



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA



# Avaliação do Potencial de Aplicação de Campo Elétrico Moderado na Pasteurização de Caldo de Cana para Produção de Etanol

*Autora: Fernanda Mambrini Só e Silva*

*Orientadora: Débora Jung Luvizetto Faccin*

*Co-orientadoras: Júlia Ribeiro Sarkis*

*Ligia Damasceno Ferreira Marczak*

Porto Alegre, julho de 15

## Sumário

Sumário	ii
Agradecimentos	iv
Resumo	v
Lista de Figuras	vi
Lista de Símbolos	vii
Lista de Abreviaturas e Siglas	viii
1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica	2
2.1 Breve histórico do etanol no Brasil	2
2.2 Matéria-prima	2
2.3 Processo fermentativo do caldo de cana no Brasil	3
2.3.1 Reações e etapas do processo fermentativo	3
2.3.2 Contaminantes bacterianos presentes no caldo de cana	4
2.4 Mecanismos de controle bacteriano	6
2.4.1 Uso de antibióticos no controle das contaminações	6
2.4.2 Uso de outros agentes antimicrobianos em substituição aos antibióticos	7
2.4.3 Tratamento térmico do substrato fermentativo	8
2.5 Tratamento térmico por aquecimento ôhmico	9
2.5.1 Equacionamento do processo de aquecimento ôhmico.	10
2.5.2 Vantagens do tratamento térmico por aquecimento ôhmico	11
2.5.3 A inativação microbiana e o aquecimento ôhmico	11
3 Materiais e Métodos	13
3.1 Material	13
3.1.1 Caldo de cana-de-açúcar	13
3.1.2 Microrganismo e solução pré-inóculo	14
3.2 Sistema de aquecimento ôhmico	14
3.3 Tratamentos	14
3.3.1 Amostras controle	15
3.3.2 Amostras com tratamento térmico convencional	15
3.3.3 Amostras com tratamento de campo elétrico	15
3.4 Fermentação	16
3.5 Quantificação de biomassa celular	16
3.6 Quantificação de açúcares residuais e etanol	16
3.6.1 Preparação de soluções padrão	16
3.6.2 Preparação de amostras para análise	17
3.6.3 Análise de açúcares e etanol	17
3.6.4 Análise estatística	17
4 Resultados e Discussão	18
4.1 Tratamentos Térmicos	18

---

4.2	Concentrações de Sacarose e Etanol nos produtos de fermentação	19
4.3	Concentração de Biomassa Celular nos Produtos de Fermentação	22
5	Conclusões e Trabalhos Futuros	23
6	Referências	25

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Ligia e Marcelo, pelo amor incondicional e pelo exemplo de força e perseverança que representam.

Às minhas orientadoras, Débora, Júlia e Ligia pelo apoio, carinho e dedicação, não apenas durante este trabalho, como em muitos outros momentos da minha formação, estando sempre disponíveis a passar seus conhecimentos e experiências.

À esta universidade, em especial ao Departamento de Engenharia Química e a seus professores e funcionários.

Aos amigos e colegas, Gustavo, Ana Cardinale, Débora, Érita, Dafne e Eveline, fundamentais para ter “sobrevivido” à graduação.

Às amigas Carolina e Clarissa, pelo apoio nos momentos difíceis e parceria em todas as horas.

---

## Resumo

---

A substituição de combustíveis de origem fóssil por aqueles oriundos de fontes renováveis vem se tornando cada vez mais necessária, tanto pelas preocupações atuais com o meio-ambiente, como pelas relacionadas à segurança energética. Dentre os biocombustíveis, o etanol, produzido por via fermentativa, apresenta maior potencial para a substituição da gasolina. O etanol no Brasil é obtido pela fermentação, por leveduras, do melaço e caldo de cana-de-açúcar. A cana contém naturalmente uma carga microbiana na qual se destacam as bactérias lácticas. Na fermentação industrial, essas bactérias competem com as leveduras e produzem compostos, que inibem o crescimento das mesmas. Atualmente, a contaminação por bactérias lácticas é considerada a principal limitação para aumentar o rendimento da fermentação. Alguns autores verificaram a sensibilidade térmica desses microrganismos. A literatura da área, porém, indicou que tratamentos térmicos convencionais não têm sido suficientes para reduzir efetivamente as contaminações e sugere-se que um aprimoramento do tratamento térmico pode melhorar a eficácia do tratamento. O uso de aquecimento ôhmico, particularmente a aplicação de campo elétrico moderado (CEM). Os estudos de aplicação de corrente elétrica na pasteurização têm apontado a existência de efeitos não térmicos adicionais na inativação de diferentes microrganismos. Neste trabalho foi avaliado o potencial de aplicação do campo elétrico moderado combinado ao tratamento de pasteurização do caldo-de-cana para produção de etanol. Amostras de caldo de cana *in-natura* foram aquecidas a 65°C com auxílio de banho de aquecimento; uma amostra recebeu somente este tratamento térmico convencional, em duas outras amostras foi passada corrente elétrica alternada (AC) nas frequências de 10 Hz e 10 kHz; foram realizados dois tratamentos elétricos a fim de verificar o efeito da frequência além do efeito do tratamento com CEM. Também foi separada uma amostra que não recebeu tratamento para configurar o controle. Após a realização dos tratamentos foi realizada fermentação das amostras e foram coletados produtos após os tempos de 12, 17 e 24h. Após um pré-tratamento, os produtos foram analisados em HPLC para quantificação de sacarose residual e etanol. Também foi medida, por método gravimétrico, a concentração de biomassa dos produtos de 24 h de fermentação. Tanto os tratamentos como os experimentos de fermentação foram realizados em duplicata. Não foi verificado aumento no rendimento na produção de etanol nem crescimento de biomassa celular nos produtos de fermentação das amostras tratadas termicamente, contrariando o que era esperado com base na literatura. Algumas hipóteses foram levantadas para justificar esses resultados; avaliou-se que a escala laboratorial utilizada pode ter sido muito pequena para reproduzir o ambiente desfavorável encontrado na indústria, não deixando nítidos os prejuízos causados pela contaminações. Também é possível que, a carga microbiana inicialmente presente tenha sido muito baixa por possível higienização da cana-de-açúcar previamente à produção do suco. Estima-se ainda que apenas as análises realizadas não tenham proporcionado uma avaliação completa do potencial do tratamento térmico com a aplicação de CEM, sendo necessárias análises adicionais como de acidez, microscopia e plaqueamento.

---

## Lista de Figuras

Figura 2.1: Percentuais encontrados de cada espécie de microrganismo nas 4 destilarias monitoradas. O quadro A foi baseado nas espécies encontradas em amostras dos dias 1 e 30 do processo de fermentação enquanto o quadro B foi baseado em uma média das espécies encontradas nas amostras dos dias 60, 90, 120 e 180. Adaptada de Lucena et al. (2010).....	7
Figura 3.1: Diagrama esquemático do sistema de aquecimento ôhmico (T = sensor de temperatura; V = medidor de tensão e A = medidor de corrente elétrica). Adaptado de Mercali (2013). ....	14
Figura 3.2: Representação esquemática da célula utilizada para aquecimento. Adaptada de Loghavi, Sastry e Yousef, (2008). ....	15
Figura 4.1: Curvas de aquecimento e resfriamento obtidas para a primeira repetição dos diferentes tratamentos realizados.....	18
Figura 4.2: Gráfico comparativo das concentrações de sacarose residual ( $\text{g.L}^{-1}$ ) com as barras de erro referentes aos desvios padrão para tempo de fermentação de 12, 17 e 24h. ....	19
Figura 4.3: Gráfico comparativo das concentrações de etanol ( $\text{g. L}^{-1}$ ) com as barras de erro referentes aos desvios padrão para os produtos obtidos em de 12 e 24h de fermentação nas amostras processadas pelos diferentes tratamentos térmicos e amostras controle. .	20
Figura 4.4: Gráfico comparativo das concentrações de biomassa celular após 24h de fermentação das amostras processadas pelos diferentes tratamentos.....	22

**Lista de Símbolos**

$A$  área ( $m^2$ )

$I$  intensidade da corrente (A)

$L$  comprimento (m)

$Q$  taxa de calor gerado ( $J \cdot s^{-1}$ )

$R$  resistência elétrica ( $\Omega$ )

$t$  tempo (s)

$V$  tensão (V)

## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

AO aquecimento ôhmico

Conv. Convencional

## 1 Introdução

Os combustíveis renováveis tem adquirido cada vez mais importância devido a questões de sustentabilidade e segurança energética, que motivam a substituição dos combustíveis de origem fóssil. O etanol é o biocombustível mais consumido no mundo e o Brasil foi o país pioneiro na sua produção. No processo de obtenção de etanol por via fermentativa, diferentes fontes de carbono podem ser utilizadas. Na produção brasileira, se utilizam misturas, em proporções variadas, de melaço e caldo de cana-de-açúcar como substrato fermentativo. Os microrganismos utilizados para fermentação dos açúcares do caldo em etanol são, geralmente, leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

Na produção em escala industrial de etanol, contaminações bacterianas (principalmente espécies do gênero *Lactobacillus*) estão normalmente presentes; as bactérias são originárias do solo e da própria cana de açúcar. Essa carga microbiana é indesejável, pois as bactérias competem com as leveduras pelos nutrientes do substrato e também produzem compostos inibitórios para o crescimento destas. Costuma-se adotar a aplicação profilática de antibióticos para reduzir os níveis de contaminação, porém, devido ao alto custo desses produtos, são aceitos níveis de contaminação impostos pela relação custo/benefício da utilização desses agentes. Além disso, o uso rotineiro dos antibióticos tem levantado preocupações relacionadas ao desenvolvimento de linhagens de bactérias resistentes a esses compostos e a problemas de destinação dos subprodutos de fermentação os quais contém quantidades residuais de antibióticos.

Na busca por alternativas no controle das contaminações bacterianas, alguns autores verificaram a sensibilidade térmica de bactérias lácticas. Tratamentos térmicos convencionais, contudo, são dependentes de coeficientes de troca térmica e muitas vezes não oferecem uma distribuição homogênea do calor; essas limitações podem resultar em uma pasteurização ineficiente. Como alternativa, o aquecimento ôhmico tem se apresentado como processo promissor. Nessa tecnologia, o alimento a ser processado é colocado em contato com eletrodos e atua como resistência à passagem da corrente elétrica alternada, que surge a partir da aplicação de uma diferença de potencial elétrico entre os eletrodos. O aquecimento direto do material é inerente ao efeito Joule.

No aquecimento ôhmico, o aquecimento ocorre mais rapidamente e o calor é distribuído de forma mais uniforme devido à geração interna de energia; a eficiência do processo é também vantajosa, uma vez que 90% da energia é transformada em calor. O campo elétrico moderado (CEM) é uma aplicação do aquecimento ôhmico na qual são aplicadas forças de campo entre 1 e 1000 V/cm, cuja motivação principal, em microrganismos, é permeabilizar a membrana celular. Mais recentemente, os efeitos da eletricidade na inativação de microrganismos têm sido avaliados e muitos trabalhos comparam o desempenho da pasteurização com aplicação de campo elétrico moderado (CEM) à técnica convencional, principalmente estudando mecanismos não térmicos que contribuem para inativação mais eficiente dos microrganismos estudados.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi estudar o potencial de aplicação de campo elétrico moderado (CEM) no tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar para a produção de etanol. Amostras de caldo de cana foram pasteurizadas por um tratamento térmico convencional e por tratamentos térmicos com a aplicação de campo elétrico para comparação.

