. Em março, o rendimento foi de 83,35%. Em abril, observamos um aumento significativo para 91,41%, representando um incremento de 8,06%. Em maio, houve uma leve queda para 89,99%, seguida por um pequeno incremento em junho, com um rendimento de 90,11%.

Os meses de julho, agosto e setembro apresentaram uma tendência de aumento gradual no rendimento de fermentação. Em julho, o rendimento foi de 90,6%, enquanto em agosto alcançou 90,96%, e em setembro atingiu 90,6% novamente. Em outubro, foi registrado um incremento no rendimento para 91,07%. No mês seguinte, em novembro, houve uma pequena queda para 91,04%, seguida por uma ligeira diminuição em dezembro, com um rendimento de 91,01%.

Calculando a média dos rendimentos mensais ao longo do ano de 2021, obtemos um valor de aproximadamente 90,77%. Essa média indica um desempenho consistente, com oscilações dentro de uma faixa relativamente estreita. Portanto, os dados mostram que, durante o ano de 2021, houve variações nos rendimentos mensais de fermentação. Alguns meses apresentaram incrementos, enquanto outros registraram decréscimos. No geral, a média dos rendimentos demonstra um desempenho estável e satisfatório. É importante continuar monitorando e analisando esses dados para identificar padrões e otimizar o processo de fermentação.

Analisando os dados e informações do processo, pode-se observar que a levedura A apresentou bons rendimentos de etanol ao longo do ano, com uma ligeira queda quando a levedura selvagem não se adaptou ao processo. No entanto, logo em seguida, houve uma recuperação significativa. Além disso, a levedura A mostrou-se mais eficiente no que diz respeito ao rendimento de células, por meio do processo de brotamento com porcentagem média de 13%, Tabela 3.

A utilização de qualquer uma das leveduras selecionadas mencionadas anteriormente pode garantir um início estável no processo de fermentação. No entanto, não há garantia de que elas dominem ao longo de toda a safra, ou pelo menos a maior parte dela. Em termos de dominância e rendimento, a levedura do Tipo B apresenta vantagens. Atualmente, tem-se discutido sobre linhagens transgênicas e leveduras líquidas que possuem maior resistência a inibidores. Essas linhagens modificadas geneticamente podem ser uma alternativa interessante para melhorar a estabilidade e o desempenho das leveduras durante o processo de fermentação.

Assim, de acordo com os resultados e segundo Cabañas *et al.* (2019), uma das estratégias de seleção de leveduras selvagens é a utilização de técnicas de enriquecimento seletivo em meio de cultura, que permitem a seleção de leveduras com características desejáveis

para a produção de etanol. Um estudo de Almeida *et al.* (2016) utilizou essa técnica para selecionar leveduras capazes de fermentar sacarose, glicose e frutose em mostos de cana-de-açúcar.

Além disso, a utilização de técnicas de recombinação genética tem sido aplicada na seleção de leveduras com características específicas para a produção de etanol. Um estudo de Sandri (2019) comenta que essa estratégia pode ser usada para selecionar uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* capaz de tolerar altas concentrações de etanol e produzir níveis elevados de etanol.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou que a escolha adequada da levedura é fundamental para o sucesso da fermentação, levando em consideração características como tolerância ao estresse, eficiência na conversão de açúcares e resistência a contaminantes. Além disso, a correta realização da assepsia foi essencial para criar um ambiente propício ao crescimento e atividade das leveduras selecionadas, minimizando o risco de contaminação. Através da análise comparativa de diferentes anos de produção durante a safra, foi possível observar os benefícios de uma fermentação de qualidade, livre de floculação e contaminação por leveduras selvagens. Essa eficiência resultou em um maior aproveitamento dos açúcares presentes no mosto, o que contribuiu para uma maior produção de etanol por unidade de matéria-prima, além de melhorar a pureza e qualidade do produto final.

Este estudo contribuiu para o conhecimento e aprimoramento dos processos de fabricação de etanol, fornecendo informações relevantes para a seleção de leveduras e a implementação de práticas adequadas de assepsia. Com base nos resultados obtidos, foi possível destacar a importância de investir em práticas de controle e monitoramento da fermentação, visando maximizar a eficiência do processo e garantir a qualidade produto.

Em relação aos objetivos propostos neste trabalho, pode-se afirmar que foram alcançados ao apresentar uma análise abrangente do processo de fabricação de etanol, enfatizando a importância da escolha da levedura adequada e da implementação de medidas de assepsia corretas. As informações e conclusões obtidas fornecem subsídios para o aprimoramento dos processos de produção de etanol, contribuindo para o desenvolvimento sustentável da usina de Goiás.

