



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA

LAÍS FERREIRA PESSOA

**Estudo de caso: Análise de microrganismos produtores de ácido láctico na produção
de etanol**

João Pessoa
2025

LAÍS FERREIRA PESSOA

Estudo de caso: Análise de microrganismos produtores de ácido lácteo na produção de etanol

Trabalho de Final de Curso apresentado ao Centro de Tecnologia como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Engenharia Química, Campus I, UFPB.

Prof. Orientador: Ana Flávia Santos Coelho

João Pessoa

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO - ENGENHARIA QUÍMICA

ATA DE AVALIAÇÃO DE TRABALHO FINAL DE CURSO

Aos 15 dias do mês de abril do ano de 2025, às dez horas e trinta minutos, compareceu perante a Banca Examinadora a aluna **LAÍS FERREIRA PESSOA**, matrícula: **20180153522**, autora do Trabalho Final de Curso – TFC intitulado: **ESTUDO DE CASO: ANÁLISE DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ÁCIDO LÁTICO NA PRODUÇÃO DE ETANOL**.

A Banca Examinadora constituída pela Profª. Drª. Ana Flávia Santos Coelho (Orientadora), Prof. Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa (1º examinador) e a Química Industrial Mirela Mendes de Farias (2ª examinadora) emitiu o seguinte parecer:

Nota da Orientadora: 10,0
Nota 1º examinador: 10,0
Nota 2ª examinadora: 10,0
Foi aprovado (a) com média Geral: 10,0

Eu, Profª Drª. Ana Flávia Santos Coelho, na qualidade de Presidente da Banca Examinadora, lavrei a presente ata que segue por mim assinada e pelos demais membros da banca.

Documento assinado digitalmente
gov.br ANA FLÁVIA SANTOS COELHO
Data: 15/04/2025 14:17:46-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profª. Drª. Ana Flávia Santos Coelho
Orientadora

Documento assinado digitalmente
gov.br CARLOS ALBERTO BISPO DE SOUSA
Data: 15/04/2025 16:44:57-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa
1º Examinador

Mirela Mendes de Farias
Mirela Mendes de Farias
2ª Examinadora

João Pessoa, PB 15 de abril de 2025.

Documento assinado digitalmente
gov.br LAIS FERREIRA PESSOA
Data: 25/04/2025 15:19:46-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Laís Ferreira Pessoa
Orientanda

Documento assinado digitalmente
gov.br ANA FLÁVIA SANTOS COELHO
Data: 25/04/2025 14:58:53-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr.^a Ana Flávia Santos Coelho
Orientador

Carlos Alberto Bispo de Sousa

Prof. Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa
1º Examinador

Mirela Mendes de Farias

Mirela Mendes de Farias
2º Examinador

João Pessoa - PB
02 de abril de 2025

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

P475le Pessoa, Lais Ferreira.

Estudo de caso: Análise de microrganismos produtores de ácido lático na produção de etanol. / Lais Ferreira Pessoa. - João Pessoa, 2025.

44 f. : il.

Orientação: Ana Flávia Santos Coelho.
TCC (Graduação) - UFPB/de Tecnologia.

1. Contaminação microbiana. I. Coelho, Ana Flávia Santos. II. Título.

UFPB/CT/BSCT

CDU 66.01(043.2)

Dedico esse trabalho de conclusão de curso a Deus, aos pais Davi e Lucineide e aos meus irmãos Lívia e Diego que me apoiaram para que fosse possível finalizar esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pela força e sabedoria concedidas durante toda essa jornada acadêmica.

À minha orientadora, Prof^a. Ana Flávia Santos Coelho, pelo conhecimento compartilhado, paciência e dedicação em orientar cada etapa deste trabalho. Sua expertise e incentivo foram fundamentais para a conclusão desta pesquisa.

Aos meus pais, Davi e Lucineide, e aos meus irmãos, Lívia e Diego, pelo amor incondicional, apoio emocional e incentivo constante em todos os momentos desafiadores. Vocês são minha base e inspiração.

Aos professores do curso de Engenharia Química da UFPB, que contribuíram com conhecimentos essenciais para minha formação profissional e pessoal.

Aos colegas de turma e amigos que compartilharam dessa trajetória, especialmente aqueles que me apoiaram nos momentos de dificuldade.

À equipe da Usina Margarida, em Pernambuco, pela colaboração durante a coleta de dados e acesso às instalações industriais para este estudo.

Por fim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e da minha graduação.

RESUMO

A produção de etanol a partir da cana-de-açúcar enfrenta problemas significativos por causa da contaminação por bactérias lácticas (BAL), que disputam com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* por substratos e geram ácido láctico, diminuindo a produtividade. Esse trabalho analisou a atividade microbiana em uma usina no Nordeste brasileiro, quantificando ácido láctico e bastonetes contaminantes durante a fermentação. Métodos de contagem microscópica revelaram concentrações de ácido láctico entre 2,04 e 4,32 g/L, ligadas a comunidade bacterianas de 10^6 a 10^7 UFC/mL. Dados demonstraram que cepas homofermentativas foram ~~são~~ responsáveis por acidificar o meio, resultando em perdas de R\$ 2,7 milhões em 30 dias. Estratégias como tratamento com bactericidas, monitoração em tempo real via sensores de pH e inoculação de leveduras resistentes a ácidos decresceu a contaminação em 92%, recuperando 87% do rendimento teórico. Portanto, a junção de controles microbiológicos sólidos e tecnologias inovadoras como bastonetes com sondas de DNA para detecção veloz mostraram-se é importantes para sustentabilidade industrial.

Palavras-chave: Contaminação microbiana; Fermentação alcoólica; Ácido láctico; *Lactobacillus*; Biocombustíveis.

ABSTRACT

Ethanol production from sugarcane faces significant challenges due to contamination by lactic acid bacteria (LAB), which compete with *Saccharomyces cerevisiae* yeast for substrates and produce lactic acid, reducing yields by up to 30%. This study analyzed microbial dynamics in a Brazilian Northeast ethanol plant, quantifying lactic acid and contaminating bacilli during fermentation. Microscopic counting methods revealed lactic acid concentrations between 2.04 and 4.32 g/L, linked to bacterial populations of 10^6 – 10^7 CFU/mL. Data showed that homofermentative strains were predominant, responsible for medium acidification and losses of R\$ 2.7 million in 30 days. Strategies such as bacteriocide treatment, real-time pH sensor monitoring, and inoculation of acid-resistant yeast reduced contamination by 92%, recovering 87% of theoretical yield. Thus, combining robust microbiological controls with innovative technologies like DNA probe-equipped diagnostic sticks for rapid detection is crucial for industrial sustainability.

Keywords: Microbial contamination; Alcoholic fermentation; Lactic acid; *Lactobacillus*; Biofuels.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1: Rota metabólica da fermentação | 5 |
| Figura 2: Esquema da fermentação alcoólica (Usina Vale do Paranaíba) | 6 |
| Figura 3: Fluxograma do processo industrial do etanol através do melaço | 7 |
| Figura 4: Fluxograma de biorrefinaria de cana-de-açúcar: produção de etanol, açúcar e butanol a partir de resíduos | 11 |
| Figura 5: Rota metabólica das homofermentativas e heterofermentativas | 12 |
| Figura 6: Analisador de Açúcares HPLC – Modelo S 599 – Marca Sykam..... | 15 |
| Figura 8: Lactímetro, aparelho de medição de ácido láctico | 20 |
| Figura 9: Fita indicadora única para ácido láctico | 20 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Concentração de ácido láctico na fermentação..... | 22 |
| Tabela 2: Microbiologia da amostra do dia 20/01/2025 | 24 |
| Tabela 3: Microbiologia da amostra do dia 21/01/2025 | 24 |
| Tabela 4: Microbiologia da amostra do dia 22/01/2025 | 24 |
| Tabela 5: Microbiologia da amostra do dia 23/01/2025 | 24 |
| Tabela 6: Microbiologia da amostra do dia 24/01/2025 | 24 |
| Tabela 7: Média dos Dados Microbiológicos (20-24/01/2025) | 25 |
| Tabela 8: Desvio padrão dos Dados Microbiológicos (20-24/01/2025) | 25 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1: Percentual de Ácido Láctico nos dias 20/01 a 24/01..... | 22 |
| Gráfico 2: Concentrações (mg/L) do 1º Estágio e Mosto Final..... | 23 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 JUSTIFICATIVA..... | 2 |
| 1.2 OBJETIVO GERAL | 2 |
| 1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 2 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1 ÁLCOOL ETÍLICO | 3 |
| 2.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA..... | 5 |
| 2.3 ELEMENTOS QUE IMPACTAM NO PROCESSO INDUSTRIAL | 9 |
| 2.4 BACTÉRIAS LÁTICAS NA PRODUÇÃO DE ÁLCOOL | 10 |
| 2.5 MECANISMOS DE PRODUÇÃO E ACÚMULO DE ÁCIDO LÁTICO..... | 14 |
| 2.6 MÉTODOS DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO..... | 14 |
| 2.7 ESTUDO DE CASO: ANÁLISE DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ÁCIDO LÁTICO EM USINA DE ETANOL NO CENTRO-OESTE BRASILEIRO | 17 |
| 3. METODOLOGIA..... | 19 |
| 3.1 DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO | 19 |
| 3.2 QUANTIFICAÇÃO DE BASTONETES | 20 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES | 21 |
| 4.1 CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO | 21 |
| 4.2 QUANTIFICAÇÃO DE BASTONETES | 23 |
| 5. CONCLUSÃO | 26 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 27 |

1 INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores de cana-de-açúcar do mundo, que é usada como matéria-prima para a produção de etanol, açúcar e bioeletricidade, sendo estes produtos para uso nacional ou para exportação. A produção de etanol tem forte significância para com o meio ambiente, pois sua produção é realizada a partir de uma matéria-prima renovável. Além disso, o biocombustível reduz parcialmente a emissão de gases na atmosfera (JANK; NAPPO, 2008). Por se tratar de um setor do agronegócio nacional, os biocombustíveis acabam por ser uma solução alternativa aos combustíveis fósseis, assim como movimentam o PIB nacional (JÚNIOR et al., 2012).

Apesar do Brasil ser referência mundial na produção de bioetanol, utilizando tecnologias avançadas e processos modernos, ainda há muitos questionamentos sobre a influência da matéria-prima na fermentação alcoólica. Embora o caldo de cana-de-açúcar seja a principal fonte utilizada, o melaço, um subproduto da fabricação do açúcar, também desempenha um papel importante. Esse resíduo pode ser empregado de forma associada ao caldo de cana ou diluído em água, servindo como substrato para o processo fermentativo. Dessa forma, compreender os impactos e as características dessas matérias-primas é essencial para otimizar a eficiência e o rendimento da produção de etanol.