## 2 Revisão Bibliográfica

A seguir é apresentada uma breve revisão bibliográfica sobre a produção de etanol no Brasil, o processo fermentativo, as contaminações bacterianas inerentes ao processo e os métodos de controle microbiológico que têm sido estudados.

### 2.1 Breve histórico do etanol no Brasil

A indústria de etanol começa no Brasil com a produção de aguardente a partir da introdução da cana-de-açúcar pelos colonizadores portugueses no início do século XVI. No século XX, o etanol começa a ser utilizado como combustível e, nos anos 70, o programa PROALCOOL é lançado pelo governo brasileiro para incentivar a produção de etanol como solução aos elevados preços do petróleo na época. Durante os anos 80, a alta inflação no país leva ao corte de subsídios à indústria de etanol, gerando retração do mercado. A recuperação econômica dos anos 90 e o mercado de petróleo tornam a comercialização de álcool combustível novamente favorável (BASSO et al., 2011).

No começo dos anos 2000, carros com motor flex começam a ser desenvolvidos localmente, exclusivamente direcionados ao mercado brasileiro. Atualmente no Brasil, 8 em cada 10 carros possuem motores deste tipo; tal proporção mostra que o país está alinhado à tendência contemporânea, uma vez que o uso majoritário do etanol é como combustível e como aditivo de combustível, substituindo a gasolina. O país se destaca pela exigência de, no mínimo, 25 % de etanol adicionado à gasolina (BASSO et al., 2011).

O aumento na demanda de energia, juntamente à escassez das reservas de combustíveis de origem fóssil, tem motivado o investimento em pesquisas para o desenvolvimento e aprimoramento de tecnologias de produção de energia renovável. Adicionalmente, as preocupações relacionadas às emissões de CO<sub>2</sub> e às mudanças climáticas também justificam a busca por alternativas energéticas mais sustentáveis (BAEYENS et al., 2015).

Nesse contexto, destaca-se o etanol; o biocombustível mais consumido no mundo representa, aproximadamente, 50 % do volume total de combustíveis consumidos por carros e veículos leves. O Brasil é o pioneiro na utilização do etanol como combustível e ocupa a vice-liderança na produção mundial. Aproximadamente, 2,3 % do produto interno bruto do país estão baseados na indústria de álcool e açúcar (MACEDO et al., 2008).

### 2.2 Matéria-prima

O etanol pode ser produzido a partir de diferentes matérias-primas, as quais são classificadas em três grupos: (1) fontes com grandes quantidades de açúcares prontamente fermentescíveis (cana-de-açúcar, açúcar de beterraba e sorgo doce); (2) amidos e frutanos (milho, batata, arroz, trigo e agave); e (3) lignocelulósicos (resíduos, gramíneas, espigas de milho, madeira, bagaço de cana-de-açúcar) (GOLDEMBERG, 2009).

Maiores produtores mundiais, Brasil e Estados Unidos, têm suas produções de etanol combustível baseadas, respectivamente, em cana-de-açúcar e milho. A utilização de tais matérias primas caracteriza a produção de etanol de primeira geração, essas culturas são consideradas fontes tradicionais de biomassa e as tecnologias atuais permitem seu aproveitamento para produção comercial de etanol em larga escala (BAEYENS et al., 2015).

Matérias-primas como resíduos lignocelulósicos, da própria indústria de etanol (bagaço da cana-de-açúcar) e também de outras indústrias, contêm polissacarídeos, os quais podem ser hidrolisados em açúcares fermentescíveis. A utilização dessa biomassa constitui a chamada produção de etanol de segunda geração. A existência de ligações cruzadas de lignina e carboidratos e a estrutura cristalina da celulose dificultam consideravelmente a hidrólise desses polissacarídeos. Apesar dos esforços recentes no desenvolvimento de técnicas de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, a aplicação das mesmas em escala comercial de produção ainda é dificultada pelas performances limitadas e pela viabilidade pobre (WU et al., 2011).

Economicamente, a utilização de cana-de-açúcar é favorecida para a produção de etanol por sua composição. Estão presentes na cana-de-açúcar entre 12 e 17 % de açúcares totais sendo 90 % sacarose e 10 % glicose e frutose. As tecnologias disponíveis permitem eficiência de até 97 % na extração de açúcares, os quais são diretamente fermentescíveis por leveduras. Além de aspectos econômicos do processo, a seleção da matéria-prima considera características regionais da zona produtora. A fermentação do caldo e melaço de cana-de-açúcar no Brasil é um processo já dominado e lucrativo.

A fim de atender a crescente demanda energética prevista para os próximos anos, são necessárias estratégias para incrementar a produção de etanol combustível e minimizar os custos do processo. Nesse contexto, duas possibilidades têm sido avaliadas: a implantação de melhorias no processo fermentativo na produção de etanol de primeira geração e o aprimoramento de técnicas para facilitar o aumento de escala de produção do etanol de segunda geração. (PACHECO, 2011). Cabe destacar a importância das pesquisas que visam melhorias na produção de etanol de segunda geração, uma vez que os resíduos lignocelulósicos são abundantes na natureza, não competem com a produção de alimentos e não impactam no uso de terras como ocorre na utilização das matérias-primas tradicionais (BAEYENS et al., 2015).

## **2.3 Processo fermentativo do caldo de cana no Brasil**

### *2.3.1 Reações e etapas do processo fermentativo*

A indústria sucroalcooleira no Brasil utiliza o caldo de cana-de-açúcar puro ou misturado ao melaço de cana em proporções variadas para formação do chamado mosto. O caldo é obtido pela moagem da cana de açúcar e contém entre 78 e 86% de água, 10 e 20% de sacarose, 0,1 e 2% de açúcares redutores (principalmente sacarose e frutose), até 0,5% de cinzas e até 1% de compostos nitrogenados. O pH do caldo varia entre 5,2 e 6,8 (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009).

O processo de fermentação mais adotado é em batelada alimentada, podendo ser utilizada também a produção contínua (BASSO et al., 2011). A fermentação alcoólica é a transformação dos açúcares presentes no mosto em etanol e gás carbônico pela ação

enzimática das leveduras. A reação ocorre com liberação de energia e o etanol é o metabólito produzido em maior quantidade (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009).

O microrganismo mais utilizado é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, bem adaptada às condições do ambiente industrial. O reciclo de células entre cultivos, durante toda temporada de colheita, costuma ser adotado por praticamente todas as indústrias (BASSO et al., 2011).

Nesse processo, os contaminantes microbiológicos também são reciclados, agravando condições de contaminação bacteriana (DE OLIVA-NETO e YOKOYA, 2001). O reciclo intensifica também condições de estresse industriais (elevadas concentrações de etanol, elevada pressão osmótica, altas temperaturas, entre outras) as quais podem limitar o rendimento do processo (BASSO et al., 2011).

Na produção de etanol em escala industrial, após a colheita, a cana-de-açúcar é encaminhada à usina tão logo possível para minimizar a degradação e perdas de sacarose. A cana-de-açúcar passa por lavagem para retirada de impurezas grosseiras, em seguida o caldo é obtido por moagem e prensagem. Antes da fermentação o caldo ainda é clarificado por coagulação, floculação e precipitação dos colóides e substâncias corantes, que são eliminados posteriormente por decantação e filtração (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009).

Mesmo com a adoção de todas as etapas citadas, a contaminação bacteriana é muitas vezes apontada como principal desvantagem durante a produção industrial do etanol (BECKNER et al., 2011). Geralmente, não existe uma preocupação para que as fermentações alcoólicas para produção de combustível ocorram em condições de assepsia, além disso, elas dificilmente são alcançadas em função das grandes quantidades de substrato processadas. Sendo assim, contaminações persistentes são esperadas e toleradas (SKINNER ; LEATHERS 2004).

### 2.3.2 Contaminantes bacterianos presentes no caldo de cana

O caldo de cana é uma solução aquosa diluída e impura contendo sacarose; sua composição depende principalmente da origem e estado de maturação da cana. O crescimento de muitos microrganismos é favorecido nesse substrato pelos altos teores de nutrientes disponíveis, elevada atividade de água e pH favorável. Dessa forma, normalmente, uma ampla e variada microbiota está presente no caldo, sendo a contaminação bacteriana um problema generalizado (NOLASCO, 2005).

Os contaminantes se originam da própria planta, do solo e da matéria prima em decomposição. Em uma escala industrial, a prática de reciclo celular, comum em destilarias brasileiras, também é apontada como agravante para a contaminação bacteriana, pois o reciclo re-adiciona os contaminantes ao meio fermentativo. (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009; MENEGHIN et al., 2008).

No Brasil, a etapa de extração do caldo da cana-de-açúcar é um processo mecanizado. A avaliação da flora microbiana nesse tipo de processo mostrou que a quantidade de bactérias esporogêneas e, principalmente, de bactérias lácticas é relevante tanto na etapa de extração como durante a fermentação. Esses microrganismos são os principais promotores da fermentação indesejável (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009).

Diferentes gêneros de bactérias lácticas (BLs) foram identificados em dornas industriais de fermentação alcoólica. Dentre estes, predominam *Lactobacillus* e *Bacillus*, bactérias Gram-positivas, bem adaptadas a altas concentrações de etanol, baixos valores de pH e pouca oxigenação. Tais condições são comuns durante a fermentação.

É comumente aceito que a presença de *Lactobacilli* no meio fermentativo inibe o crescimento da levedura, logo limita a produção de etanol, tanto por competição por substrato como pela produção de subprodutos inibitórios, como os ácidos láctico e acético. Unidades produtoras de etanol rotineiramente monitoram concentrações desses ácidos a fim de avaliar a extensão das contaminações (SKINNER; LEATHERS, 2004).

Na discussão apresentada no trabalho de Beckner et al. (2011), apenas a quantidade de nutrientes utilizada pelas bactérias para crescimento celular e produção de ácidos orgânicos não explica completamente as perdas de rendimento geralmente observadas (2 a 22 %). Uma vez presentes no meio, as formas não desassociadas dos ácidos láctico e acético cruzam a membrana celular das leveduras e, então, se dissociam. Com a liberação de íons H<sup>+</sup> ocorre a acidificação do citoplasma celular.

Lucena et al. (2010) quantificaram e identificaram bactérias lácticas em quatro destilarias brasileiras. A quantidade de BLs nos tanques de fermentação monitorados foi de mesma ordem da encontrada no caldo-de-cana bruto, indicando que o próprio substrato constitui importante fonte de contaminação. Predominou o gênero *Lactobacillus*, sendo que as espécies *L. fermentum* e *L. vini* foram as mais abundantes. Essas espécies foram encontradas em meios contendo até 10 % de etanol, sugerindo uma seleção de bactérias resistentes a títulos elevados de etanol com o passar do tempo.

O prejuízo na produção de etanol causado por contaminações com *L. fermentum* é devido tanto à produção de compostos inibitórios, como à capacidade desse agente flocular as leveduras (NETO et al., 2014). A floculação é a formação agrupamento das células de leveduras. Nesse processo, a conversão de açúcar em etanol e CO<sub>2</sub> é prejudicada pela redução de superfície de contato entre as células e o meio (LUDWIG; OLIVA-NETO; ANGELIS, 2001).

Estudos realizados por Franchi et al. (2003), Nolasco (2005) e Ceballos-Schiavone (2009) verificaram a sensibilidade térmica de diferentes espécies de *Lactobacillus* e *Bacillus*. O experimento feito por Nolasco (2005), avaliou também que a decantação assegura a eliminação dos *Lactobacilli* contaminantes da fermentação, indicando que seu aparecimento após esta etapa é possivelmente dado por re-contaminação.