Ademais, esta pesquisa contribuiu para a compreensão dos principais aspectos envolvidos na produção de etanol e ressalta a importância de práticas adequadas para garantir a eficiência e qualidade do processo. Espera-se que as informações apresentadas possam servir como base para futuras pesquisas e melhorias na indústria de biocombustíveis, visando a maximização da produção e o desenvolvimento de processos mais sustentáveis.

## REFERÊNCIAS

- OKAMARAL, A. M. **Avaliação microbiológica de duas formas de proteção das mesas de instrumentais cirúrgico sem cirurgias limpas**. 2012. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012. DOI <https://doi.org/10.14393/ufu.di.2012.359>. Acesso em 25 de maio de 2023.
- OKAMARAL F. S. **Influência conjunta do pH, temperatura e concentração de sulfito na fermentação alcoólica de mostos de sacarose**. 2009. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.
- OKAMORIM, H. V. DE. **Fermentação Alcoólica: ciência e tecnologia**. Piracicaba: FERMENTEC, 2005, 448 p.
- OKAMORIM, H. V.; LOPES, M. L. Ciência e tecnologia na seleção de leveduras para produção de etanol. **Microrganismos em Agroenergia: da Prospecção aos Bioprocessos**. Brasília: Embrapa Agroenergia, p. 42-59, 2013.
- OKAZHAR, S. H. M. *et al.* Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and biophysics reports**, v. 10, p. 52-61, 2017.
- OKBELO, E. V. C. **Construção de uma linhagem flocculante de *Kluyveromyces marxianus* com potencial para produzir etanol**. 58f. Dissertação (Mestrado em Associações micorrízicas; Bactérias lácticas e probióticos; Biologia molecular de fungos de interesse) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.
- OKBORGES, P. C. S. **Otimização dinâmica da fermentação alcoólica no processo em batelada alimentada**. 2008. 141f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2008.
- BURLANI, E. L. *et al.* **Avaliação do potencial da levedura *Kluyveromyces Spp.* para biotransformação da lactose do soro de ricota e permeado de soro de queijo em etanol**. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Pag. 396. PPGBiotec; Biotecnologia, 2014
- OKBURPHAN, T. *et al.* Enhancement of ethanol production in very high gravity fermentation by reducing fermentation-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.
- OKCABAÑAS, K. T. *et al.* Selection of *Saccharomyces cerevisiae* isolates for ethanol production in the presence of inhibitors. **3 Biotech**, v. 9, p. 1-11, 2019.
- OKCAMARGOS, C. V. **Produção de etanol utilizando melaço de cana-de-açúcar por *Saccharomyces cerevisiae* de características flocculantes**. 2019. 99f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.
- OKCAMILOTI, P. R. **Recuperação de enxofre elementar a partir de águas residuárias em reatores anaeróbio/microaerado**. 2015. 129f. Tese (Doutorado em Ciência: Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Universidade de São Paulo e Universidad de La Frontera – Temuca, Chile, 2015

CARNERO, L. M. **Avaliação de estratégias de adaptação da levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz visando a produção de etanol.** 2011. 177f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Universidade de São Paulo, SP, 2011.

OKCARVALHAES, Fernando Goldenstein; DE ANDRADE, Leonardo Alves. **Fermentação à brasileira:** Explore o universo dos fermentados com receitas e ingredientes nacionais. Editora Melhoramentos, 2020.

OKCARVALHO, J. M.; SATO, S. **Biotecnologia Industrial: Fermentação Descontínua.** Vol. 2. Cap. 9. São Paulo – SP, Editora Edgard Blucher, 2001.

OKCOSTA, M. A. S. **Efeito do sistema de fermentação, da adição de etanol ao tratamento ácido e da contaminação por *Lactobacillus* sp na produção de etanol.** 2017. 105f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados) – Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2017.

OKCRUZ, M. L. **Avaliação de condições operacionais na fermentação alcoólica VHG empregando diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.** 2019. 119f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

OKCRUZ, M. L. *et al.* Estudo da viabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904 empregando processo fermentativo em batelada repetida. *In: COBEQ-Congresso Brasileiro de Engenharia Química.* 2014. Disponível em: <http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/1608-18452-177785.pdf>. Acesso em: 04 de maio de 2023.

OKCUNHA, L. R. R. *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.

OKELIODÓRIO, K. P. *et al.* Blocking mitophagy does not significantly improve fuel ethanol production in bioethanol yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 88, n. 5, p. e02068-21, 2022.