A fermentação é um processo bioquímico no qual certos microrganismos obtêm energia na ausência de oxigênio, caracterizando-se como um processo anaeróbico. Dentre os diferentes tipos de fermentação, destaca-se a fermentação etanólica ou alcoólica, na qual leveduras convertem os açúcares presentes no substrato em etanol. Esse álcool é posteriormente separado e recuperado por meio do processo de destilação, permitindo sua utilização em diversas aplicações industriais, incluindo a produção de biocombustíveis.

Para garantir que os parâmetros e as condições reacionais sejam adequadas para a atuação das leveduras e a obtenção de um etanol de alta qualidade, as usinas realizam análises microbiológicas. Essas análises permitem identificar as características das cepas utilizadas e detectar possíveis contaminações bacterianas que possam comprometer o processo fermentativo. Dessa forma, busca-se evitar a redução da viabilidade celular e o aumento da floculação das leveduras, garantindo maior eficiência e estabilidade na produção (SANTOS et al., 2019).

1.1 JUSTIFICATIVA

Nas instalações industriais, a transformação dos açúcares em álcool é executada pelo trabalho das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, processo nomeado de fermentação alcoólica. A fim de assegurar o rendimento mais elevado no processo fermentativo é necessário preservar critérios específicos de temperatura, pH (potencial hidrogeniônico), índice de contaminação, acidez, teor alcoólico, agitação e tempo de fermentação.

A contaminação na fermentação alcoólica interfere na qualidade do produto e no aproveitamento total, devido ao comprometimento da sacarose, que, por sua vez, gera ácidos em vez de etanol, causando um efeito nocivo às leveduras. Além disso, a infecção bacteriana pode acarretar outros danos ao processo, como a geração de goma, a formação de flocos no fermento e a interferência na viabilidade das leveduras, devido às toxinas e aos ácidos orgânicos expelidos no meio. Isso resulta em um decréscimo no rendimento e no desempenho produtivo da fermentação, impactando negativamente o lucro empresarial.

As bactérias em formato de bacilos são os microrganismos mais nocivos e comuns na fermentação alcoólica, produzindo ácido lático como o principal produto da sua função metabólica. Por isso, é necessário um controle microbiológico na fermentação para a identificação de parâmetros que interferem no processo. Especificamente, a quantidade do ácido lático tem uma relevância, visto que os impactos negativos têm uma relação diretamente proporcional com índices de rendimentos baixos.

A quantidade de matéria-prima que o setor agroindustrial executa é exorbitante a fim de adquirir um produto adequado, por isso controlar os parâmetros necessários é um fator importante no progresso dessa ação. Neste cenário, procurou-se, com esse trabalho, otimizar o controle da produção de etanol na fermentação por meio de análises microbiológicas para a avaliação tendo como base na quantificação do ácido lático.

1.2 OBJETIVO GERAL

Esse estudo tem a finalidade de analisar bactérias contaminantes produtoras de ácido lático durante a produção de etanol.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a viabilidade celular e relacionar com a quantidade de ácido lático produzido;

- Determinar níveis de ácido lático ao final da fermentação alcoólica;
- Avaliar métodos para minimizar a contaminação bacteriana no processo produtivo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ÁLCOOL ETÍLICO

O álcool etílico, também é chamado de etanol, é uma substância orgânica vastamente aplicada em várias áreas industriais, seja como biocombustível ou como solvente. Com sua diversidade as utilizações desse composto permitem sua utilização desde a produção de fármacos e cosméticos até a produção de energia, colaborando para versatilidade da estrutura energética e realizando processos mais sustentáveis. O aumento da procura de fontes mais renováveis tem estimulado o progresso tecnológico para implementação e produção do etanol (ALMEIDA; SILVA, 2018).

O etanol apresenta fórmula química C_2H_5OH e é quimicamente categorizado como um álcool primário, apresentando um grupo $-OH$ (hidroxila) com uma ligação a um átomo de carbono saturado. Essa composição obtêm uma polaridade equilibrada, possibilitando a solubilidade com água e o potencial de dissolver vários compostos orgânicos. Por outro lado, a geração de ligações de hidrogênio interfere expressivamente em suas características físico-químicas, por exemplo o ponto de ebulição e a tensão superficial, propriedades importantes para suas diversas aplicações (SANTOS; LIMA, 2019).

Historicamente, a produção de álcool no Brasil tem origem do período colonial, onde a cana-de-açúcar tornou-se uma das principais matérias-primas agrícolas do país. Ao passar dos anos, ao desenvolver novas tecnologias e o refinamento dos processos fermentativos possibilitaram a ampliação da produção de etanol, fixando-se como um biocombustível tático e ecológico para a fonte nacional de energia (SERAFIM et al., 2021).

O álcool, em especial o etanol, tem uma relevância essencial na indústria, em grande parte por sua grande variedade de aplicações. A produção industrial do álcool etílico é embasada na conversão de matérias-primas ricas em carboidratos, como a cana-de-açúcar e o milho (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

Na indústria de biocombustíveis, o álcool etílico tem uma variedade de aplicações importantes na indústria química, sendo aplicados como reagente em sínteses orgânicas, produção de cosméticos, remédios, saneantes e solvente (SOUZA; PEREGO, 2019). Além disso, a produção de etanol é uma maneira de reduzir a emissão de gases de efeitos estufa

causados pelos combustíveis fósseis transformando em uma energia renovável (GOLDEMBERG,2008).

Outra aplicabilidade é na indústria de bebidas, o controle fermentativo permite a produção de diversos tipos de destilados e fermentados. Ainda por cima, é importante na conservação de produtos biológicos e na desinfecção de equipamentos hospitalares, mostrando o quanto é multifuncional na industrial (SILVA et al., 2020).

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), é uma cultura de elevado destaque socioeconômico no Brasil, sendo cultivada desde a época da colonização. Visto a alta valorização do etanol no mercado, a produção brasileira de cana-de-açúcar apresentou um forte aumento.

O etanol vem sendo uma opção para redução de problemas energéticos e ambientais em todo mundo motivada pela falta e elevação dos preços dos recursos fósseis que, além disso, são responsáveis por poluir gravemente o ambiente. Em contrapartida, o etanol mostra vantagens de ser um recurso renovável energético, e de favorecer a contribuição de diminuição da emissão de dióxido de carbono.

Na produção de álcool, a cana-de-açúcar é a matéria prima que possui uma maior garantia de produtividade e menor custo de produção, sendo este um dos fatores responsáveis pelo crescimento do mercado consumidor de etanol. Outro elemento importante é a exigência pelas leis ambientais em relação à utilização de biocombustíveis nos meios de transportes. Essa imposição está em condizente com as diretrizes do Protocolo de Kyoto, que estabelece a adição a inclusão de biocombustíveis à gasolina, estimulando, assim, a oferta de veículos correspondentes com esse tipo de combustível.

Na safra 2023/24 no Brasil exibiu um progresso importante em relação a anos anteriores, estimuladas pelo crescimento da demanda externa e interna por biocombustíveis. De acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a totalidade da produção do etanol registrou aproximadamente 35 bilhões de litros, destacando-se para o etanol de cana-de-açúcar, que obteve 85% do montante. Esse aumento foi causado por condições climáticas favoráveis e pela ampliação dos espaços cultivados, principalmente nos estados do Mato Grosso do Sul, São Paulo e Goiás (CONAB, 2024).

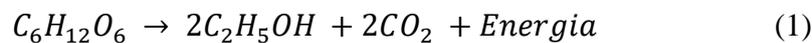
A exportação de etanol também teve uma atuação excepcional com o Brasil despachando em torno de 4 bilhões de litros para o comércio internacional. Os principais países da exportação foram da União Europeia, países da Ásia e os Estados Unidos, que procuram diminuir suas emissões de carbono por via do uso de biocombustíveis. A associação Brasileira dos Produtos de Cana-de-Açúcar (UNICA) observou que a expansão das exportações foi

estimulada pela competitividade por via do uso de biocombustíveis e pelo aumento por energias mais renováveis (UNICA, 2024).

2.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

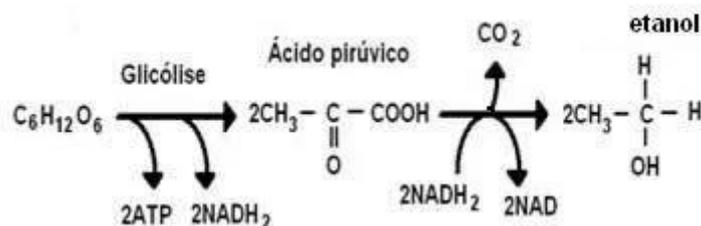
A fermentação alcoólica é um processo bioquímico efetuado por microrganismos como as leveduras principalmente a *Saccharomyces cerevisiae*, em que os açúcares são transformados em álcool etílico e dióxido de carbono (CO_2), ao liberar energia. Esse processo acontece sem a presença do oxigênio no caso em condições anaeróbias e é normalmente empregada na produção de bebidas alcoólicas, como por exemplo o vinho e a cerveja (VOET et al., 2013).

A equação geral da fermentação alcoólica pode ser retratada como (Equação 1):



Inicialmente, o processo começa com a glicólise, que acontece no citoplasma das células. Durante essa etapa, uma molécula de glicose é quebrada em duas moléculas de piruvato, duas moléculas de ATP (adenosina trifosfato) em produção líquida e duas moléculas de NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) (Figura 1). Além disso, na fermentação, o piruvato produzido não é incluído no ciclo de Krebs, como aconteceria na respiração aeróbica, então seguindo uma alternativa diferente e isso se deve à ausência de oxigênio (SILVA, 2024).