Durante a etapa de clarificação industrial, o caldo atinge temperaturas próximas a 105 °C, valor que seria suficiente para eliminar a carga microbiana. A similaridade entre bactérias lácticas encontradas em dornas de fermentação (LUCENA et al., 2010) e àquelas identificadas no solo de canaviais, na água da bainha das folhas e na superfície dos colmos de cana-de-açúcar (GALLO, 1990), indica que o processo é ineficiente ou que, posteriormente, ocorrem re-contaminações devido à falta de higiene.

Por vezes, são adicionados biocidas ao caldo de cana-de-açúcar. São utilizados carbamatos, compostos quaternários, fenóis halogenados e antibióticos. Os altos custos, a necessidade de aplicação periódica e desenvolvimento de resistência de microrganismos aos antibióticos são as principais desvantagens na utilização desses produtos (MENEHIN et al., 2008).

Skinner-Nemec et al. (2007) sugerem que as contaminações persistentes são típicas da formação de biofilmes. Biofilmes são comunidades de microrganismos que se aderem a uma superfície (MUTHAIYAN et al., 2011); ainda no trabalho de Skinner-Nemec et al. (2007), os experimentos conduzidos demonstraram que bactérias isoladas de indústrias de etanol foram capazes de formar biofilmes em condições de laboratório. Segundo os autores, esses resultados podem explicar a dificuldade de controlar contaminações bacterianas no processo de fermentação; uma vez formados, os biofilmes atuam como reservatórios de bactérias que, constantemente, reintroduzem contaminantes ao processo.

No estudo de revisão apresentado por Muthaiyan et al. (2011) é citado que as bactérias nos biofilmes são mais resistentes a antibióticos e outros agentes biocidas. Nesse trabalho, também é relatado que os tratamentos térmicos para clarificação das matérias primas podem não oferecer suficiente proteção contra as contaminações microbiológicas que persistem como biofilmes. Aslam et al. (2007) reportaram que as bactérias dos biofilmes são resistentes a concentrações de antibióticos até 1000 vezes maiores do que o normalmente aplicado.

## **2.4 Mecanismos de controle bacteriano**

### *2.4.1 Uso de antibióticos no controle das contaminações*

Atualmente o controle bacteriano na indústria de etanol é feito com a utilização de diferentes compostos antimicrobianos incluindo antibióticos. Penicilina e, mais recentemente, virginiamicina são comercializados para tratar infecções em fermentações alcoólicas (MUTHAIYAN et al., 2011). Atualmente, o antibiótico HJ Kamoran®, à base de montesina, é amplamente utilizado em destilarias brasileiras, o que implica uma elevação nos custos produtivos (NETO et al., 2014).

Segundo Alcarde et al. (2003), antibióticos são tradicionalmente utilizados por indústrias de etanol para reduzir a contaminação microbiana do mosto. Uma vez que esses produtos apresentam custos elevados, a dosagem dos antibióticos está limitada pela relação custo/benefício. Dessa forma, a indústria considera aceitável trabalhar com níveis de unidades formadoras de colônia (UFC) da ordem de grandeza de  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>, não sendo considerado economicamente viável operar em níveis mais baixos.

Além da questão econômica, a adição profilática de antibióticos no meio fermentativo gera preocupações relacionadas ao aumento da resistência das bactérias lácticas a eles. No estudo apresentado por Lucena et al. (2010), foram monitoradas quatro destilarias brasileiras (Trapiche, Miriri, Japungu e Giasa) entre 2007 e 2008. Um elevado número de espécies de bactérias lácticas foi identificado nos primeiros trinta dias de acompanhamento do processo fermentativo. Após 60 dias havia uma predominância das espécies *L. fermentum* e *L. vini*.

A Figura 2.1 apresenta um quadro das percentagens de cada espécie de microrganismo encontrada nessas destilarias, comparando amostras do início do monitoramento a amostras coletadas a partir de 60 dias de processo fermentativo.

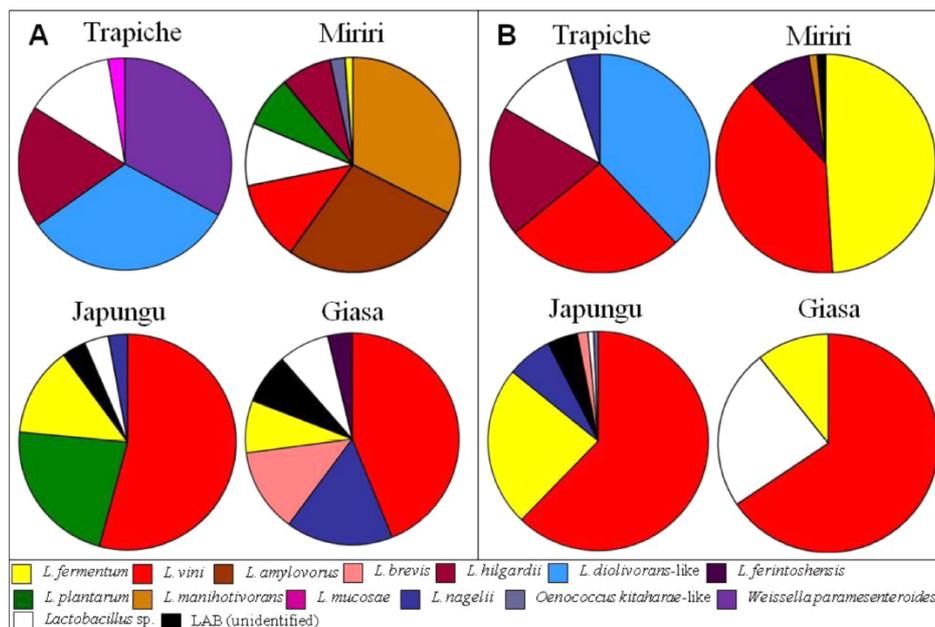


Figura 2.1: Percentuais encontrados de cada espécie de microrganismo nas 4 destilarias monitoradas. O quadro A foi baseado nas espécies encontradas em amostras dos dias 1 e 30 do processo de fermentação enquanto o quadro B foi baseado em uma média das espécies encontradas nas amostras dos dias 60, 90, 120 e 180. Adaptada de Lucena et al. (2010).

Os autores concluíram que as condições estressantes do processo fermentativo (uso de antibióticos, altas temperaturas, baixo pH e altas concentrações de etanol) possivelmente guiaram a uma seleção de certos tipos mais resistentes de bactérias lácticas.

Muthmaiyan, Limayem e Ricke (2011) resumiram os estudos de diferentes autores a respeito de mecanismos de resistência antibiótica. As observações indicaram que *Lactobacillus* podem desenvolver resistência tanto por aquisição de elementos genéticos externos transmissíveis como pelo desenvolvimento de múltipla resistência antibiótica intrínseca, a partir de mutações causadas pela exposição prolongada aos antibióticos em fermentadores de etanol.

Além da redução de efetividade do antibiótico na eliminação das bactérias lácticas, também existe o receio dos problemas que podem ser causados pelas pequenas quantidades de antibióticos presentes em subprodutos da fermentação. As leveduras secas, por exemplo, costumam ser vendidas para a indústria de ração animal. Quantidades residuais de antibiótico presentes nas leveduras ao final do processo podem diminuir o valor de mercado das mesmas ou, até mesmo, impedir esse tipo de reaproveitamento, gerando um resíduo indesejável (PRADO, 2014).

#### 2.4.2 Uso de outros agentes antimicrobianos em substituição aos antibióticos

Dadas as preocupações relacionadas ao uso profilático de antibióticos no controle das contaminações verificadas no processo fermentativo, alguns autores testaram a eficácia de diferentes agentes antimicrobianos para substituí-los.

Meneghin et al. (2009) avaliaram a concentração mínima inibitória de dióxido de cloro para quatro diferentes variedades de bactérias contaminantes da fermentação alcoólica (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides*). As bactérias inoculadas foram tratadas com soluções de dióxido de cloro com diferentes concentrações, dependendo da variedade analisada. O biocida comercial Kamoram® foi utilizado em concentração de 3 ppm (valor recomendado para tanques de fermentação) para comparação. Os resultados de concentração mínima inibitória foram de 10 ppm para *B. subtilis*, 125 ppm para *L. plantarum*, 100 ppm para *L. fermentum* e 50 ppm para *L. mesenteroides*. A dosagem de Kamoran® inibiu o crescimento de *L. plantarum* e *L. fermentum* mas não foi suficiente para suprimir o crescimento de *B. subtilis* e apenas reduziu o crescimento de *L. mesenteroides*. A inibição do crescimento das leveduras também foi avaliada. Os autores não recomendam o uso de dióxido de cloro em concentrações acima de 50 ppm como agente antibacteriano em fermentação alcoólica a fim de evitar efeitos prejudiciais ao inóculo de leveduras. Com isso, estudos futuros foram encorajados uma vez que a redução do pH (abaixo de 4) poderia demandar menores concentrações do que as obtidas para *L. plantarum* e *L. fermentum*.

Mutton et al. (2014) testaram própolis verde e marrom (biocidas naturais) para o controle de contaminação bacteriana na produção de aguardente de cana-de-açúcar. Os mostos utilizados na fermentação foram tratados por lavagem de leveduras com água destilada e diferentes biocidas; a lavagem foi realizada a cada dois ciclos de fermentação. Concentrações de 700 ppm de extratos de própolis verde e marrom foram usadas em lavagem de leveduras. Os mostos que receberam o tratamento com própolis foram comparados a um mosto controle (sem adição de biocida) e um mosto tratado com uma solução de ampicilina (forma sintética de penicilina). Após a fermentação, os conteúdos totais de ácido e de etanol das vinhaças obtidas para cada tratamento foram quantificados. Os resultados obtidos mostraram menor acidez final nas vinhaças de mostos tratados com própolis marrom e acidez similar entre as vinhaças de mostos tratados com própolis verde e ampicilina. A produção de etanol obtida na vinhaça de mosto tratado com própolis verde foi a maior entre os tratamentos. Os autores concluíram que o uso de extratos de própolis manteve a viabilidade celular, reduziu a formação de ácidos e aumentou a produção de etanol e sugeriram que os mesmos devem ser considerados para processos de fermentação na produção de bebidas, alimentos e biocombustíveis.

#### 2.4.3 Tratamento térmico do substrato fermentativo

Ainda que a aplicação de outros biocidas em lugar aos antibióticos resolva o problema do desenvolvimento de resistência das bactérias contaminantes da fermentação, esses agentes ainda necessitam de aplicações periódicas e adicionam custos ao processo produtivo.

Em substituição à adição de agentes antibacterianos para o controle de contaminações no meio fermentativo, o tratamento térmico foi proposto para sanitização do caldo de cana e, conseqüentemente, redução carga microbiana do mesmo. Para tanto, diferentes autores avaliaram a sensibilidade térmica das espécies de *Lactobacilli* mais comuns em dornas de fermentação alcoólica.

Franchi et al. (2003) determinaram o valor D60 (tempo para inativar 90% da carga microbiana na temperatura de 60 °C) de diferentes espécies de bactérias contaminantes

da fermentação. Os resultados obtidos (0,75 min para *L. fermentum*, 0,29 min para *L. plantarum* e 1,57 min para *Leuconostoc mesenteroides*) demonstraram a sensibilidade térmica desses microrganismos. Nesse estudo, a espécie *Lactobacillus fermentum* foi definida como alvo nos experimentos de tratamento térmico por esta ser o principal causador da floculação. O valor z (intervalo de temperatura que ocasiona uma variação de 10 vezes na velocidade de destruição) para este microrganismo foi determinado para a faixa de 50 a 65 °C e encontrado em 7,7 °C.