OKESTADÃO. **Cana-de-açúcar gera energia elétrica no Brasil.** Estadão, 2022. Disponível em: <https://summitagro.estadao.com.br/noticias-do-campo/cana-de-acucar-gera-energia-eletrica-no-brasil/>. Acesso em: 04 mai. 2023.

OKESTEVINHO, L. M. Leveduras e fermentações: O caso da cerveja. *In: RODRIGUES, M. A.; MORAIS, J. S.; CASTRO, J. P. Jornada de lúpulo e cerveja, novas oportunidades de negócio, livro de atas. Instituto Politécnico de Bragança, Bragança*, p. 53-61, 2015. Disponível em: <https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/11625/3/LivroDeActas.pdf>. Acesso em: 04 de maio de 2023.

OKFACCIOTTI, M. C. R. **Biotecnologia Industrial: Fermentação Contínua.** Vol. 2. Cap. 12. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001

OKFURTADO, T. A.; SCANDIFFIO, M. G. **Álcool no Brasil - Uma longa história.** *Scientific American Brasil*, p. 66-71, Outubro, 2006

OKFERMENTEC. **Características da produção de etanol no Brasil**. Fermentec News, 2018a. Disponível em: <https://fermentecnews.com.br/2018/01/18/caracteristicas-da-producao-de-etanol-no-brasil/>. Acesso em: 04 de maio de 2023.

OKFERMENTEC. **Fermentação, leveduras selecionadas e cariotipagem: dez perguntas e respostas**. Fermentec News, 2018b. Disponível em: <https://fermentec.com.br/2012/10/22/fermentacao/> Acesso em: 28 de maio de 2023.

OKFONTANETTI, C. S.; BUENO, O. C. **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. Bauru, SP: Canal, v. 6, p. 275, 2017.

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

OKGUIDINI, C. Z. **Fermentação alcoólica em batelada alimentada empregando *Saccharomyces cerevisiae* de características floculantes**. 2013. 148f. Tese (Doutorado em Engenharia Química: Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

OKIBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção de Cana-de-açúcar**. IGE, 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/cana-de-acucar/br>. Acesso em: 04 mai. 2023.

OKLIBERAL, A. T. S. *et al.* Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 19-23, 2005.

OKLIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. **Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. Vol. 3. Cap. 1. São Paulo – SP, Editora Edgard Blucher, 2001.

LIMA, W. J. N.; **Produção de proteínas recombinantes utilizando *Escherichia coli* em cultivos em alta densidade celular**; Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Química, Universidade Estadual de Campinas; Campinas, SP : [s.n.], 2004.

OKLINO, F. S. O. *et al.* Complex yeast–bacteria interactions affect the yield of industrial ethanol fermentation. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1498, 2021.

OKMANDUJANO, G. P. L. **Seleção e evolução dirigida de leveduras para a utilização nas indústrias do bioetanol e cervejeiras**. 2018. 83f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2018.

OKMANOCHIO, C. **Integração energética da produção de biogás em biorrefinarias de cana-de-açúcar integradas de 1ª e 2ª geração**. 2015. 73. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Alfenas – Campus Poços de Caldas, Minas Gerais, 2015.

OKMENEZES, L. H. Q.; CASTRO, R. B. R.; ROCHA, E. M. F. Identificação de leveduras selvagens de um fermento de levedo industrial durante a produção de bioetanol–um biocombustível renovável. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 1, p. 5260-5267, 2021.

OKNAVES, R. *et al.* Contaminação microbiana nas etapas de processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usina alcooleira. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, n. 11, 2010.

OKNOVACANA. **Apesar de queda em 2021, EPE acredita em potencial da bioeletricidade na década atual.** NovaCana, 2022. Disponível em: <https://www.novacana.com/noticias/apesar-queda-2021-epe-acredita-potencial-bioeletricidade-decada-atual-200522>. Acesso em: 04 de maio de 2023.

OKNOVACANA. **Exportação brasileira de etanol sobe 26,3% em 2022, para 2,43 bilhões de litros.** NovaCana, 2023. Disponível em: <https://www.novacana.com/noticias/exportacao-brasileira-etanol-sobe-26-3-2022-2-43-bilhoes-litros-120123>. Acesso em: 04 de maio de 2023.

OKNOVACANA. **Tudo sobre etanol, cana, açúcar e cogeração.** NovaCana, 2016. Disponível em: <https://www.novacana.com/>. Acesso em: 13 de abril de 2023.

OKPEREIRA, D. A.; MACRI, R. C. V.; GIMENEZ, A. Z. Fatores que afetam a fermentação alcoólica. **Ciência & Tecnologia**, v. 12, n. 1, p. 44-55, 2020.