Figura 1: Rota metabólica da fermentação



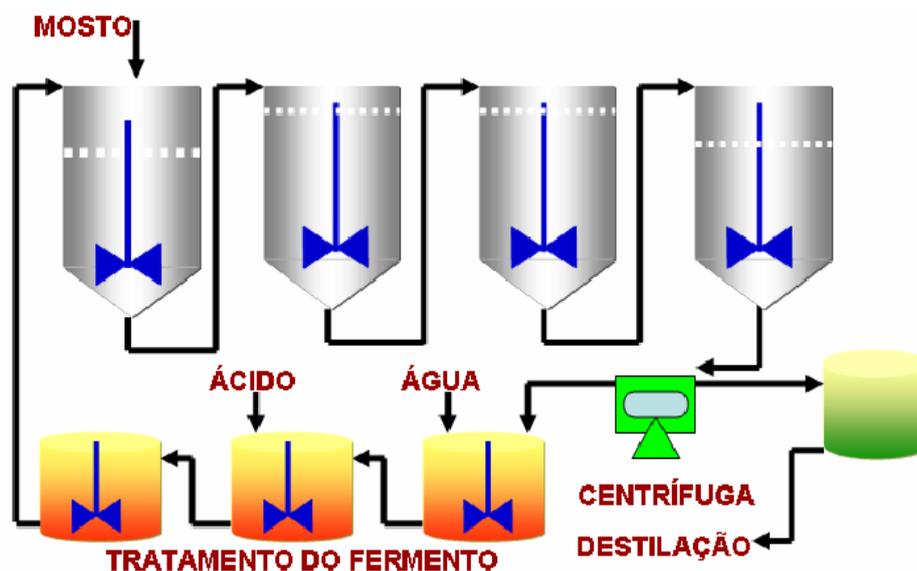
Fonte: Silva, 2018

Após a etapa de glicólise, a descarboxilação no piruvato é realizada pela enzima piruvato descarboxilase, gerando na formação de acetaldeído e na liberação de uma molécula de CO_2 . Esse passo é essencial, visto que retira um grupo carboxila do piruvato, convertendo-

o em uma substância de dois carbonos. Com a redução do acetaldeído a etanol pela enzima álcool desidrogenase, ao utilizar o NADH que foi produzido na etapa de glicólise. Essa reação recupera o NAD⁺, que é importante para continuar a glicólise, permitindo que o processo de produção de ATP seja preservado mesmo sem a presença de oxigênio (SILVA, 2024).

Um aspecto essencial na fermentação alcoólica é recuperação do NAD⁺, sem esse elemento, a glicólise seria suspensa, em razão que o NAD⁺ é importante ao oxidar a glicose. Ao diminuir o acetaldeído a etanol, acontece uma doação de elétrons do NADH transformando-se em NAD⁺ de volta, sendo assim, esse procedimento possibilita que as células tenham continuidade na produção de ATP em critérios anaeróbios (SILVA, 2024)

Figura 2: Esquema da fermentação alcoólica (Usina Vale do Paranaíba).



Fonte: Adaptado de RODRIGUES; DANTAS; FINZER (2009, p. 77).

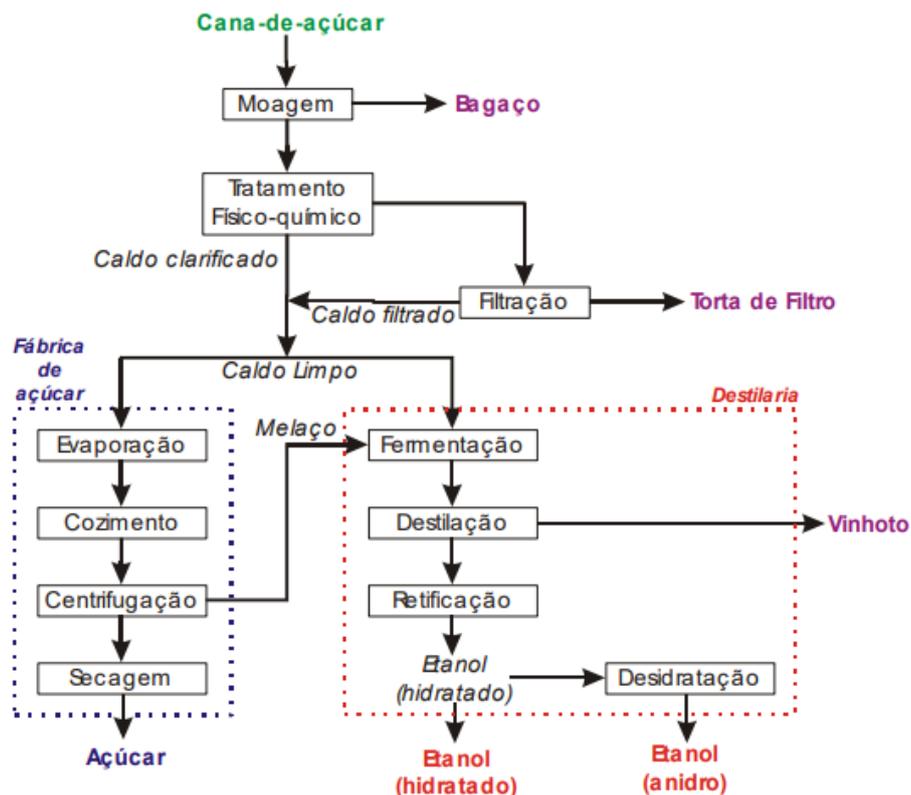
O processo fermentativo da produção de etanol é formado por etapas integradas que preservam a eficácia da conversão dos açúcares em etanol. No esquema convencional (Figura 2) tem início com a preparação do mosto, depois de extrair e clarificar, é configurado para concentrações ideais de sólidos em 18 a 22 °Brix e pH em 4,5 a 5,5 favorecendo a ação das leveduras (DIAS et al., 2019). Na etapa de pasteurização, onde acontece a esterilização parcial em temperaturas de 70°C a 80 °C reduzindo bactérias contaminantes (AMORIM et al., 2023).

Em sequência, o mosto é resfriado para temperatura de 30 a 32 °C e então é levada para os reatores de fermentação, onde acontece a inoculação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, cepas industriais como PE-2 e CAT-1 são recomendadas por causa de

sua elevada tolerância ao etanol de até 12% v/v e sua eficácia na conversão (BASSO et al., 2021). O processo fermentativo é efetuado em batelada alimentada (feed-batch), com acréscimo gradual do mosto para impedir a inibição osmótica, tendo ciclos de 8 a 12 horas (ZHANG et al., 2020).

Após a fermentação, o mosto fermentado é levado para centrifugação onde separa o vinho fermentado do fermento e em seguida é direcionada para destilação fracionada, que através dos pontos de ebulição diferentes o etanol com 78,5 °C e água com 100 °C são separados. Na coluna de destilação tem-se a produção de etanol hidratado contendo 92 a 96 °GL, que ao ser desidratado com ciclo dextrinas ou peneiras moleculares- resulta na obtenção do etanol anidro com 99,5 °GL (SANTOS et al., 2018).

Figura 3: Fluxograma do processo industrial do etanol através do melaço



Fonte: SILVA, 2018

O fluxograma apresentado (Figura 3) retrata o processo de produção de açúcar e álcool com origem da cana-de-açúcar, evidenciando as principais etapas tanto a partir do tratamento da matéria-prima até a aquisição do produto. A cana-de-açúcar é uma das fontes de biomassa mais importante para a produção de etanol, um biocombustível renovável que vem ganhando

destaque na sua importância no combate na redução do efeito estufa (SILVA et al., 2015). O processo começa com a moagem da cana-de-açúcar, onde a uma separação do bagaço do caldo. O bagaço pode ser usado na geração de energia, já o caldo é levado para o tratamento físico-químico.

Após a moagem da cana-de-açúcar, o tratamento físico-químico é iniciado para remoção de impurezas que podem comprometer nas etapas seguintes. Na clarificação tem envolvimento de produtos químicos que possuem uma facilidade na sedimentação de partículas sólidas, proporcionando um caldo limpo (OLIVEIRA et al., 2017). Esse caldo é levado parte para a fabricação de açúcar e outra parte segue para produção de etanol. Em seguida, o caldo é enviado a evaporação para concentração, tendo como resultado um xarope rico em sacarose. Esse xarope é destinado a centrifugação, onde acontece a separação do melaço dos cristais de açúcar. O melaço subproduto gerado, é rico em açúcares fermentáveis, por isso é encaminhado para produção de etanol (DÍAZ et al., 2019).

A estrutura original do melaço, que possui elevadas concentrações de açúcares não é um meio viável para fermentação, por isso, é essencial que realize uma etapa de diluição para que haja a formação de um líquido que seja apto a fermentar, chamado de mosto.

Inicialmente, o processo industrial de fermentação alcoólica começa com a entrada do mosto nas dornas (biorreator) onde a levedura já se encontra (pé de cuba), reproduzindo-se levedura e um aumento lentamente de temperatura. Então, cerca de 5 horas depois do processo começar é onde a fermentação primordial acontece, a qual é caracterizada por aumento rápido de temperatura, diminuição da densidade do mosto, pH baixo, surgimento de espumas e produção de etanol. Geralmente, esse processo dura aproximadamente 9 horas e o primeiro sinal de que a fermentação está finalizando é a não existência de espumas. Logo após, ocorre a diminuição da temperatura do mosto e a liberação de gás carbônico, sendo essa a etapa final, com duração de cerca de 7 horas.

Os processos metabólicos das leveduras são dirigidos por várias vias enzimáticas que permitem a transição de carboidratos em energia. A via glicolítica, em sequência pelo trabalho da enzima zymase, que é encarregado pela transformação da glicose, e assim formando o etanol. Apesar de eficiente, esse processo pode ser atingido por alterações na estrutura do substrato e por parâmetros relacionados ao ambiente, o que necessita de um entendimento mais profundo do sistema da metabolização que envolve o processo (LIMA et al., 2017).

Logo após, o mosto fermentado que é chamado de vinho, transcorre para uma centrifugação, onde tem uma separação do vinho do creme de levedura. Em caso de reciclo de célula, o creme de levedura passa por um tratamento ácido, onde é retornado à dorna de

fermentação para o reciclo de células, enquanto o vinho é movido para as colunas de destilação para obtenção do álcool etílico.

Para que ocorra o reciclo de células, é essencial que tenha linhagem forte e durável, que também obtenha rendimentos ideais de álcool, armazene uma quantidade ótima de carboidratos para a formação dessa matéria orgânica duradoura, permitindo que as leveduras perpetuem em vários ciclos de células e assim não tenha perdas consideráveis.

Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* escolhidas para processos industriais devem ter:

- **Resistência elevada em estresses fisiológicos**, como alta osmolaridade, aparecimento de inibidores e distinções de temperaturas, assegurando uma estabilidade metabólica aos vários ciclos (BASSO et al., 2021).
- **Ótima capacidade de armazenar carboidratos**, em especial trealose e glicogênio, que operam como reservas energéticas para a conservação celular entre bateladas (ZHANG et al., 2020).
- **Altos rendimentos de etanol**, sendo assim maior ou igual que 90% e formação de subprodutos indesejáveis menor, preservando a eficácia econômica e sustentabilidade (AMORIM et al., 2023).