Valsechi (2005) submeteu diferentes linhagens de *L. fermentum* a aquecimento gerado por micro-ondas e a aquecimento convencional. O autor observou a eliminação total das linhagens com aplicação de uma frequência de 2450 MHz quando a temperatura atingiu 58,9 °C em 9 segundos. O aquecimento convencional na mesma temperatura propiciou diminuição de 80 % em 10 minutos. A validação de resultados foi feita por contagem das unidades formadoras de colônias em meio MRS; também foi quantificado o teor de ácido láctico, por análise enzimática e absorvância por espectrofotometria com luz visível ( $\lambda = 550$  nm). O estudo demonstrou a sensibilidade térmica da espécie *L. fermentum* e concluiu que a eliminação deste microrganismo pela aplicação de calor com irradiação de micro-ondas é mais rápida e eficiente do que se for utilizado somente aquecimento convencional.

Ceballos-Schiavonne (2009) realizou experimentos de clarificação de caldo de cana por esterilização de amostras em autoclave e por adição de fosfato monodratado de sódio (visando à eliminação de coloides) seguida de esterilização em autoclave para verificar se a presença de coloides (em caldo somente aquecido) interfere na eliminação microrganismos por tratamento térmico. As amostras clarificadas foram contaminadas com sete diferentes espécies de *Lactobacillus*, simulando as contaminações comumente encontradas na indústria sucroalcooleira. Foram realizados experimentos de tratamento térmico que confirmaram a sensibilidade dos microrganismos ao calor e o tratamento térmico foi indicado como mecanismo de controle bacteriano. Não foram identificadas diferenças significativas entre os resultados na comparação dos dois métodos utilizados para clarificação, indicando que a presença dos coloides não interfere na eliminação de microrganismos por tratamento térmico.

## 2.5 Tratamento térmico por aquecimento ôhmico

A sensibilidade térmica dos microrganismos contaminantes da fermentação verificada pelos trabalhos citados anteriormente, sugere que um aprimoramento do tratamento térmico poderia ajudar no seu controle. Em um tratamento térmico convencional, o aquecimento do material é feito pelo contato com uma superfície aquecida; no aquecimento ôhmico, o aquecimento do material é resultante da dissipação de energia elétrica na forma de calor, por efeito Joule, que ocorre pela passagem de corrente elétrica alternada (AC) através do produto a ser tratado.

Em um sistema de aquecimento ôhmico, o material é colocado em contato com eletrodos (entre os quais é aplicada a diferença de potencial elétrico) e atua como resistência à passagem de corrente elétrica. A dissipação de energia é inerente ao fenômeno de aquecimento por resistência (PEREIRA et al., 2007)

### 2.5.1 Equacionamento do processo de aquecimento ôhmico.

A taxa volumétrica de geração de calor no aquecimento ôhmico é descrita pela equação 2.1.

$$Q = E^2 \cdot \sigma \quad (2.1)$$

onde  $E$  é a força de campo aplicada [ $V \cdot m^{-1}$ ] e  $\sigma$  é a condutividade elétrica do material [ $S \cdot m^{-1}$ ].

A equação 2.2 descreve a relação entre força de campo, tensão aplicada  $V$  em Volts e distância entre eletrodos ( $L$ ) em metros.

$$E \cong V/L \quad (2.2)$$

A resistência à passagem de corrente ( $R$ ) é inversamente proporcional à condutividade elétrica do material, a relação é descrita abaixo pela equação 2.3:

$$R = \frac{L}{A \cdot \sigma} \quad (2.3)$$

onde  $A$  é a área dos eletrodos (ou da seção transversal da amostra), expressa em  $m^2$ .

Usando a lei do ohm ( $V = R \cdot I$ ), a resistência elétrica pode ser calculada pela medição da corrente ( $I$ ) e tensão aplicadas ( $V$ ).

Conforme apresentado nas equações anteriores, pode-se afirmar que a condutividade elétrica do material é um parâmetro crítico para o aquecimento ôhmico. Soluções aquosas apresentam em geral condutividades elétricas não nulas, que são afetadas pela sua composição; enquanto elevadas concentrações de sais e outros constituintes iônicos aumentam a condutividade elétrica do fluido, a presença de constituintes não iônicos, como açúcar e gordura, implicam em valores mais baixos.

Além da composição química do material, a temperatura também influencia na condutividade elétrica. Em soluções, um aumento de temperatura provoca uma diminuição da viscosidade da solução, facilitando a mobilidade dos íons e aumentando a condutividade elétrica. Segundo Goullieux e Pain (2005), essa relação é, geralmente, linear e representada pela equação 2.4:

$$\sigma = \sigma_{in} [1 + m(T - T_{in})] \quad (2.4)$$

onde  $\sigma_{in}$  é a condutividade elétrica na temperatura inicial ( $T_{in}$ ). O valor  $m$  é dependente da solução e da temperatura. A  $25^\circ C$ ,  $m$  assume o valor de  $0,0016^\circ C^{-1}$  para soluções ácidas,  $0,0018^\circ C^{-1}$  para soluções alcalinas e entre  $0,0019$  e  $0,0022^\circ C^{-1}$  para soluções salinas.

### 2.5.2 *Vantagens do tratamento térmico por aquecimento ôhmico*

No processo de aquecimento ôhmico, o calor é gerado internamente e dissipado através de toda massa de material, resultando em um aquecimento mais uniforme se comparado a um processo convencional de aquecimento (KNIRSCH et al., 2010).

O calor gerado internamente também leva a um aumento de temperatura sem a limitação por coeficientes de troca térmica (diferentemente do que ocorre no aquecimento convencional) dessa forma, são atingidas taxas mais rápidas de aquecimento. Isso pode ser especialmente vantajoso para ultrapassar rapidamente temperaturas em que ocorrem reações indesejáveis (SASTRY et al., 2010).

Segundo Sastry et al. (2010), outra vantagem é ampla variedade de arranjos de equipamentos de aquecimento ôhmico disponível. As diferentes opções de arranjo permitem que a técnica seja adaptada a necessidades específicas do material a ser processado. Dessa forma, a maioria dos aquecedores ôhmicos é desenvolvida para operar em amplas faixas de condutividade elétrica.

Os dispositivos podem ser basicamente de elevada voltagem e baixa corrente, com campo elétrico alinhado ao fluxo, ou de elevada corrente e baixa voltagem, nos quais o campo elétrico é perpendicular ao fluxo. A segunda configuração atende fluidos com condutividades relativamente baixas, como alimentos e bebidas sem constituintes iônicos.

O aquecimento ôhmico oferece grande facilidade de controle do processo, pois basta ligar ou desligar a fonte de energia elétrica; além disso, pode ser considerado mais limpo uma vez que não são usados água ou vapor para o aquecimento (GHNIMI et al., 2008). Outra vantagem que deve ser mencionada é a elevada eficiência energética do processo, pois, aproximadamente, 90 % da energia elétrica é convertida em calor, percentual maior até do que outros métodos de aquecimento direto como o uso de micro-ondas. (SASTRY et al., 2010).

### 2.5.3 *A inativação microbiana e o aquecimento ôhmico*

O aquecimento ôhmico pode ser aplicado como tratamento térmico no controle microbiológico. Segundo Park e Kang (2013), o uso de aquecimento ôhmico pode, não apenas contornar as limitações observadas em tratamentos térmicos convencionais, como, também, reforçar a inativação de patógenos pela combinação dos efeitos do calor e da eletricidade. Os efeitos da eletricidade na inativação dos patógenos podem estar ligados ao fenômeno de eletroporação da membrana celular das bactérias, gerado pelo campo elétrico.

A aplicação do campo elétrico causa uma movimentação de íons dentro da membrana celular, surgindo uma diferença de potencial na célula junto a esse campo. A condutividade da camada fosfolipídica da membrana celular é muito baixa devido à ação isolante dos lipídios presentes; com isso, os íons são inicialmente desacelerados e se acumulam na superfície da membrana, mas acabam sendo forçados para fora pelo campo elétrico, levando a formação dos poros. Os poros formados apresentam tamanhos variáveis os quais dependem da força de campo aplicada (ANDERSON, 2008; LEE et al., 2012a; PEREIRA et al., 2007).

Os estudos da aplicação de campo elétrico moderado para inativação de patógenos apresentam bons resultados de inativação microbiana utilizando tanto sistemas de sistemas de baixas frequências (50, 60 Hz) como sistemas de altas frequências (acima de 10 kHz). Segundo Sastry e Barach (2000), em sistemas de baixas frequências a menor velocidade de alternância dos polos facilita o acúmulo de cargas na célula, necessário para a formação dos poros. Além disso, os valores de 50 e 60 Hz são os mais usados no aquecimento ôhmico pois essas são as frequências diretas da rede de energia externa. Para usar outras frequências é necessário dispor de um equipamento específico.

Por outro lado, Park e Kang (2013) optaram por utilizar uma frequência mais elevada sob a justificativa de que em sistemas de baixas frequência podem ocorrer reações eletroquímicas que podem afetar a inativação de patógenos. Segundo Fellows (2005), os primeiros arranjos de aquecimento ôhmico utilizavam corrente direta (frequência de 0 Hz) que causavam a eletrólise, corrosão dos eletrodos e contaminação dos produtos, e também usavam eletrodos muito caros. O uso de correntes alternadas em frequências de 50Hz reduziu o risco de eletrolise e diminui a complexidade e o custo do equipamento. Alternativamente frequências ainda mais em elevadas podem ser usadas para reduzir a eletrolise. O estudo de Sastry (2010) demonstrou que o uso de altas frequências é indicado para evitar reações eletroquímicas na interface eletrodo-solução.

A literatura recente (SOMAVAT et al., 2013; SOMAVAT et al., 2012) apresenta estudos de comparação entre tratamento térmico convencional e aquecimento ôhmico. Esses estudos eliminaram diferenças térmicas entre as técnicas, obtendo históricos tempo - temperatura idênticos. Os resultados indicam a ocorrência de um efeito adicional não térmico nos microrganismos durante o aquecimento ôhmico, o qual se deve à ocorrência do fenômeno de eletroporação.

Somavat et al. (2012) compararam os efeitos do aquecimento convencional e ôhmico (frequências de 60Hz e 10kHz) na cinética inativação de esporos de *Geobacillus stearothermophilus*. Para este estudo, foi desenvolvido um sistema com células capilares, o qual permitiu a eliminação de possíveis causas de erro inerentes a aquecedores ôhmicos convencionais e garantiu históricos de tempo-temperatura idênticos e perfis de aquecimento uniformes para os tratamentos explorados. Os valores D calculados nas temperaturas de 121 e 125 °C apresentaram valores significativamente menores quando utilizada a técnica ôhmica de aquecimento em ambas frequências trabalhadas. Essa diminuição no valor D indica que a liberação de material iônico do núcleo e camada proteica dos esporos, que ocorreu possivelmente devido à eletroporação, contribuiu para maior letalidade do aquecimento ôhmico.

Park e Kang (2013) avaliaram diferenças entre o aquecimento ôhmico e o convencional (temperaturas de 55, 58 e 60 °C) na inativação de bactérias de origem alimentar (*S. Typhimurium*, *E. coli* e *L. monocytogenes*) em solução tamponada de peptona (pH 7,2) e suco de maçã (pH 3,5). Também foram investigadas mudanças na permeabilidade da membrana celular, baseada na teoria da eletroporação, durante o aquecimento ôhmico (frequência aplicada de 20 kHz). Os níveis de redução para os três patógenos no aquecimento a 58 e 60 °C combinado ao efeito elétrico foram 2 a 3 vezes maiores do que os observados no tratamento convencional. Assim como no experimento descrito anteriormente, isso pode ser explicado pela maior permeabilidade celular,

acarretada pela formação de poros, devido ao campo elétrico, que resulta em morte celular quando combinada ao aquecimento.