OKPEREIRA, I. Z. *et al.* Uma breve revisão sobre a indústria sucroalcooleira no Brasil com enfoque no potencial de geração de energia. **Revista Brasileira de Energia**, v. 25, n. 2, p.111-130, 2019.

REIS, V. R. Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para produção de etanol. **Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz": Universidade de Sao Paulo. Piracicaba**, 2011.

RIBEIRO, M. V. S. **Estudo cinético da fermentação do mel de abelhas para a produção de hidromel utilizando nutriente sintético e levedura comercial de panificação.** 2019. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2019.

ROSSI, R. A. *et al.* **Isolamento e seleção de leveduras nativas dos biomas brasileiros com habilidade em fermentar a etanol açúcares não convencionais.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2009.

OKRUCHALA, J. *et al.* Construction of advanced producers of first-and second-generation ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* and selected species of non-conventional yeasts (*Scheffersomyces stipitis*, *Ogataea polymorpha*). **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 109-132, 2020.

OKSANDRI, J. P. **Obtenção e caracterização de levedura recombinante com elevada tolerância a etanol por engenharia evolutiva.** 2019. 132f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, SP, 2019.

OKSANTOS, L. D. *et al.* Continuous ethanol fermentation in tower reactors with cell recycling using flocculent *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 11, p. 1725-1729, 2015.

OKSILVA, L. A. F. **Exigências nutricionais e operacionais para a produção de etanol pela levedura IQ-Ar/45-1 a partir do melão em batelada alimentada**. 2010. 91f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010

OKSILVA, M. A. *et al.* Otimização do Processo de Fermentação Batelada-Alimentada usando Evolução Diferencial e Otimização Robusta. **Proceeding Series of the Brazilian Society of Computational and Applied Mathematics**, v. 6, n. 1, 2018.

OKSONEHO, J. L. S. **Estudo da produção de etanol de sacarose por fermentação extrativa utilizando arraste com dióxido de carbono**. 2016. 142f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2016.

OKSOUSA J. L.U; MONTEIRO R.A.B. Fatores Interferentes na Fermentação Alcoólica para a Produção de etanol. **FAZU em Revista**, Uberaba, n. 8, p. 100-107, 2011.

OKSOUSA, M. A. C.; MUTTON, M. J. R. Flocculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum* em processos industriais de fermentação alcoólica avaliada por técnica fotométrica. **Ciênc. Agrotec.**, v.28, n.4, p.893-898, 2004.

TEIXEIRA, M. L. M. **Utilização de uma planta piloto de produção de etanol para realização de aulas experimentais no curso técnico em Química do IFRN Campus Nova Cruz**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2021.

OKTOGNETE, M. H. P. B. **A influência da matéria-prima e diferentes cepas de levedura no rendimento fermentativo de um processo de obtenção de etanol**. 2017. 122f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", Campus São José do Rio Preto, São Paulo, 2017.

OKURBANO, L. H.; PINTO, P. H. M.; CABELO, C. Fermentação Alcoólica com *Saccharomyces cerevisiae* em mosto aerado de hidrolisados de amido de mandioca. **RETEC-Revista de Tecnologias**, v. 4, n. 1, p.122-141, 2011.

OKVASCONCELOS, J. N. DE. **Ethanollic Fermentation**. In: Santos, F.; Borém, A.; Caldas, C. (Ed.). **Sugarcane: Bioenergy, Sugar and Ethanol – Technology and Prospects**. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, MAPA/ACS: UFV/DEA, 2012. 568p.:Il.; 22cm – , cap. 15, p. 451-487, 2012. ISBN: 978-85-7991-058-6.

OKVELOSO, I. I. K. **Modelagem e otimização da fermentação alcoólica em batelada alimentada a baixa temperatura**. 2019. 88f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2019.

VICENTE, F. A. C. F. **Seleção, avaliação e utilização de uma levedura personalizada para a produção de etanol**. 2015. 111 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/127947>>. Acesso em 25 de maio de 2023

VICENTE, M.; BATISTOTE, M. Avaliação do potencial biotecnológico de leveduras selvagens visando a produção de etanol. **ANAIS DO ENIC**, n. 6, 2014.

OKVIDAL, M. F. Açúcar: Cenário mundial e situação da produção brasileira e nordestina. **Caderno Setorial ETENE - Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste**, v.7, n.2015, p.1-11, 2022.

OKZANARDI, M. S.; COSTA JUNIOR, E. F. Modelagem da fermentação alcoólica industrial contínua com múltiplos reatores em série. **E-Xacta**, v. 11, n. 1, p. 49-64, 2018.