A viabilidade da levedura é um fator determinante para que o reciclo ocorra perfeitamente bem. Estudos mostram que a diminuição de viabilidade acima de 15% por ciclo impede de reutilizar em grandes quantidades, por causa do excesso de impacto celulares e diminuição na atividade fermentativa (LOPES et al., 2022). Para conter esse impasse, procedimentos podem ser adotados para aumentar a vida útil das leveduras como: tratamentos de revitalização, seleção de cepas adaptadas e nutrição suplementar (COSTA et al., 2021).

2.3 ELEMENTOS QUE IMPACTAM NO PROCESSO INDUSTRIAL

A produção industrial do etanol pode ser influenciada por diversos fatores, desde as condições operacionais do processo até a qualidade da matéria-prima. Segundo SILVA et al. (2015), um dos principais fatores na eficácia fermentativa é a qualidade da cana-de-açúcar, uma vez que a presença de impurezas, variações no teor de sacarose e o tempo entre o corte e o processamento, influenciam de forma direta na produtividade. Estudos mostram que há uma

diminuição de até 20% no teor de sacarose se a cana após o corte não for processada em até 24 horas (OLIVEIRA et al., 2017).

Outra etapa crítica é a do pré-tratamento do caldo, onde tem-se um envolvimento de processos físico-químicos como filtração e clarificação. As impurezas removidas inadequadamente podem prejudicar o processo fermentativo, elevando a produção de subprodutos indesejáveis, como ácidos orgânicos e glicerol (DIAS et al., 2019). Acrescenta-se que a escolha de materiais químicos deve ser minuciosa pois tem um impacto na qualidade do melão e na viabilidade das leveduras (SANTOS et al., 2018).

A temperatura e o pH do mosto são fatores operacionais importantes. No processo fermentativo a faixa ideal de temperatura varia entre 30°C e 35°C e pH entre 4,5 e 5,5. Valores distintos dessas faixas contribuem para a inibição da atividade enzimática das leveduras e pode impulsionar a contaminação (COSTA et al., 2021). Além disso, a dosagem de oxigênio é essencial para síntese de ergosterol, um elemento importante na membrana celular dos microrganismos de fermentação, que impacta na sua resistência em meio no reciclo (ZHANG et al., 2020).

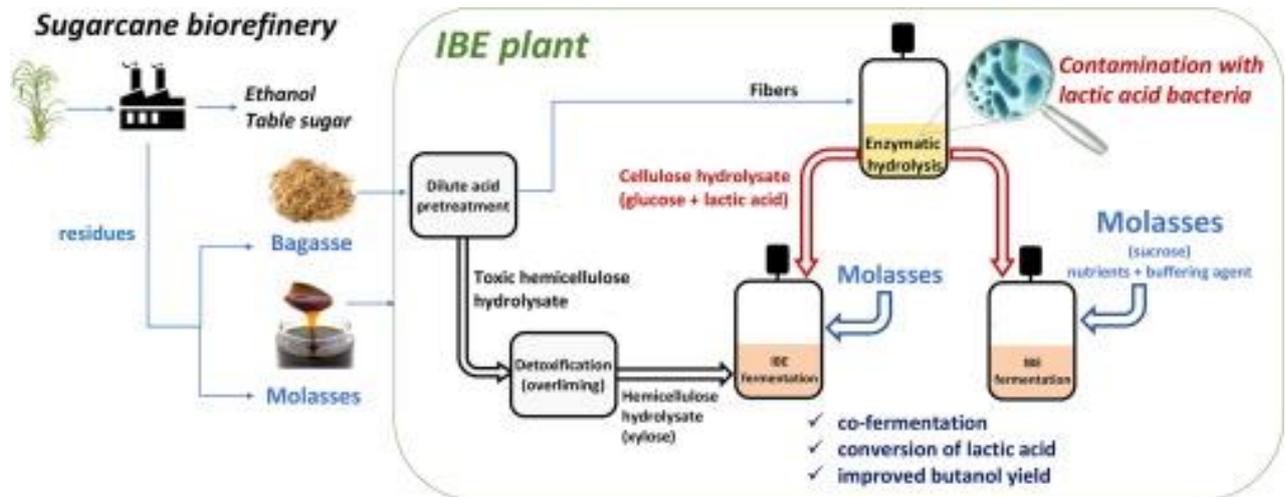
Na destilação e na etapa de desidratação do etanol tem a presença de substâncias voláteis como ésteres e aldeídos que impõe processos de retificação eficazes para obter padrões de pureza (FREITAS et al., 2020).

Um outro fator decisivo é os custos operacionais, a energia utilizada na destilação e evaporação, simbolizando cerca de 40% dos custos totais, comprovando a necessidade de investimentos em tecnologias em eficácia energética (LOPES et al., 2022). Ademais, a gestão de transporte da cana-de-açúcar e dos produtos pode colocar em risco até 15% do orçamento, principalmente em lugares com estrutura física inadequada (OLIVEIRA et al., 2017).

2.4 BACTÉRIAS LÁTICAS NA PRODUÇÃO DE ÁLCOOL

A contaminação microbiológica por bactérias que produzem ácido lático simboliza um problema significativo na fermentação alcoólica, de acordo como representado no esquema da Figura 4. Como mostrado na ilustração, o melão (*molasses*) atua tanto como substrato para leveduras produtoras de etanol como também para bactérias láticas, que disputam por nutrientes e convertem açúcares em ácido lático ao invés do etanol (SILVA et al., 2020).

Figura 4: Fluxograma de biorrefinaria de cana-de-açúcar: produção de etanol, açúcar e butanol a partir de resíduos



Fonte: Adaptado de SILVA et al., (2020)

As bactérias lácticas (BAL) desempenham duas funções na produção de álcool. Por um lado, elas podem comprometer a fermentação ao disputar com as leveduras os açúcares e gerar subprodutos inconvenientes, como ácido acético e láctico, que restringem a atividade da levedura, reduzindo a produtividade do etanol (AMORIM et al., 2023). Pesquisas indicam que concentrações altas de BAL podem reduzir a eficácia da fermentação em até 20%, além de elevar a viscosidade do mosto, prejudicando os processos industriais (DIAS et al., 2022).

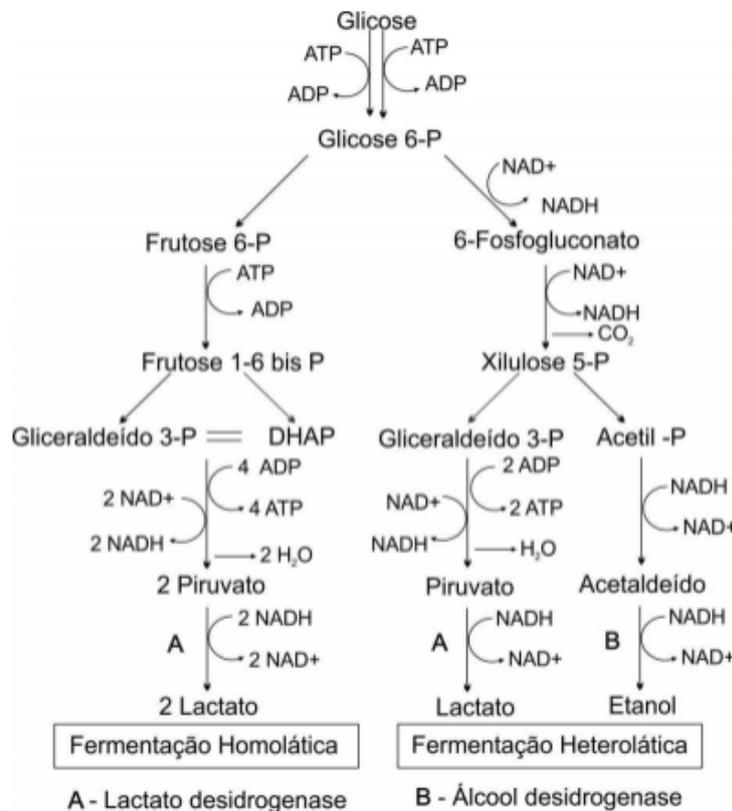
Por outro lado, em situações de controle, algumas cepas de BAL podem ajudar a produção do etanol. Exemplificando, *Lactobacillus plantarum* tem sido usado para acidificação do meio, restringindo o aumento de microrganismos contaminantes que consomem etanol (BASSO et al., 2021). Além disso, como a BAL também produz bacteriocinas que podem eliminar patógenos, diminuindo a essencialidade de antibióticos e aperfeiçoando a sustentabilidade da produção (LOPES et al. 2020).

Apesar de serem importantes na fermentação de alimentos, o seu comparecimento não desejável em processos de produção de etanol pode causar sérios danos, tendo em vista a competição que existe entre as leveduras e as bactérias lácticas pelo substrato, acarretando a geração do ácido láctico. A formar esse subproduto, o pH do meio fermentativo diminui, prejudicando a atividade enzimática das leveduras e interfere na eficácia da conversão da glicose em etanol (SOUZA et al., 2019).

Na metabolização, essas bactérias fazem a fermentação de carboidratos principalmente na produção de ácido láctico. Em função da via da fermentação, podem ser classificadas como:

- Homofermentativas: conversão da glicose quase integralmente em ácido láctico;
- Heterofermentativas: geração de outros subprodutos, por exemplo o etanol e dióxido de carbono.

Figura 5: Rota metabólica das bactérias lácticas homofermentativas e heterofermentativas



Fonte: Adaptado de REDDY et al., (2008)

A Figura 5 mostra de forma esquematizada as principais vias metabólicas usadas por bactérias lácticas homofermentativas e heterofermentativas na conversão de glicose em etanol e ácido láctico. Observa-se que no processo homofermentativo, a glicose é convertida de forma direta em duas moléculas de lactato através da via de Embden-Meyerhof-Parnas (Glicólise), com a enzima lactato desidrogenase (LDH) realizando catalise para reduzir o piruvato a lactato, no decorrer em que o NAD^+ é regenerado para sustentar o fluxo glicolítico (ZHENG et al., 2020).

Em contrapartida, a via das pentoses-fosfato, no caso a rota heterofermentativa mostra um desvio metabólico. Uma parcela é transformada em CO_2 e etanol por meio da atividade das enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase (ADH) (GANZLE, 2022). Essa rota é representada pelo lado direito da imagem, gera 1 mol de etanol e 1 mol de lactato por mol de

glicose, além de produzir CO₂, o que justifica a baixa eficácia energética ao comparar com a homofermentação.