Loghavi, Sastry e Yousef (2009) estudaram o efeito da utilização de campo elétrico moderado na eletroporação de células de *L. acidophilus*. Experimentos de fermentação foram conduzidos aplicando campos elétricos moderados em frequências de 45, 60, 1000 e 10000 Hz. Os resultados obtidos foram comparados entre si e a um experimento controle, sem a passagem de corrente elétrica. Próximo ao final da fermentação, foi adicionada uma mistura de corantes (SYTO 9, verde e permeável à membrana celular e iodeto de propídio, vermelho e impermeável à membrana) e, por microscopia de fluorescência, foi possível verificar a permeabilização. Uma vez que o iodeto de propídio não atravessa as células intactas, as amostras tratadas com campos elétricos moderados apresentaram mais células tingidas de vermelho pela ocorrência da permeabilização. Os resultados mostraram uma eletroporação significativamente maior das células tratadas com as frequências de 45 e 60 Hz em relação às células de controle. Essa diferença, no entanto, não foi observada para as células tratadas com frequências de 1000 e 10000 Hz. Os autores concluíram que as observações são consistentes com a hipótese de que, em baixas frequências, as cargas têm mais tempo para se acumular na membrana celular, conseqüentemente, formando poros maiores.

Lee et al. (2012) conduziram experimentos de pasteurização convencional e com o uso de campo elétrico moderado; foi avaliado o efeito de diferentes forças de campo (25, 30, 35 e 40 V.cm<sup>-1</sup>) elétrico na redução dos níveis de *E. coli*, *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* em sucos de laranja e tomate. Mudanças na morfologia dos microrganismos foram examinadas por microscopia eletrônica de transmissão. O encolhimento de material intracelular foi observado, tanto para o tratamento ôhmico como para o convencional. As células aquecidas na presença de campos elétricos, porém, apresentaram um espaço entre a parede e a membrana celular devido à remoção de membrana causada pela eletroporação. Para ambos os sucos, a condição de pasteurização mais efetiva ocorreu com a aplicação de campo elétrico com força de 40 V.cm<sup>-1</sup>.

### **3 Materiais e Métodos**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA), situado no Departamento de Engenharia Química (DEQUI) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

#### **3.1 Material**

##### *3.1.1 Caldo de cana-de-açúcar*

O caldo de cana-de-açúcar foi adquirido no comércio local, onde a cana foi moída na hora da compra. O caldo foi mantido em geladeira até a realização dos tratamentos, os quais ocorreram sempre no mesmo dia da compra do caldo.

### 3.1.2 Microrganismo e solução pré-inóculo

Para as fermentações utilizou-se fermento biológico comercial (Saf-Instant, Lesaffre), composto apenas por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* liofilizadas. Cada envelope foi aberto somente no momento da inoculação.

O meio de cultura utilizado como pré-inóculo consiste em uma solução contendo 10 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 10 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura (RM027- 500G HIMEDIA) e 20 g.L<sup>-1</sup> de peptona (RM001-500G HIMEDIA) em água destilada. O meio de cultura foi colocado em frascos Erlenmeyer de 250 mL previamente esterilizados em autoclave (121 °C , 15 min, 1 atm). Após adição das leveduras liofilizadas, colocou-se o meio em Shaker (CT-712RN, CIENTEC, Brasil) para reativação e crescimento das leveduras para posteriormente ser utilizado como pré-inóculo dos cultivos subsequentes. Os frascos foram deixados em Shaker por 24 h na temperatura de 37 °C e velocidade de agitação de 100 rpm.

### 3.2 Sistema de aquecimento ôhmico

Para todos os tratamentos térmicos foi utilizado um sistema de aquecimento ôhmico que consiste em um sistema de aquisição de dados (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA), um computador e uma célula ôhmica. Um gerador de função (Tektronix Inc., modelo AFG3252, Richardson, Tex, USA) e um amplificador de potência (Industrial Test Equipment, modelo 500A, Port Washington, NY, USA) também estão acoplados ao sistema e foram utilizados para aplicar a passagem de corrente elétrica alternada e tensão. A Figura 3.1 esquematiza o sistema utilizado.

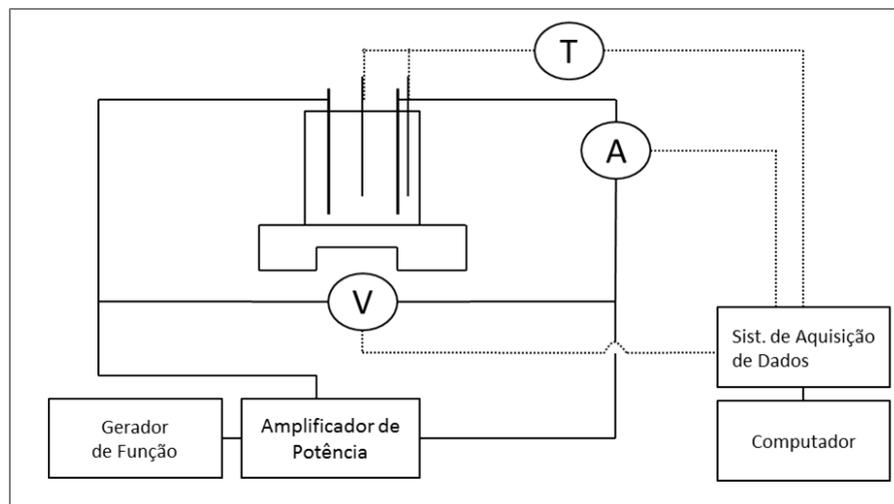


Figura 3.1: Diagrama esquemático do sistema de aquecimento ôhmico (T = sensor de temperatura; V = medidor de tensão e A = medidor de corrente elétrica). Adaptado de Mercali (2013).

### 3.3 Tratamentos

Foram realizados um tratamento térmico convencional e dois tratamentos térmicos com a aplicação de campo elétrico moderado, nestes foi utilizada corrente elétrica alternada em frequências de 10Hz e 10kHz; foram testadas duas frequências diferentes nos tratamentos com aplicação de campo elétrico moderado a fim de avaliar a influência das mesmas na inativação dos microrganismos. Os tratamentos térmicos foram comparados entre si e com amostras controle, que não receberam tratamento. É importante destacar que, para garantir taxas de aquecimento iguais para os três

tratamentos térmicos realizados (convencional, campo elétrico 10Hz e campo elétrico 10kHz) o aquecimento de todas as amostras até a temperatura de 65°C foi feito por camisa.

A Figura 3.2 apresenta mais detalhadamente a célula encamisada.

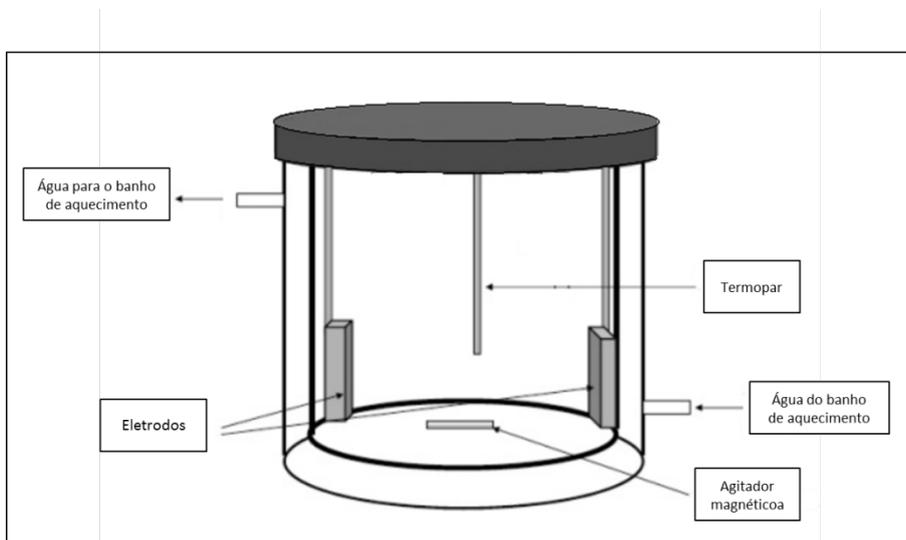


Figura 3.2: Representação esquemática da célula utilizada para aquecimento. Adaptada de Loghavi, Sastry e Yousef, (2008).

### 3.3.1 Amostras controle

Com o auxílio de uma proveta, foram separadas duas alíquotas de 50 mL de caldo de cana e colocadas em frascos Erlenmeyer previamente esterilizados em autoclave (121 °C, 15 min, 1 atm). Essas amostras foram mantidas em geladeira até o momento de se efetuar o inóculo da fermentação e serviram como controle.

### 3.3.2 Amostras com tratamento térmico convencional

Foi realizado em duplicata um tratamento térmico convencional. Para cada repetição, uma amostra (280 ml medidos em proveta) foi colocada na célula encamisada e tratada termicamente a 65 °C. A medição da temperatura foi feita por um termopar inserido na célula (sendo um sensor junto a um dos eletrodos e o outro junto à parede da célula). Esses termopares estão atrelados ao sistema de aquisição de dados, permitindo monitoramento da temperatura pelo software do equipamento.

Uma vez estabilizada a temperatura no valor desejado, o tratamento prosseguiu por 20 minutos. Em seguida, a amostra foi resfriada rapidamente com o uso de banho de resfriamento (5 °C) até atingir a temperatura de 20 °C. Duas alíquotas de 50 mL foram transferidas com pipeta para frascos Erlenmeyer esterilizados e por fim armazenadas em geladeira aguardando horário para inóculo. Houve o cuidado de utilizar a mesma configuração de sistema que posteriormente foi utilizada para os tratamentos com aplicação de campo elétrico, a diferença foi apenas que neste caso não foi aplicada a diferença de potencial entre os eletrodos.

### 3.3.3 Amostras com tratamento de campo elétrico

Foram realizados tratamentos térmicos com o emprego de campo elétrico moderado utilizando-se as frequências de 10 Hz e 10 kHz. A tensão empregada foi de 25 V. Os

tratamentos foram realizados em duplicata, para cada repetição foram medidos com proveta 280 mL de caldo cana.

Para garantir tempo de aquecimento inicial igual para todas as amostras submetidas a tratamento térmico, cada amostra foi aquecida convencionalmente a 65 °C; atingida essa temperatura, foi aplicada a tensão de aproximadamente 25 V e iniciada a passagem de corrente elétrica alternada na frequência escolhida (10 Hz e 10 kHz). O tratamento elétrico prosseguiu por 20 minutos. Analogamente ao experimento convencional, a temperatura foi medida por termopares inseridos em dois pontos da célula ôhmica e monitorada ao longo do experimento.

Finalizado o tempo de tratamento, a amostra foi resfriada rapidamente, da mesma forma que ocorreu para tratamento convencional, com o uso de banho de resfriamento (5 °C) até atingir 20 °C. Para cada amostra, duas alíquotas de 50 mL foram transferidas com pipeta para frascos Erlenmeyer esterilizados e por fim armazenadas em geladeira até o momento do inóculo.

### **3.4 Fermentação**

Após a conclusão de todos os tratamentos, as amostras de caldo de cana foram inoculadas simultaneamente, na proporção de 10 % de inóculo, e colocadas em Shaker (CT-712RN, CIENTEC, Brasil) para a fermentação. A fermentação prosseguiu por um período total de 24h em temperatura de 37 °C e velocidade de agitação de 100 rpm.

Foram coletadas, de forma asséptica, alíquotas de 5 mL de vinhaça após 12 e 18 h de cultivo. Essas alíquotas foram colocadas em tubos falcon e centrifugadas por 15 min a 3°C e 3500 rpm. O sobrenadante de cada amostra foi recolhido e guardado em congelador para posterior quantificação de açúcares residuais e etanol produzido.

Ao final de 24 h de fermentação, foram recolhidas alíquotas de 10 mL de vinhaça em tubos falcon previamente pesados. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi recolhido e guardado em congelador. O material precipitado (biomassa residual) foi colocado em estufa a 80 °C por aproximadamente 72h.

### **3.5 Quantificação de biomassa celular**

Após 72 h em estufa (após atingir massa constante) a quantidade de biomassa ao final do cultivo foi estimada por método gravimétrico utilizando balança analítica (AY220, SHIMADZU, Japão).

### **3.6 Quantificação de açúcares residuais e etanol**

#### *3.6.1 Preparação de soluções padrão*

Foram preparadas soluções padrão de glicose, frutose e etanol para posterior plotagem de curvas padrão para quantificação dessas substâncias nas amostras obtidas após a fermentação. O açúcar majoritário presente na cana de açúcar é a sacarose, mas optou-se por preparar soluções de glicose e frutose (açúcares que formam a sacarose) pois a coluna cromatográfica utilizada na análise posterior quantifica frutose e glicose.

As curvas padrão obtidas para glicose e frutose são válidas para concentrações entre 0,5 e 6 g.L<sup>-1</sup>. A curva obtida para etanol é válida para concentrações entre 0,5 % v/v e 7 % v/v.

### 3.6.2 *Preparação de amostras para análise*

As amostras obtidas da fermentação foram diluídas e filtradas previamente à análise em HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). As amostras obtidas após 12 h, 17 h e 24 h de fermentação foram diluídas em água destilada nas proporções 1:10, 1:5, 1:3, respectivamente, e não diluídas, respeitando concentração de cada curva padrão. Cabe salientar que, inicialmente, as amostras obtidas após 24 h de fermentação não seriam diluídas, contudo, dadas as elevadas concentrações de açúcares, optou-se pela diluição em proporção 1:3 para que se adequar-se melhor às curvas de calibração. Após a diluição, as amostras foram filtradas em membranas de micro filtração com 13 mm de diâmetro e tamanho de poro nominal de 022 µm.

### 3.6.3 *Análise de açúcares e etanol*

Após a preparação, todas as amostras (produtos da fermentação e amostras padrão) foram colocadas em frascos vial para análise em HPLC. Foi utilizado um HPLC da marca Agilent (modelo 1260 infinity, Estados Unidos), equipado com uma bomba quaternária, um injetor automático, um forno para controle de temperatura e um detector RID (Refractive Index Detector), todos também da marca Agilent e do modelo 1260 infinity. Para separação dos açúcares residuais e etanol, foi utilizada uma coluna cromatográfica Rezex RHM H+ para monossacarídeos (Phenomenex Inc., Torrance, CA, EUA) de dimensões 300 x 7,8 mm.

Para a análise das amostras, foram utilizadas as mesmas condições cromatográficas. Foram injetados 20 µL de amostra, a temperatura do forno foi mantida a 80 °C e o fluxo foi constante de 0,6 mL/min. A fase móvel utilizada foi água Mili - Q (Milipore, França). Após as análises, foram construídas curvas padrão de glicose, frutose e etanol. Com o auxílio destas, foram determinadas as concentrações de glicose, frutose e etanol nos produtos de fermentação.

### 3.6.4 *Análise estatística*

Foi utilizado o suplemento Ferramentas de análise – VBA do Microsoft Excel® para uma análise de variância (ANOVA) com fator único para 95% de significância.

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Tratamentos Térmicos

Dada a baixa resistência térmica das bactérias lácticas, verificada nos estudos de Franchi et al. (2003) e Ceballos-Schiavone (2009), foi utilizada a pasteurização para o tratamento térmico pela sua capacidade na destruição de patógenos com baixa resistência ao calor (Fonseca, 1984). Uma vez que o objetivo do trabalho não foi buscar binômios de tempo/temperatura otimizados para a pasteurização do mosto fermentativo, foi definido o binômio 65 °C/20 min com base na literatura (OLIVEIRA et al., 2007; REZZADORI, 2010).

Conforme descrito no Capítulo 3, os tratamentos foram realizados em duplicata e todas as amostras foram inicialmente aquecidas convencionalmente a 65 °C a fim de garantir curvas de aquecimento iguais para todos os experimentos. Segundo Somavat et al. (2012), a similaridade entre as curvas é necessária para comparar o tratamento convencional ao ôhmico e para uma avaliação conclusiva dos efeitos provocados pela aplicação de campos elétricos moderados na inativação de microrganismos. A agitação implementada, e realizada de forma igual em todos os tratamentos, garantiu a homogeneidade da temperatura no interior do sistema.

A Figura 4.1 mostra as curvas de aquecimento obtidas para os três diferentes tratamentos térmicos realizados. As curvas foram obtidas a partir das médias das temperaturas medidas pelo termopar inserido na célula ôhmica. Os dados foram registrados pelo sistema de aquisição de dados acoplado ao sistema de aquecimento ôhmico, em intervalos de tempo de 5 s.

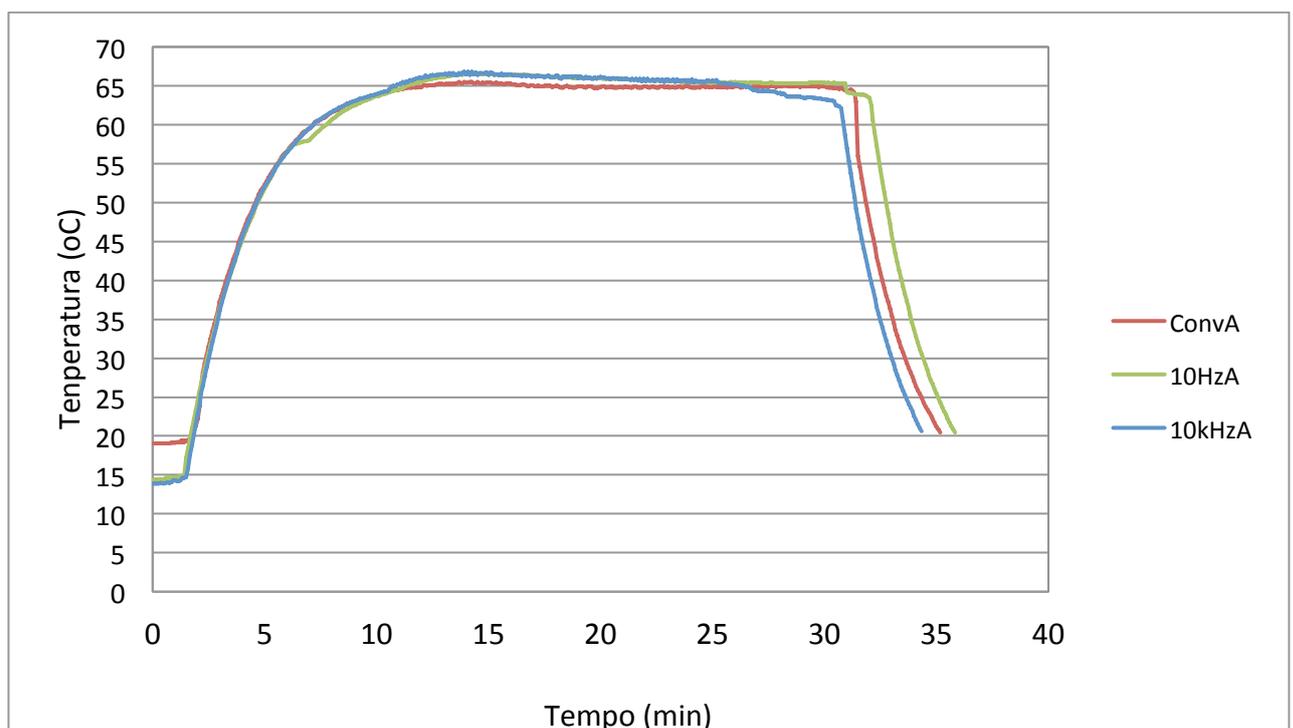


Figura 4.1: Curvas de aquecimento e resfriamento obtidas para a primeira repetição dos diferentes tratamentos realizados.

## 4.2 Concentrações de Sacarose e Etanol nos produtos de fermentação

Após a finalização da fermentação, os produtos foram preparados para a quantificação de açúcares totais e etanol em análise de HPLC conforme descrito no Capítulo 3. As Figuras 4.2 e 4.3 apresentam, respectivamente, as concentrações de sacarose residual e etanol produzido nas amostras processadas pelos diferentes tratamentos térmicos testados e nas amostras controle. Nestes gráficos, foram usados as abreviaturas Conv. Para o aquecimento convencional, e AO o aquecimento ôhmico, os índices A e B representam as repetições da duplicata dos experimentos de tratamento térmico.

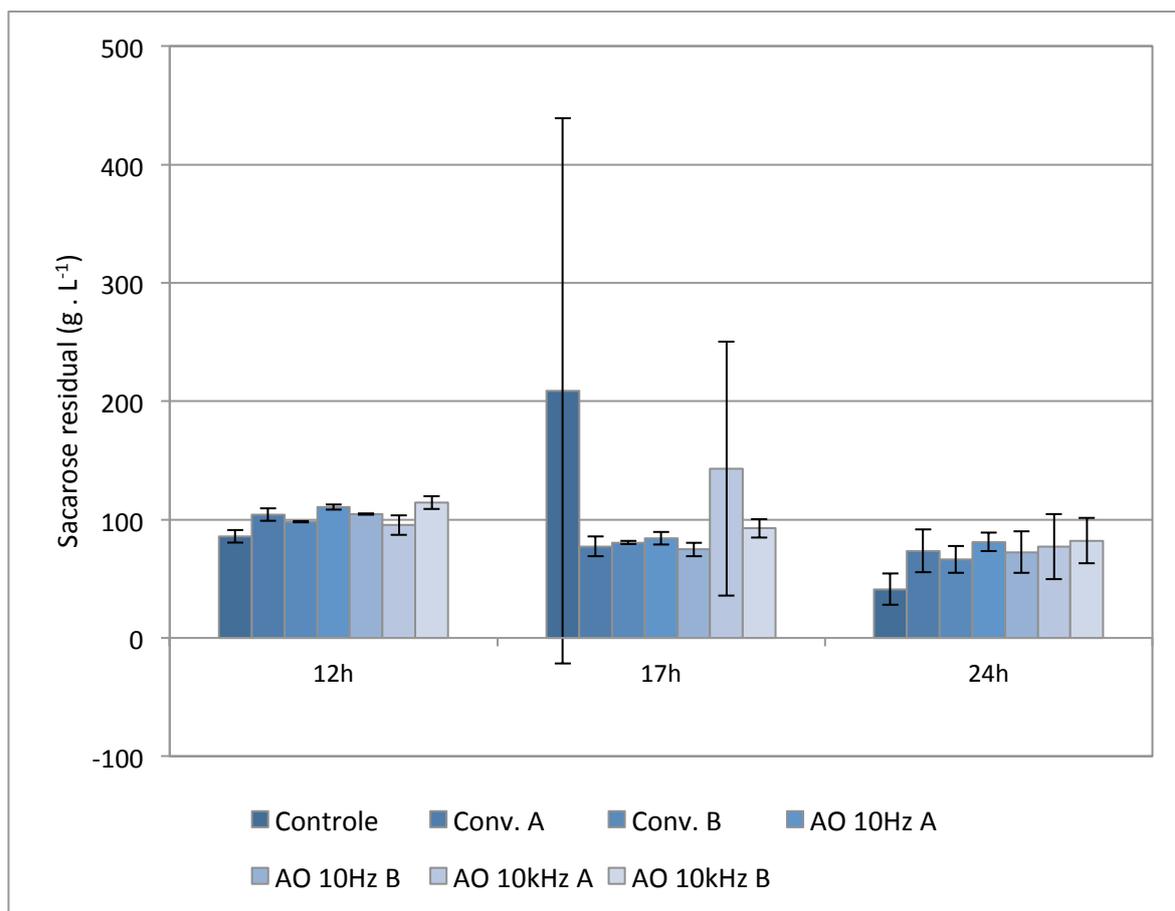


Figura 4.2: Gráfico comparativo das concentrações de sacarose residual ( $\text{g.L}^{-1}$ ) com as barras de erro referentes aos desvios padrão para tempo de fermentação de 12, 17 e 24h.