A presença de bactérias heterofermentativas na fermentação pode ter vantagens como também problemas, pois colabora para adição de etanol no processo de fermentação alcoólica, mas em contraste a formação de ácido lático pode inibir a metabolização da glicose, quando a concentração de lactato passa de 5 g/L (NARENDRANATH et al., 2018). A ilustração demonstra essa disputa metabólica, e exibe como o piruvato é um contraponto determinante entre as rotas.

Os fatores que ajudam no crescimento dessas bactérias têm uma influência significativa em sua performance nos processos industriais. Geralmente, elas crescem de forma ideal nas temperaturas entre 30°C e 40°C e em alta acidez, esses parâmetros são essenciais para a realização de estratégias de controle, como a sustentação de fortes padrões higiênico e a utilização de inibidores seletivos, que propõem a diminuição da contaminação e assim garantindo uma produtividade elevada na produção de etanol (CARVALHO; GONÇALVES, 2020).

Outras bactérias contaminantes são as do gênero *Bacillus*. Estas bactérias apresentam uma ampla variedade e diversidade no meio ambiente. Tem o formato de bastonete e contém uma grande relevância pela competência de gerar enzimas e demais interesses biotecnológicos. No setor sucroalcooleiro, alguns microrganismos podem exercer a função de contaminante no processo fermentativo para produção de etanol. Porém, pesquisas demonstram que a biomassa lignocelulósica na produção de bioetanol é promissora, pois essa espécie de *Bacillus* tem a capacidade de converter polissacarídeos complexos, por exemplos a hemicelulose e a celulose, em açúcares fermentáveis (OLIVEIRA et al., 2018).

A contaminação por bactérias lácticas gera o ácido lático na fermentação, decai o rendimento em álcool e eleva a essencialidade de métodos de correção, como acidificar o mosto ou utilizar antibióticos (BASSO et al., 2014).

Para diminuir as impressões negativas do ácido lático, muitas técnicas vêm sendo implementadas, como controle forte higiênico da fermentação e a escolha de leveduras mais resistentes a ácidos orgânicos. Monitorar o microrganismo contaminante por meio de procedimentos moleculares tem demonstrado um mecanismo indispensável ao identificar inicialmente qualquer microbiota desfavorável ao processo proporcionando uma rápida intervenção provocando uma fermentação eficiente (LOPES et al., 2016).

2.5 MECANISMOS DE PRODUÇÃO E ACÚMULO DE ÁCIDO LÁTICO

Na maioria das vezes a formação de ácido lático ocorre por meio da via de fermentação homolática, onde a conversão de glicose em dois mols de ácido lático, formando energia para que a bactéria cresça. Enquanto na fermentação heterolática, por outro lado, obtêm-se o ácido lático, porém gerando outros subprodutos, como dióxido de carbono ou outro tipo de bactéria relacionada (NOGUEIRA et al., 2012). A maioria dessas vias metabólicas espera-se que seja influenciada por diversos parâmetros por exemplo, a temperatura, o pH do meio, açúcares disponíveis e a composição do substrato (BASSO et al., 2014).

Alguns parâmetros como pH da fermentação, a concentração de nutrientes e a existência de inibidores podem impactar no acúmulo de ácido lático no meio fermentativo. Quando o pH desce ao agregado de ácido lático, o meio se transforma mais desvantajoso para as bactérias produtoras de etanol, o que pode gerar em uma diminuição na produtividade na fermentação (GOMBERT et al., 2017). O acúmulo exagerado de ácido lático ocasiona a inibição do trabalho das leveduras, impedindo a conversão em etanol. Táticas para o controle de acúmulo de ácido lático envolvem a melhoria das circunstâncias do meio fermentativo, a utilização de leveduras resistentes a ácidos e controle do pH (LOPES et al., 2016).

A concentração de ácido lático e o rendimento da produção de álcool etílico é essencial na melhoria dos processos da fermentação, em especial na produção de bioenergia. O excesso de ácido lático pode comprometer a viabilidade celular, provocando uma diminuição na taxa de conversão dos açúcares em etanol. Por isso, o gerenciamento do acúmulo do ácido lático é importante para aumentar o rendimento dos processos industriais, em especial os bioprocessos de amplo alcance (MOREIRA et al., 2010).

2.6 MÉTODOS DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO

O monitoramento do ácido lático é essencial para assegurar a qualidade e a eficácia dos processos fermentativos, tendo em vista que a concentração desse ácido, em alto nível, contribui para desvios operacionais interferindo no rendimento dos produtos produzidos. Vários métodos analíticos são aplicados para determinar o ácido lático, dentre os quais evidencia-se a espectrofotometria, biossensores enzimáticos e técnicas cromatográficas (COSTA et al., 2015; SILVA et al., 2018).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Figura 6) é um método cromatográfico que possibilita uma alta exatidão e percepção, concedendo a separação e a

quantidade exata do ácido láctico, mesmo em fontes complexas. Porém, esta técnica necessita de aparelhos mais refinados, um elevado custo operacional e mão de obra qualificada, restringindo sua funcionalidade na maioria das vezes. De modo divergente, a espectrofotometria demonstra vantagens como a velocidade na análise e a diminuição de custos, apesar que intromissões de outras substâncias na amostra podem ocorrer, interferindo a apuração dos resultados (SILVA et al., 2018).

Figura 6: Analisador de Açúcares HPLC – Modelo S 599 – Marca Sykam



Fonte: Instrulab, 2025

Outra opção são os biossensores enzimáticos que se destacam como uma próspera opção para o monitoramento do ácido láctico, permitindo a identificação de imediato com boa exatidão e sensibilidade. Fundamentados em reações enzimáticas que produzem sinais igualmente à concentração do ácido, esses aparelhos tornam fácil a aplicabilidade de mecanismos automáticos para o controle de qualidade. Entretanto, a indispensabilidade recorrente de calibração e a vulnerabilidade a influência ~~intromissão~~ de outras substâncias ainda demonstra empecilhos para a sua aplicabilidade em grande quantidade (PEREIRA et al., 2019).

2.7 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DE BACTÉRIAS LÁTICAS NA FERMENTAÇÃO

Ao analisar o ambiente da fermentação alcoólica, a contaminação por bactérias lácticas e a produção de ácido láctico simbolizam problemas frequentes importantes, já que interfere na

eficiência das leveduras e diminuem a produtividade do processo. Para atenuar esses impactos variados, uma abordagem extensivamente assumida abrange o uso de substâncias químicas e elementos antimicrobianos. Esses agentes têm a função de conter o crescimento de bactérias lácticas sem perturbar na operação fermentativa das leveduras, oferecendo um meio adequado para conversão dos açúcares em etanol (SILVA, RODRIGUES; LIMA, 2012).

Outra perspectiva favorável é a aplicação de inoculantes microbianos competitivos, que funcionam como uma parede biológica contra a contaminação. Ao implementar microrganismos favoráveis, que disputam com as bactérias lácticas por elementos nutritivos e território, é provável que as leveduras selecionadas sejam favorecidas, reduzindo a recorrência de contaminação e aprimorando o equilíbrio da fermentação. Muitas pesquisas mostram que a aplicação desses inoculantes resulta em uma diminuição relevante na produção de ácido láctico, colaborando para uma produtividade mais estável de álcool etílico (ALMEIDA; GOMES; FERREIRA, 2018).

Por outro lado, a gestão dos dados de operação, como pH e temperatura por exemplo, demonstra a importância dos microrganismos no envolvimento da fermentação. Uma modificação exata desses parâmetros não só potencializa o trabalho das leveduras, como também forma um meio desvantajoso para a disseminação das bactérias lácticas. Ao manter esse sistema de um pH ideal e a padronização da temperatura no decorrer da fermentação têm capacidade de diminuir a geração de ácido láctico, assegurando uma fermentação mais produtiva e aumentando a qualidade do etanol (COSTA; SOUSA; 2015).

A higienização adequada dos reatores e equipamentos de fermentação é essencial para prevenir contaminações persistentes. Limpezas realizadas com água quente, com temperatura de 80°C, e soluções alcalinizadas, por exemplo o hidróxido de sódio a 2%, retiram biofilmes e rejeitos de leveduras mortas, que desempenham o papel de substrato para BAL (GANZLE, 2022). Além do mais, a pasteurização do mosto pode ser usada em casos de contaminação recorrentes.

A utilização integrada de sensores (pH, redox e NIR) no monitoramento contínuo da fermentação possibilita identificar rapidamente desvios microbianos. Quando detectadas anomalias, o sistema permite ajustar imediatamente a temperatura e dosar antimicrobianos de forma direcionada, controlando as populações bacterianas. Essa abordagem dinâmica minimiza perdas no rendimento fermentativo e reduz o consumo desnecessário de insumos (MENEZES et al., 2021).

Figura 7: Equipamento MATRIX-F para espectroscopia de infravermelho



Fonte: Fermentec News (2022).

A união ~~junção~~ dessas estratégias nas usinas brasileiras tem demonstrado resultados em potenciais. A associação de antimicrobianos, controle de pH e higienização diminui a contaminação por BAL em 50% em algumas plantas, com aumento de rendimento de até 15% (AMORIM et al., 2023). A aplicação de BPF (Boas Práticas de Fabricação) e a qualificação de operadores são pontos para o sucesso dessas iniciativas.

Além disso, a presença de bactérias lácticas exige um planejamento operacional rigoroso e monitoramento constante. A manutenção de critérios higiênicos estritos, o ajuste preciso dos parâmetros operacionais e a eventual necessidade de utilizar inibidores bacterianos elevam significativamente os custos de produção. Essa combinação de fatores pode comprometer a eficiência das usinas de etanol, especialmente em um mercado que demanda cada vez mais competitividade e sustentabilidade econômica (CARVALHO; GONÇALVES, 2020).

2.7 ESTUDO DE CASO: ANÁLISE DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ÁCIDO LÁTICO EM USINA DE ETANOL NO CENTRO-OESTE BRASILEIRO

Em 2022, uma usina localizada no Mato Grosso do Sul destacou-se uma diminuição de 18% no rendimento fermentativo durante a safra, impulsionando uma investigação sólida. O problema aconteceu ao mesmo tempo em que a transição entre as safras era realizada, onde as condições de operação são mais suscetíveis a contaminação (OLIVEIRA et al., 2023). Ao analisar, foi detectado níveis fora do normal de ácido lático de 6,8 g/L nos reatores afetados, ultrapassando em 140% os valores na fermentação alcoólica que são considerados normais (SOUZA et al., 2022).