Ao observar a Figura 4.2 nota-se um consumo na mesma ordem de grandeza para todos os tratamentos, quando analisados para um mesmo tempo de cultivo. A análise de variância realizada confirma que não há diferença significativa de consumo de açúcar para um mesmo tempo nas amostras obtidas com diferentes tratamentos. É importante mencionar que, como não ocorre adição de açúcar durante a fermentação, resultados apresentados com aumento da concentração de sacarose ao longo do cultivo são claramente devido a erro de medida (Controle e Aquecimento Ôhmico 10 kHz A no tempo de 17 h).

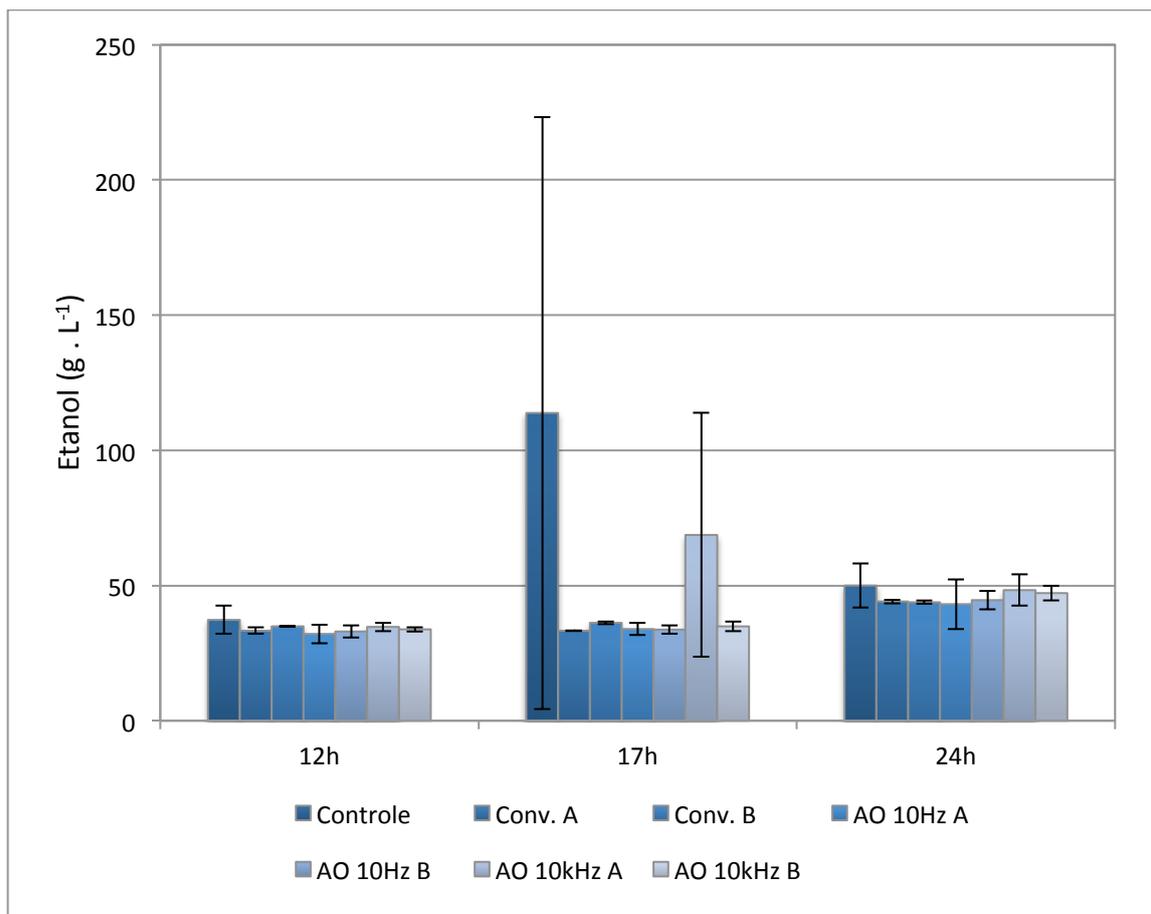


Figura 4.3: Gráfico comparativo das concentrações de etanol ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) com as barras de erro referentes aos desvios padrão para os produtos obtidos em 12 e 24h de fermentação nas amostras processadas pelos diferentes tratamentos térmicos e amostras controle.

A análise dos resultados apresentados na Figura 4.3 mostra que a maior produção de etanol ocorreu após 24 horas de fermentação. Novamente, observam-se problemas nas mesmas amostras citadas na análise de açúcares e uma possível explicação seria erro de diluição durante procedimento de quantificação. Ao realizar análise de variância verifica-se que não se obteve diferença significativa na produção de etanol entre os diferentes tratamentos realizados uma vez que valor de variância (valor F calculado) entre os tratamentos apresentou-se menor do que o mínimo necessário (F crítico).

Os resultados de concentração de etanol nos produtos de fermentação não indicam que a pasteurização do caldo (tanto somente convencional como com passagem de corrente elétrica) tenha ocasionado maior rendimento do processo fermentativo. Esse resultado não era esperado, pois é amplamente conhecida a presença natural de bactérias lácticas na cana de açúcar (GALLO, 1990). Também é de conhecimento geral que essas bactérias inibem o crescimento das leveduras, resultando em menor rendimento na produção de etanol. A sensibilidade térmica dos *Lactobacilli* foi amplamente verificada (Franchi et al., 2003; Nolasco, 2005; Alcarde et al., 2003; Oliveira et al., 2007) dessa forma estimava-se que a pasteurização empregada seria suficiente para eliminação desses microrganismos.

Os resultados também mostraram que não foi possível verificar que a aplicação de campo elétrico moderado aprimorou o processo de pasteurização a ponto de resultar em

uma maior produção de etanol. Conforme outros autores (SOMAVAT et al., 2012; PARK e KANG, 2013; LOGHAVI et al., 2015; LEE et al., 2012) era esperado que ocorresse uma permeabilização temporária da membrana celular das bactérias, a qual, associada à temperatura de processamento, resultaria na inativação desses microrganismos.

Algumas hipóteses foram levantadas para justificar os resultados obtidos, para os quais não foi possível identificar a influência do tipo de tratamento térmico no processo. O tamanho de escala utilizado para os experimentos de pasteurização (aproximadamente 280 mL) e fermentação (50 mL) pode ter sido muito pequeno para a comparação entre tratamentos apenas pela produção de etanol medida. No trabalho de Mutton et al. (2014), os tratamentos propostos foram comparados pela quantidade de etanol produzida, entretanto, os autores usaram, aproximadamente, 2,5L de caldo para cada tratamento e para fermentação.

Outro parâmetro que pode ter influenciado nos resultados é a concentração de bactérias inicialmente presente no caldo. No presente trabalho tentou-se realizar a inativação da flora microbiana naturalmente presente no caldo. A revisão bibliográfica apresentada revela, porém, que essa carga é muito instável. Apesar de as concentrações de contaminantes encontradas serem da ordem de até  $10^8$  UFC / mL de caldo (Lucena et al., 2010), o trabalho de Oliveira et al. (2007) mostra que o período da colheita (início ou final de temporada) da cana influencia na quantidade de contaminantes naturalmente encontrada, sendo que as contaminações são mais acentuadas conforme a temporada de colheita avança. Além disso, não foi realizado um estudo de influência da quantidade de levedura no inóculo. A quantidade de leveduras adicionadas no inóculo pode ter sido grande o suficiente para se sobrepor a contaminação de bactérias presentes inicialmente no caldo.

No presente trabalho foi utilizado caldo de cana *in-natura* obtido no comércio local de Porto Alegre (RS). A temporada para a colheita de cana de açúcar na região Centro-Sul ocorre entre abril e novembro (EMBRAPA). Sendo assim, é possível que a matéria-prima tenha apresentado menor quantidade de contaminantes, pois os experimentos foram realizados em maio. Essa condição junto à escala laboratorial empregada, pode não ter oferecido ambiente suficientemente desfavorável para que o tratamento térmico resultasse em diferença apreciável na produção de etanol. Adicionalmente, em relação ao meio fermentativo utilizado, o caldo de cana obtido em comércio local é destinado ao consumo humano. Em vista dos resultados obtidos, acredita-se que a cana tenha passado por algum processo de higienização, tanto para evitar a degradação, como minimizar a chance de infecções alimentares aos consumidores do caldo.

Foi observado que tanto em estudos de tratamentos térmicos (ALCARDE; WALDER; HORII, 2003; CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009; FRANCHI et al., 2003) como naqueles que empregaram agentes bactericidas (MENECHIN et al., 2008; MUTTON et al., 2014), a redução de carga microbiana devida ao tratamento realizado foi avaliada partindo-se de uma quantidade inicial de microrganismos conhecida. Os meios eram inicialmente esterilizados e, posteriormente, inoculavam-se os microrganismos, simulando a contaminação. Após os resultados obtidos no presente trabalho, avalia-se que essa metodologia tenha sido utilizada para proporcionar um ambiente mais controlado para comparar os tratamentos.

### 4.3 Concentração de Biomassa Celular nos Produtos de Fermentação

A concentração de biomassa celular após 24 h de cultivo foi obtida por método gravimétrico. A Figura 4.3 apresenta as concentrações médias determinadas para os produtos de fermentação obtidos a partir das amostras processadas pelos três diferentes tratamentos e da amostra controle.

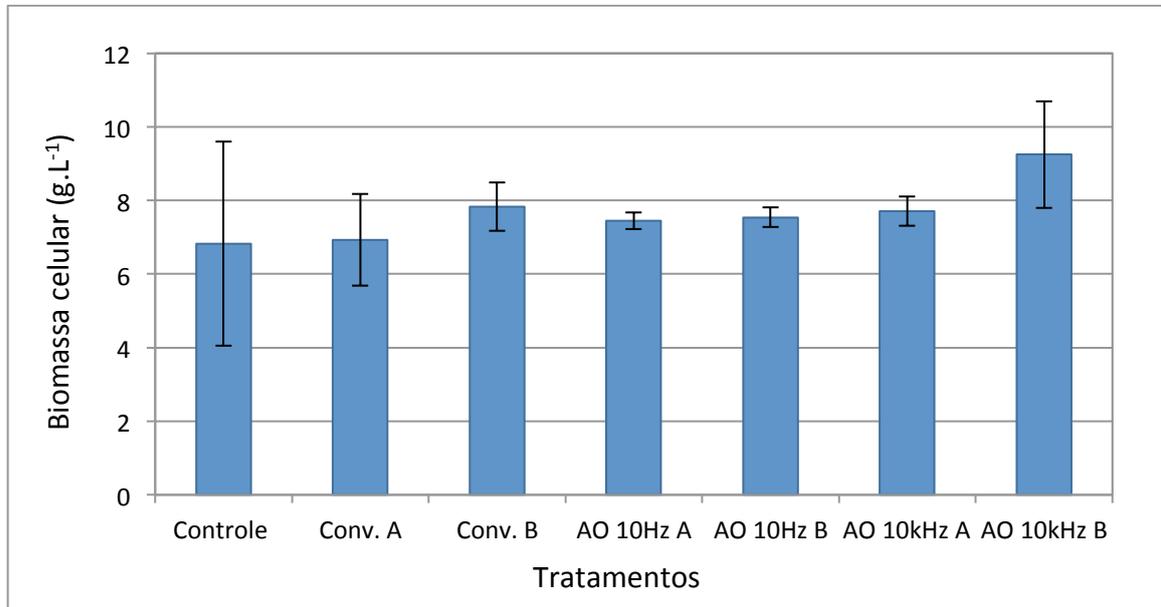


Figura 4.4: Gráfico comparativo das concentrações de biomassa celular após 24h de fermentação das amostras processadas pelos diferentes tratamentos.

Os valores de concentração de biomassa estão relacionados ao crescimento das células de leveduras e, possivelmente de bactérias, ao longo do processo de fermentação. É esperado que o tratamento térmico, por eliminar ou, ao menos, por minimizar os contaminantes bacterianos, ofereça um ambiente que proporcione maior crescimento celular de leveduras.

O resultado da análise estatística confirmou que não houve diferença significativa na concentração de biomassa celular nas amostras processadas pelos diferentes tratamentos, pois valor de variância (valor F calculado) entre os tratamentos apresentou-se menor do que o mínimo necessário (F crítico).

## 5 Conclusões e Trabalhos Futuros

A contaminação por bactérias lácticas, naturalmente presentes no caldo de cana-de-açúcar, é apontada como principal limitação para o aumento no rendimento do processo fermentativo com base nas tecnologias atuais. Sendo assim, o presente trabalho estudou o tratamento térmico com aplicação de campo elétrico moderado para avaliar seu potencial na pasteurização para o controle dessa contaminação.

As concentrações de sacarose, etanol e biomassa celular obtidos para os produtos de fermentação das amostras tratadas termicamente com a aplicação de CEM foram comparadas entre si e às obtidas em produtos de fermentação de amostras controle (que não receberam tratamento) e de amostras processadas por tratamento térmico convencional.

Uma vez que não foi verificado o efeito da pasteurização, tanto pelo tratamento convencional como pelos tratamentos nos quais se aplicou CEM, no incremento da produção de etanol, os resultados obtidos não atenderam ao que, inicialmente, era esperado.

Nas análises de consumo de sacarose e produção de etanol foram observados valores de desvio padrão entre as repetições da duplicata dos experimentos de fermentação muito elevados. Os desvios elevados nos resultados de consumo de sacarose e produção de etanol inviabilizaram a comparação entre os tratamentos.

Para trabalhos futuros, sugere-se que seja utilizada metodologia de contaminação simulada para permitir um ambiente controlado que possibilite a avaliação dos efeitos do tratamento térmico convencional e com a aplicação de CEM do caldo-de-cana no rendimento do processo fermentativo para produção de etanol.

É sugerida também a realização de outras análises, além daquelas realizadas neste trabalho. Estima-se que isso poderia permitir uma avaliação mais completa do potencial dos tratamentos realizados na inativação de patógenos. Nesse âmbito, destaca-se e análise da acidez do produto de fermentação uma vez que os ácidos láctico e acético produzidos por bactérias tem relação com o menor rendimento na produção de etanol por fermentação de caldo de cana de açúcar. Além disto, sugere-se visualização por microscópio e plaqueamento para diferenciar os microrganismos que permanecem no meio.

Indica-se ainda que uma contagem das bactérias presentes no caldo após o tratamento poderia permitir resultados mais detalhados em relação ao potencial da aplicação de campo elétrico moderado no controle das contaminações do caldo de cana para maior eficiência do processo de fermentação alcoólica mesmo empregando-se uma escala laboratorial como a do caso deste trabalho.

O etanol é uma alternativa energética aos combustíveis fósseis. A produção de etanol via fermentação do caldo de cana de açúcar é um processo dominado e lucrativo, contudo ainda existe espaço para implantação de melhorias que aumentariam o rendimento da etapa de fermentação. O controle bacteriano é uma melhoria que, se

aplicada de forma eficiente, apresentaria resultados satisfatórios a curto prazo pois se aplica a tecnologia de fermentação já existente.

O uso de campos elétricos moderados para inativação de microrganismos tem sido amplamente estudado; os resultados encontrados têm apontado a existência de efeitos adicionais não térmicos pela passagem de corrente elétrica, os quais são geralmente sumarizados na teoria da eletroporação; no entanto os autores concordam que o efeito causado pela eletricidade nos microrganismos ainda não é totalmente compreendido, merecendo assim mais estudos.

## 6 Referências

- ALCARDE, A. R.; WALDER, J. M. M.; HORII, J. Fermentation of irradiated sugarcane must. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 4, p. 677–681, 2003.
- ANDERSON, D. R. Ohmic Heating As an Alternative Food Processing Technology. p. 54, 2008.
- ASLAM, S. et al. Combination of tigecycline and N-acetylcysteine reduces biofilm-embedded bacteria on vascular catheters. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1556–1558, 2007.
- BAEYENS, J. et al. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 47, p. 60–88, 2015.
- BASSO, L.; BASSO, T.; ROCHA, S. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. **Biofuel production - Recent Developments and Prospects**, v. 1530, p. 85–100, 2011.
- BECKNER, M.; IVEY, M. L.; PHISTER, T. G. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 387–394, 2011.
- CEBALLOS-SCHIAVONE, C. H. D. M. S. M. Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacterianos – Lactobacillus - na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento por etanol. p. 1–177, 2009.
- DE OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Susceptibility of Saccharomyces cerevisiae and lactic acid bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 10–14, 2001.
- EMBRAPA Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_97\\_22122006154841.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_97_22122006154841.html)>.
- FELLOWS, P. J. Dielectric, Ohmic and Inductive Heating. In: **Food processing and technology - Principles and practice**. 2. ed. [s.l.] CRC Press LLC, 2005. p. 365–383.
- FONSECA, H. Princípios e métodos gerais de conservação de alimentos: conservação pelo calor e pelo frio. In: CAMARGO, R. (Ed.). **Tecnologia dos produtos agropecuários: alimentos**. [s.l.] Nobel, 1984. p. 73–95.
- FRANCHI, M. A. et al. Thermal death kinetics of bacterial contaminants during cane sugar and alcohol production. **International Sugar Journal**, v. 105, n. 1259, p. 527–530, 2003.
- GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. [s.l.] Estadual de Campinas – Unicamp, 1990.

GHNIMI, S. et al. Design and performance evaluation of an ohmic heating unit for thermal processing of highly viscous liquids. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 86, n. 6, p. 626–632, 2008.

GOLDEMBERG, J. Biomassa e Energia. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 582–587, 2009.

GOULLIEUX, A.; PAIN, J.-P. Ohmic Heating. In: SUN, D.-W. (Ed.). . **Emerging Technologies for Food Processing**. 1. ed. [s.l.] AMERICAN PRESS, 2005. p. 792.

KNIRSCH, M. C. et al. Ohmic heating - a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 9, p. 436–441, 2010.

LEE, S.-Y. et al. Effect of continuous ohmic heating to inactivate Escherichia coli O157:H7, Salmonella Typhimurium and Listeria monocytogenes in orange juice and tomato juice. **Journal of applied microbiology**, v. 112, p. 723–31, 2012a.

LEE, S.-Y. et al. Effect of continuous ohmic heating to inactivate Escherichia coli O157:H7, Salmonella Typhimurium and Listeria monocytogenes in orange juice and tomato juice. **Journal of applied microbiology**, v. 112, n. 1, p. 723–31, 2012b.

LOGHAVI, L.; SASTRY, S. K.; YOUSEF, A. E. Effect of Moderate Electric Field Frequency and Growth Stage on the Cell Membrane Permeability of Lactobacillus acidophilus. 2015.

LUCENA, B. T. L. et al. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 298, 2010.

LUDWIG, K. M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D. F. DE. Quantificação da floculação de Saccharomyces cerevisiae por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 63–66, 2001.

MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E. A; SILVA, J. E. A R. Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 7, p. 582–595, 2008.

MENEGHIN, S. P. et al. Chlorine dioxide against bacteria and yeasts from the alcoholic fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 337–343, 2008.

MERCALI, G. D. **Tratamento térmico de polpa de acerola via aquecimento ôhmico**. 2013. 237p. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

MUTHAIYAN, A.; LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, n. 3, p. 351–370, 2011.

MUTTON, M. J. R. et al. Green and brown propolis : e ffi cient natural biocides for the control of bacterial contamination of alcoholic fermentation of distilled beverage. v. 2014, n. 006469, p. 767–772, 2014.

NETO, P. D. O. et al. Chemical Inhibition of the Contaminant *Lactobacillus fermentum* from Distilleries Producing Fuel Bioethanol. v. 57, n. June, p. 441–447, 2014.

NOLASCO, J. J. **Desenvolvimento de processo térmico otimizado para mosto de caldo de cana na fermentação alcoólica.** [s.l.: s.n.].

OLIVEIRA, A. C. G. DE et al. Efeitos do processamento térmico e da radiação gama na conservação de caldo de cana puro e adicionado de suco de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 863–873, 2007.

PACHECO, T. F. *Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração?* 2011.

PARK, I.-K.; KANG, D.-H. Effect of Electropermeabilization by Ohmic Heating for Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* in Buffered Peptone Water and Apple Juice. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 23, p. 7122–9, 2013.

PEREIRA, R. et al. Death kinetics of *Escherichia coli* in goat milk and *Bacillus licheniformis* in cloudberry jam treated by ohmic heating. **Chemical Papers**, v. 61, n. 2, p. 121–126, 2007.

PRADO, J. L. **USO DE ANTIBIÓTICOS CONVENCIONAIS E ANTIMICROBIANOS A BASE DE LÚPULO NO CONTROLE DA INFECÇÃO BACTERIANA EM FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.** [s.l.] UNESP, 2014.

REZZADORI, K. **Pasteurização Térmica e com Membranas do Caldo de Cana Adicionado de Suco de Maracujá.** [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2010.

SASTRY, S. K. et al. Why Ohmic Heating? Advantages, Applications, Technology, and Limitations. In: RAMASWAMY et al. (Eds.). . **Ohmic Heating in Food Processing.** [s.l.] CRC Press, 2010. p. 487.

SASTRY, S. K.; BARACH, J. T. Ohmic and inductive heating.pdf. **Knetics of Microbial Inactivation for Alternative Processing Technologies**, 2000.

SKINNER, K. A.; LEATHERS, T. D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 401–408, 2004.

SKINNER-NEMEC, K. A.; NICHOLS, N. N.; LEATHERS, T. D. Biofilm formation by bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 3, p. 379–383, 2007.

SOMAVAT, R. et al. Accelerated inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores by ohmic heating. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 1, p. 69–76, 2012.

SOMAVAT, R.; MOHAMED, H. M. H.; SASTRY, S. K. Inactivation kinetics of *Bacillus coagulans* spores under ohmic and conventional heating. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 194–198, 2013.

WU, L. et al. Efficient conversion of sugarcane stalks into ethanol employing low temperature alkali pretreatment method. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 24, p. 11183–11188, 2011.