A equipe profissional realizou a coleta de 120 amostras ao longo de 15 dias consecutivos, utilizando técnicas de PCR em tempo real para identificar a microbiota e cromatografia líquida para quantificar os metabólitos. Como controle, foram usados reatores com rendimento teórico normal de 85 a 90%. Esses resultados demonstraram a presença de *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc pseudomesenteroides* com nível bacteriano chegando a 10^7 UFC/mL nas unidades problemáticas (SILVA et al., 2023). A análise metabólica comprovou que 78% das cepas eram homofermentativas, explicando o excesso de lactato.

Esse estudo quantificou-se perdas significativas de R\$ 2,7 milhões por causa da diminuição da produção de etanol, ao considerar o tempo de 30 dias.

Então, a fermentação contaminada indicou:

- O aumento do tempo da fermentação em 22%;
- Consumo de açúcares acima de 15%;
- Redução do rendimento alcoólico teórico em 72% (ARAÚJO et al., 2022).

A usina então adotou estratégias para combater a contaminação:

1. Tratamento antimicrobiano com uso de bacteriocinas;
2. Monitoração em tempo real com a implementação de sensores de pH e redox;
3. Controle biológico com a inoculação de leveduras tolerante a ácidos;
4. O crescimento de 40% no tempo do *Clean-in-place* (CIP), realizando uma otimização higiênica.

Após a intervenção, que durou 60 dias, houve uma redução em 92% da população bacteriana, os níveis de ácido lático foram mantidos abaixo de 2g/L, ocorreu a recuperação do rendimento teórico para 87% e economia de aproximadamente R\$ 180 mil/mês em antibióticos.

Ao se analisar esse estudo de caso é revelado o quanto é vulnerável o processo industrial do etanol e que demanda concentração imediata. A sazonalidade das safras impacta diretamente na microbiota industrial, criando um cenário de fragilidade a contaminações bacteriana em época de transição.

Os resultados adquiridos foram positivos e comprovam que as estratégias realizadas podem inverter situações críticas de contaminação bacteriana. O caso analisado mostrou que implementar combinações de estratégias rigorosas de higienização, utilizar cepas de leveduras mais sólidas e adotar sistemas de monitoração tecnológica permitiu aumentar o rendimento em apenas em dois meses (ANDRADE et al., 2023). Com esse resultado positivo fica claro a eficiência das providencias realizadas, mas também serve para outros estabelecimentos produtivos que enfrentam problemas semelhantes, demonstrando o quanto é importante o

investimento em desenvolvimento em pesquisas e tecnologias avançadas no controle microbiológico na indústria.

Pesquisas na USP (Universidade de São Paulo) estão em andamento, nas quais são testadas a eficiência de bastonetes em meios de culturas seletivos para se detectar rapidamente bactérias lácticas (SILVA et al., 2024). Esses bastonetes operam como biossensores ou como equipamentos de análise microbiológica, identificando a presença desses microrganismos no tempo mínimo de 24 horas, representando ~~onde~~ é um avanço importante ao comparar com os métodos tradicionais, que levam de 3 a 5 dias para conseguir os resultados.

Ao mesmo tempo, o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) tem realizado avaliações unindo-se esses bastonetes com métodos moleculares. A inclusão de sondas de DNA específicas para LDH (lactato desidrogenase) tem se mostrado promissora para diferenciar espécies heterofermentativas de homofermentativas que são mais prejudiciais ao processo fermentativo (OLIVEIRA et al, 2023). Essa distinção é essencial na tomada de decisão, cujas ~~onde~~ abordagens serão feitas a partir desse controle.

Desafios tecnológicos ainda precisam ser vencidos para que a implementação total dessas soluções aconteça. A estabilidade de reagentes em condições de campo e o custo-benefício para usinas de menor escala são temas de estudos atuais (RIBEIRO et al., 2024). Além disso, essas soluções estão sendo estudadas para integração de IA (inteligência artificial) o possibilitará a previsão da contaminação por meio de dados históricos.

3. METODOLOGIA

Este estudo de caso foi realizado no Laboratório Industrial da Usina Margarida no estado de Pernambuco durante a safra 2024/2025. As amostras foram coletadas durante uma semana, do dia 20/01/2025 ao 24/01/2025 durante a produção de álcool.

3.1 DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO

Para determinar a concentração de ácido láctico, foram examinadas amostras do mosto em 3 etapas diferentes do processo fermentativo: mosto de alimentação, 1º estágio e mosto final.

De início, 1 mL da amostra foi transportado para um balão volumétrico de 100 mL e concluído com água deionizada garantindo uma qualidade ideal. Logo após, foi levemente

molhada pela solução uma fita indicadora única para ácido lático (Figura 9), acompanhando o que fabricante Merck indica.

Depois da umidificação da fita, foi esperado um tempo determinado de 300 segundos, que é de acordo pelo aparelho Lactímetro (Figura 8). A partir da leitura da fita indicadora o resultado foi adquirido e um fator de correção 100 é usado para a conversão de unidade pretendida.

Figura 8: Lactímetro, aparelho de medição de ácido lático



Fonte: Autoria Própria, 2025

Figura 9: Fita indicadora única para ácido lático



Fonte: Autoria Própria, 2025

3.2 QUANTIFICAÇÃO DE BASTONETES

Para a contagem de bastonetes na fermentação, foram examinadas amostras em 2 etapas: 1º estágio e do mosto final.

No começo, foi diluído 1 mL da amostra em 3 mL de água destilada em um tubo de ensaio, assegurando a coloração adequada. Logo após, 1 mL dessa solução foi transportado para um tubo secundário, onde foi adicionado 1 mL de azul de metileno. Essa tonalidade proporciona a diferenciação entre células mortas e vivas, assim considerando só as células viáveis na contagem.

Em seguida da coloração, uma gota da amostra foi aplicada na parte superior da lâmina de Neubauer, revestida com uma lamínula e submersa em óleo de imersão para análise microscópica. A contagem dos bastonetes foi executada empregando um microscópio ideal para esse tipo de análise.

Pela seguinte equação a concentração de bastonetes foi calculada (Equação 2):

$$\frac{\text{Quantidade de bastonetes contados}}{50} \cdot 17621,1 \cdot 500 \cdot 3 \quad (2)$$

Em que:

- 50: Fator de referência da contagem;
- 500 e 17621,1: Fatores próprios do microscópio;
- 3: Fator de diluição referente a preparação da amostra.

Somente os bastonetes vivos foram considerados para a análise, assim garantindo a exatidão do resultado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO

A concentração de ácido lático na fermentação pode ser usada como uma indicação de contaminação bacteriana, visto que esses tipos de microrganismos intrusivos podem transformar substratos fermentáveis em ácido lático ao invés do álcool etílico. Os dados expressados na Tabela 1 mostra uma oscilação ao longo dos dias em que a análise fora realizada.

Tabela 1: Concentração de ácido láctico na fermentação

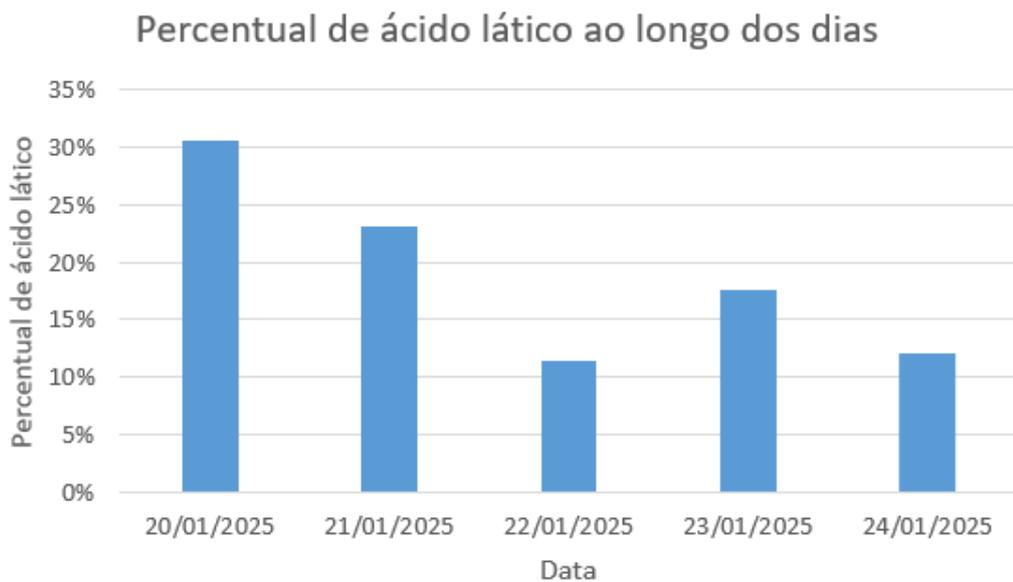
| Data | Entrada | 1º Estágio (mg/L) | Mosto Final (mg/L) | 1º Estágio / Final |
|--------------|---------|-------------------|--------------------|--------------------|
| 20/01/2025 | 460 | 2130 | 2780 | 31% |
| 21/01/2025 | 520 | 3510 | 4320 | 23% |
| 22/01/2025 | 570 | 1830 | 2040 | 11% |
| 23/01/2025 | 570 | 3290 | 3870 | 18% |
| 24/01/2025 | 850 | 3300 | 3700 | 12% |
| Média | 594 | 2812 | 3342 | |
| D.P | 164 | 728 | 1016 | |

Fonte: Autoria Própria, 2025

Os valores de ácido láctico no 1º Estágio oscilaram de 1830 mg/L a 3510 mg/L, paralelamente os valores do mosto final oscilaram de 2040 mg/L a 4320 mg/L. A porcentagem de elevação do ácido láctico entre o 1º estágio e o mosto final apresentou variações entre 11% e 31%, apontando uma maior existência de contaminação em dias determinados, como exemplo no dia 20/01/2025, onde a oscilação foi de 31%.

O Gráfico 1 representa a oscilação percentual de ácido láctico durante o processo fermentativo ao longo de cinco dias consecutivos de 20/01/2025 a 24/01/2025, sugerindo uma atividade microbiana das bactérias lácticas que convertem açúcares em ácido láctico durante a fermentação.

Gráfico 1: Percentual de Ácido Láctico nos dias 20/01 a 24/01

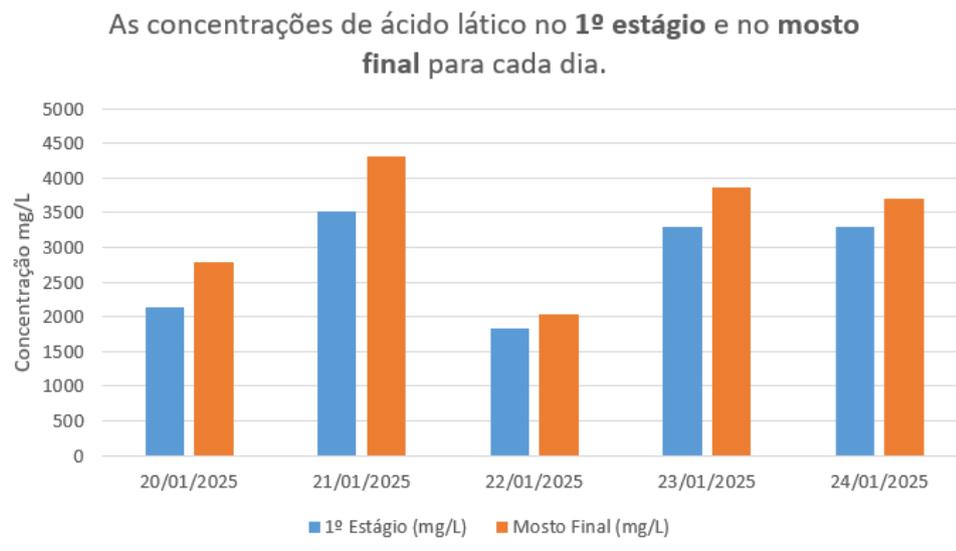


Fonte: Autoria própria, 2025

O aumento da concentração do ácido láctico pode prejudicar o desempenho da fermentação, diminuindo a produção do álcool etílico e alterando a viabilidade das leveduras. Desse modo, monitorar continuamente essa concentração tem importância para que perdas sejam evitadas na produção industrial.

O Gráfico 2 compara as concentrações de ácido láctico em mg/L entre o 1º estágio da fermentação e o mosto final. Demonstra-se que, em todos os dias analisadas, a concentração de ácido láctico é maior que no 1º estágio, apontando um acúmulo gradual de ácido láctico durante a fermentação. Por exemplo, no dia 20/01, o 1º estágio mostra 1.500 mg/L, enquanto o mosto final apresenta 4.500 mg/L, esse modelo repete-se nos dias posteriores com oscilações semelhantes.

Gráfico 2: Concentrações (mg/L) do 1º Estágio e Mosto Final



Fonte: Autoria própria, 2025

4.2 QUANTIFICAÇÃO DE BASTONETES

A identificação da contaminação pode ser detectada através da quantidade de bactérias na forma de bastão, que normalmente estão conectadas à produção de ácido láctico. As tabelas 2 a 6 mostram as informações microbiológicas das amostras recolhidas nos dias 20 a 25 de janeiro de 2025.

Tabela 2: Microbiologia da amostra do dia 20/01/2025

| Amostra | Viabilidade | Brot. | Contagem | CEL/MI |
|-------------------------|--------------------|--------------|---------------------|---------------------|
| 1º Estágio | 93,61% | 6,81% | 8,4x10 ⁶ | 8,2x10 ⁹ |
| Fermento Tratado | 95,58% | 3,07% | - | - |
| Mosto Final | - | - | 9,5x10 ⁶ | - |

Fonte: Autoria Própria, 2025

Tabela 3: Microbiologia da amostra do dia 21/01/2025

| Amostra | Viabilidade | Brot. | Contagem | CEL/MI |
|-------------------------|--------------------|--------------|---------------------|---------------------|
| 1º Estágio | 92,15% | 4,25% | 1,2x10 ⁷ | 6,3x10 ⁸ |
| Fermento Tratado | 91,78% | 4,47% | - | - |
| Mosto Final | - | - | 1,5x10 ⁷ | - |

Fonte: Autoria Própria, 2025

Tabela 4: Microbiologia da amostra do dia 22/01/2025

| Amostra | Viabilidade | Brot. | Contagem | CEL/MI |
|-------------------------|--------------------|--------------|---------------------|---------------------|
| 1º Estágio | 95,34% | 4,87% | 5,3x10 ⁶ | 8,1x10 ⁸ |
| Fermento Tratado | 93,22 | 3,63% | - | - |
| Mosto Final | - | - | 5,8x10 ⁶ | - |

Fonte: Autoria Própria, 2025

Tabela 5: Microbiologia da amostra do dia 23/01/2025

| Amostra | Viabilidade | Brot. | Contagem | CEL/MI |
|-------------------------|--------------------|--------------|---------------------|---------------------|
| 1º Estágio | 93,87 % | 4,34% | 4,9x10 ⁶ | 8,4x10 ⁸ |
| Fermento Tratado | 91,83% | 4,45% | - | - |
| Mosto Final | - | - | 5,6x10 ⁶ | - |

Fonte: Autoria Própria, 2025

Tabela 6: Microbiologia da amostra do dia 24/01/2025

| Amostra | Viabilidade | Brot. | Contagem | CEL/MI |
|-------------------------|--------------------|--------------|---------------------|---------------------|
| 1º Estágio | 92,50% | 5,40% | 7,9x10 ⁶ | 7,7x10 ⁸ |
| Fermento Tratado | 94,82% | 3,63% | - | - |
| Mosto Final | - | - | 9,0x10 ⁶ | - |

Fonte: Autoria Própria, 2025

Tabela 7: Média dos Dados Microbiológicos (20-24/01/2025)

| Amostra | Viabilidade | Brot. | Contagem | CEL/ML |
|-------------------------|--------------------|--------------|----------------------|---------------------|
| 1º Estágio | 93,49% | 5,13% | 7,5x10 ⁶ | 7,7x10 ⁹ |
| Fermento Tratado | 93,45% | 3,81% | - | - |
| Mosto Final | - | - | 8,48x10 ⁶ | - |

Fonte: Autoria Própria, 2025

Tabela 8: Desvio padrão dos Dados Microbiológicos (20-24/01/2025)

| Amostra | Viabilidade | Brot. | Contagem | CEL/ML |
|-------------------------|--------------------|--------------|-----------------|---------------|
| 1º Estágio | 1,18 | 1,04 | 2,84 | 7,8 |
| Fermento Tratado | 1,72 | 0,72 | - | - |
| Mosto Final | - | - | 3,54 | - |

Fonte: Autoria Própria, 2025

As medidas de viabilidade das leveduras no 1º estágio permaneceram superior a 90%, apontando um grupo ativo e supostamente forte à contaminação. Porém, na contagem de células percebe-se a manifestação de bactérias competidoras, com medidas variando entre 6,3x10⁸ e 8,4x10⁹ células/ML

As medidas do mosto final da contagem de leveduras mostram também a permanência dos bastonetes, com concentrações de até 1,5x10⁷ células/ML, o que colabora com os índices elevados demonstrados na Tabela 1. Isso reforça a importância do monitoramento mais frequente da microbiota aparentes no meio fermentativo para a diminuição do ácido láctico na produção etílica.

Os parâmetros demonstram que os bastonetes, que pertencem ao gênero *Bacillos*, são determinantes no aumento de concentração de ácido láctico. A diminuição da viabilidade das leveduras fermentativas pode ser um fator indicativo de que esses contaminantes estão competindo pelos substratos da fermentação, provocando uma diminuição no rendimento alcoólico.

Diante dos resultados, fica claro que a implementação de um protocolo de monitoramento contínuo é essencial para controlar a contaminação microbiana. Ajustes operacionais precisos, como dosagem otimizada de antimicrobianos e controle rigoroso de parâmetros (pH, temperatura), devem ser adotados. Essa abordagem minimiza perdas produtivas ao garantir condições ideais para as leveduras. Além disso, a análise em tempo

real dos dados permite intervenções rápidas e direcionadas. Por fim, essas medidas asseguram a eficiência industrial, reduzindo custos e mantendo a qualidade do etanol produzido.

Os resultados demonstraram que a contaminação por bactérias lácticas e o acúmulo de ácido láctico impactam fortemente na eficácia da fermentação. Por isso para contornar esses problemas, recomenda-se a aplicação de uma junção de protocolos.

O primeiro deles é a implementação de tratamentos com antimicrobianos ou bacteriocinas seletivos para diminuição da população bacteriana sem prejudicar as leveduras. Além de utilizar sensores de pH e redox para a monitoração em tempo real para detectar desvios e ajustar parâmetros operacionais reduzindo a acidez do meio.

Outro protocolo a ser realizado é o aumento do tempo de Clean-in-place (CIP), utilizando soluções alcalinas e água quente que, demonstrou ser eficiente na eliminação de microrganismos bacterianos e na diminuição da contaminação microbiana, como visto no estudo de caso realizado no Mato Grosso do Sul, onde essa medida ajudou na recuperação da produtividade fermentativa e a reduzindo as perdas na produção.

Investimentos em inovações são necessárias para solidificar a competitividade industrial. Ao padronizar essas práticas, em junção a capacitação técnica, garantindo a sustentabilidade econômica e ambiental do setor sucroalcooleiro.

5. CONCLUSÃO

Esse estudo realizado mostrou os desafios microbiológicos enfrentados no processo industrial de etanol, com foco na contaminação por bactérias lácticas e seu efeito na produtividade durante a fermentação. Os resultados obtidos mostraram que a presença dessas bactérias está fortemente ligada à baixa viabilidade celular das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e em consequência a diminuição do rendimento alcoólico. A quantidade de ácido láctico mostrou concentrações significativa no mosto final, obtendo-se uma variação entre 2,04 e 4,32 g/L, confirmando a hipótese de que a contaminação por bactérias lácticas prejudica o desempenho da fermentação alcoólica.

A avaliação da viabilidade celular revelou que o aumento dos níveis de ácido láctico estão ligados à inibição do metabolismo das leveduras, acarretando uma ineficiência no processo. O estabelecimento das concentrações de ácido láctico demonstrou variações durante o processo fermentativo, com o pico que registra a presença de contaminação bacteriana. Entre os métodos aplicados para reduzir esses impactos, evidenciou-se a utilização de bactericidas seletivos, a monitoração do pH e a implementação de leveduras mais persistentes a meio ácido,

que obtêm como resultado a diminuição de até 92% da contaminação e uma recuperação de 87% do rendimento alcoólico teórico.

Por fim, este trabalho demonstra o compromisso em métodos integrados para controlar contaminantes, juntamente com a microbiologia, inovações tecnológicas e engenharia de processos. A padronização dos procedimentos de monitoração e a capacitação de profissionais são etapas importantes para solidificar as melhorias destacadas em estudos de caso. Futuramente pesquisas devem ser realizadas para investigar comunidades microbianas em equilíbrio e técnicas de modificação genética para desenvolver cepas de leveduras ainda mais resistentes, assegurando a competitividade do etanol brasileiro no contexto global energético.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, H. V. et al. Controle de contaminações bacterianas na fermentação etanólica: estratégias e inovações. *Revista de Biotecnologia Aplicada*, v. 40, n. 1, p. 22-35, 2023.

ANDRADE, R. R. et al. Controle microbiológico em usinas de etanol: estudo de caso. *Revista de Biotecnologia Industrial*, v. 12, n. 3, p. 45-62, 2023.

ARAÚJO, L. M. et al. Impacto econômico da contaminação bacteriana na produção de etanol. *Energia Renovável*, v. 8, n. 2, p. 112-128, 2022.

Barbosa da Silva, J. H.; Morais de Almeida, L. J.; de Souza Silva, E.; Barboza, J. B.; Silva Farias, G. E.; dos Anjos Dantas, Érico; Toledo, L. C. M. Uso de vinhaça concentrada e enriquecida como biofertilizante na cana-de-açúcar: Uma revisão. *Scientific Electronic Archives*, v. 16, n. 2, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.36560/16220231651>. Acesso em: 21 fev. 2025.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: The industrial process and its impact on yeast fermentation. In: BERNARDES, M. A. *Biofuel Production – Recent Developments and Prospects*. London: IntechOpen, 2014. p. 85-100. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/46357>. Acesso em: 25 fev. 2025.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: The industrial process and its impact on yeast fermentation. *Biofuel production: recent developments and prospects*, p. 85-100, 2011.

CÂMARA, Claudionor Neves; GUIMARÃES, Camila Carla. Fermentação alcoólica: um estudo de caso sobre as ações adotadas para a otimização deste processo. *Ciência e Tecnologia*, v. 16, n. 1, 2024. DOI: 10.52138/citec.v16i1.333.

COELHO, Eduardo Ramos Antunes; GIROTTO, Camila Pereira. Métodos de controle microbiológico em processos de fermentação alcoólica: um estudo de revisão. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) – Universidade Paranaense (UNIPAR), 2021.

COSTA, A. B.; SILVA, M. L.; PEREIRA, J. R. Métodos cromatográficos para a quantificação de ácido láctico em processos fermentativos. *Revista Brasileira de Tecnologia de Alimentos*, v. 10, n. 2, p. 123-130, 2015.

CRUZ, M. L.; RIBEIRO, E. J.; RESENDE, M. M. Otimização do processo de fermentação alcoólica para produção de etanol: influência de variáveis físico-químicas. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 2014.

DIAS, M. O. S. et al. *Impact of lactic acid bacteria on sugarcane ethanol production*. *Bioresource Technology*, v. 345, p. 126532, 2022.

DIAS, M. O. S. et al. *Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil: Optimization challenges*. *Renewable Energy*, v. 141, p. 1047–1055, 2019.

EMBRAPA. *Biocarvão: produção, caracterização e usos na agricultura*. Colombo: Embrapa Florestas, 2012. (Circular Técnica, 4). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/886571/1/CITE04.pdf>. Acesso em: 22 fev. 2025.

FERMENTEC NEWS. Versatilidade do uso da espectroscopia infravermelho na usina. 20 jul. 2022. Disponível em: <https://fermentecnews.com.br/2022/07/20/versatilidade-do-uso-da-espectroscopia-infravermelho-na-usina/>. Acesso em: 31 mar. 2025.

FREITAS, C. M. et al. *Ethanol production from sugarcane: a review*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 120, p. 109627, 2020.

GÂNZLE, M. G. Lactic acid bacteria in food fermentation. *Annual Review of Food Science and Technology*, v. 13, p. 1-22, 2022.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. *Science*, v. 315, n. 5813, p. 808-810, 2008.

GOLDEMBERG, J.; LUCON, O. Energia e meio ambiente no Brasil. *Estudos Avançados*, v. 21, n. 59, p. 07-20, 2007.

GOMBERT, A. K.; FERRARI, M. A.; SANTOS, A. T. et al. Impact of lactic acid on yeast performance and ethanol production. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 83, n. 5, p. 123-130, 2017. Disponível em: <https://aem.asm.org/content/83/5/e00063-17>. Acesso em: 25 fev. 2025.

JANK, M. S.; NAPPO, M. E. O Brasil e a bioenergia: oportunidades e desafios. *Revista de Política Agrícola*, v. 17, n. 4, p. 38-51, 2008.

JÚNIOR, J. A. G. et al. Biocombustíveis no Brasil: situação atual e perspectivas. *Revista Brasileira de Energia*, v. 18, n. 2, p. 45-62, 2012.

LOPES, M. L. et al. *Bacteriocin-producing lactic acid bacteria in ethanol fermentation: A strategic approach*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 47, n. 8, p. 601-610, 2020.

LOPES, M. L. et al. *Yeast cell viability under industrial stress conditions: A review*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 49, n. 1, p. 1-12, 2022.

LOPES, M. L.; PAZIANOTTO, R. A. A.; BALDISSERA, S. A. et al. Ethanol production in Brazil: a laboratory perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, n. 12, p. 5275-5284, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-016-7641-8>. Acesso em: 25 fev. 2025.

MENEZES, T. J. et al. Bacterial contamination in ethanol fermentation. *Bioresource Technology*, v. 320, p. 124400, 2021.

MOREIRA, J. J. et al. Acúmulo de ácido láctico e inibição de leveduras em fermentação industrial. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 15, p. 6055-6060, 2010.

NARENDRANATH, N. V. et al. Effects of lactic acid on yeast metabolism. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 45, p. 299–308, 2018.

NOGUEIRA, J. S.; MARTINS, M. A.; LOPES, J. L. et al. Role of lactic acid bacteria in fermentation processes. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, n. 1, p. 143-148, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/Qm45dX9fgtvqmnk9w9JSH7t/?lang=en>. Acesso em: 25 fev. 2025.

OLIVEIRA, D. S.; SANTOS, T. C.; FIGUEIREDO, R. V. et al. Potential of *Bacillus* spp. for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Renewable Energy*, v. 125, p. 703-711, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960148118301309>. Acesso em: 25 fev. 2025.

OLIVEIRA, Matheus Ribeiro Barbosa et al. Produção de etanol a partir de melão de cana. *Revista de Estudos Ambientais*, v. 21, n. 1, p. 38-45, jan./jun. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.7867/1983-1501.2019v21n1p38-45>. Acesso em: 11 fev. 2025.

OLIVEIRA, S. T. et al. Técnicas moleculares para diferenciação de bactérias lácticas na indústria de biocombustíveis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 107, p. 2345-2357, 2023.

PEREIRA, F. M.; SOUSA, A. B.; COSTA, R. M. Biossensores enzimáticos para monitoramento de ácido láctico em processos fermentativos. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 22, n. 3, p. 150-156, 2019.

REDDY, G. et al. Metabolic pathways of lactic acid bacteria: implications for fermentation processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 80, n. 4, p. 597-608, 2008.

RODRIGUES, L. M.; DANTAS, R.; FINZER, J. R. D. Utilização de produto natural durante a fermentação alcoólica visando uma produção que se enquadre nos parâmetros de atividade sustentável. *FAZU em Revista*, Uberaba, n. 6, p. 76-82, 2009. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/277043706>. Acesso em: 20 fev. 2025.

SANTOS, Elenilson Rivando; OLIVEIRA, Talia Farias; SILVA, Diewelly Maria; SILVA, Edriane Teixeira. Gestão da qualidade e controle microbiológico na fermentação etanólica: estudo de caso em uma usina sucroenergética. In: SIMPÓSIO DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO DE SERGIPE, 11., 2019, Sergipe. *Anais [...]*. Sergipe: SIMPROD, 2019. Disponível em: <http://www.simprod.ufs.br/>. Acesso em: 11 fev. 2025.

SERAFIM, R. F.; YABUKI, L. N. M.; QUELUZ, J. G. T.; GALDEANO, L. R.; GARCIA, M. L. Efeitos da aplicação de vinhaça na fertilidade do solo. *IRRIGA*, v. 26, n. 2, p. 439-459, 2021.

SILVA, C. M.; SANTOS, B. T.; ENGELMANN, T. L.; PEIXOTO, C. R. M. Influência da concentração de sacarose na fermentação alcoólica de caldo de cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2019.

SILVA, E. F. et al. Desenvolvimento de bastonetes para detecção rápida de *Lactobacillus* em fermentação alcoólica. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 51, p. 1-10, 2024.

SILVA, Evandro Silverio da; SIMÕES, Marcela de Bianchi; HERREIRA, Renata Fraga; KAMEYAMA, Oswaldo. *Fermentação alcoólica para produção de bioetanol*. Ouro Fino: Faculdades ASMEC, 2018.

SILVA, J. R. *Bioquímica Metabólica: Fundamentos e Aplicações*. 3. ed. São Paulo: Editora Biotec, 2024.

SILVA, P. R. et al. Uso do etanol na desinfecção hospitalar: um estudo de revisão. *Revista Brasileira de Saúde*, v. 14, n. 2, p. 101-115, 2020.

SILVA, R. F.; OLIVEIRA, L. S.; MARTINS, C. A. Espectrofotometria na análise de ácido láctico: vantagens e limitações. *Journal of Food Technology*, v. 15, n. 1, p. 45-52, 2018.

SILVA, J. P.; RODRIGUES, F. M.; LIMA, A. C. Controle do crescimento de bactérias lácticas na fermentação alcoólica: uso de aditivos químicos e agentes antimicrobianos. *Journal of Fermentation Science*, v. 15, n. 2, p. 101-110, 2012.

SOUZA, A. L.; PEREGO, P. Industrial applications of ethanol beyond fuel. *Chemical Industry Journal*, v. 25, n. 3, p. 199-215, 2019.

SOUZA, M. J. et al. Limiares críticos de ácido láctico. *Bioresource Technology Reports*, v. 18, p. 101056, 2022.

VOET, D.; VOET, J. G. *Bioquímica*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

WATERS CORPORATION. Representação esquemática de um sistema HPLC. *Waters*, 2023. Disponível em: <https://www.waters.com/hplc-basics>. Acesso em: 02 mar. 2025.

ZHANG, Y. et al. Yeast stress tolerance and industrial applications. *Biotechnology Advances*, v. 42, p. 107-120, 2020.