

YURI MANOEL DINIZ DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ÁCIDO LÁCTICO NO PROCESSO DE
PRODUÇÃO DE ETANOL E IDENTIFICAÇÃO DAS ETAPAS CRÍTICAS PARA O
SEU MONITORAMENTO**

YURI MANOEL DINIZ DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ÁCIDO LÁCTICO NO PROCESSO DE
PRODUÇÃO DE ETANOL E IDENTIFICAÇÃO DAS ETAPAS CRÍTICAS PARA O
SEU MONITORAMENTO**

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à banca examinadora do Instituto
Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de
Goiás – *Câmpus* Itumbiara, como parte dos
requisitos necessários para obtenção do título de
Licenciado em Química.

Área de concentração: Tecnologia Química

Orientador: Msc. Leonardo Magalhães de Castro

Coorientador: Dr. Fernando dos Reis de Carvalho

Itumbiara
2017

Ficha Catalográfica

N244a Nascimento, Yuri Manoel Diniz do
Avaliação da presença de ácido láctico no processo de
produção de etanol e identificação das etapas críticas para o
seu monitoramento / Yuri Manoel Diniz do Nascimento. --
Itumbiara, 2017.
39 f. : il. color. ; 30 cm.

Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura em química) -
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás,
campus Itumbiara, 2017.
Orientador: prof. Me. Leonardo Magalhães de Castro.

1. Álcool - Indústria - Brasil. 2. Contaminação microbiana
- Minas Gerais. 3. Ácido láctico. 4. Tecnologia química. I.
Título. II. Castro, Leonardo Magalhães, orient.

CDD 660

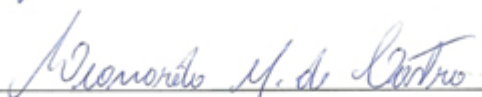
YURI MANOEL DINIZ DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ÁCIDO LÁCTICO NO PROCESSO DE
PRODUÇÃO DE ETANOL E IDENTIFICAÇÃO DAS ETAPAS CRÍTICAS PARA O
SEU MONITORAMENTO**

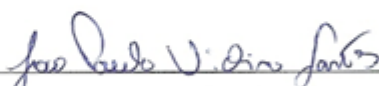
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Licenciatura em
Química do Instituto Federal de Educação, Ciência
e Tecnologia de Goiás (IFG), Câmpus Itumbiara,
como parte dos requisitos para a conclusão do
Curso de Licenciatura em Química e obtenção do
título de licenciado em Química.

Área de concentração: Tecnologia Química.

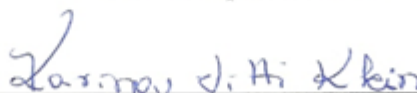
Aprovada em 29 de junho de 2017.



Prof(a). Msc. Leonardo Magalhães de Castro
Orientador(a)
IFG – Câmpus Itumbiara



Prof. Dr. João Paulo Victorino Santos
IFG – Câmpus Itumbiara



Profa. Msc. Karina Vitti Klein
IFG – Câmpus Itumbiara

Itumbiara - GO
2017

Dedico este trabalho de conclusão da graduação a Deus, à minha família e à minha noiva Vanessa, que me incentivaram e ajudaram para que fosse possível a concretização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia De Goiás - Câmpus Itumbiara pela oportunidade concedida para a realização do curso de graduação e desenvolver este trabalho.

À minha noiva Vanessa Campos Santana pelo amor, dedicação, apoio e motivação.

Ao Prof. Orientador Msc. Leonardo Magalhães de Castro pela atenção, dedicação nas correções e orientações neste período de aprendizado.

Ao Prof. Coorientador Dr. Fernando dos Reis de Carvalho pelas revisões e importantes contribuições.

À usina sucroalcooleira que permitiu à realização deste trabalho, concedendo as amostras e equipamentos necessários à conclusão dos experimentos.

Aos professores, colegas e amigos pelos ensinamentos e convivência compartilhados.

À todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para concretização deste trabalho, servidores do IFG - Câmpus Itumbiara fica a minha gratidão.

RESUMO

A contaminação bacteriana é um grave problema enfrentado pelas indústrias sucroalcooleiras. As bactérias presentes no caldo de cana consomem a sacarose e produzem ácido láctico, o que se reflete em perdas de rendimento e produtividade na fabricação do etanol, além de prejudicar as leveduras no processo fermentativo. Neste contexto, estudos específicos da presença do ácido láctico no processo fermentativo podem contribuir com informações importantes no controle de processo. O presente estudo foi realizado com amostras coletadas em uma usina de açúcar e álcool do estado de Minas Gerais durante a safra 2016/2017. Foram realizadas análises de pH, acidez total e quantificação de ácido láctico. O baixo pH do caldo PCTS (caldo de cana não processada) pode indicar deterioração na matéria-prima, onde a presença de ácido láctico serve como indicador da qualidade microbiológica. O pH médio encontrado na cana e no caldo PCTS foi de, respectivamente, 4,90 e 4,98, indicando início de deterioração da cana. O aumento crescente do teor de ácido láctico no processo pode evidenciar indiretamente a contaminação em equipamentos e consequentemente perdas de açúcares fermentescíveis. Neste estudo foram encontrados índices crescentes de ácido láctico a partir do mosto antes do trocador de calor, com valor de 556 mg/L, sendo que no início de processo (caldo PCTS e caldo secundário) os valores foram em média 106 mg/L e 149 mg/L. Nas dornas de fermentação foram encontrados valores de ácido láctico de 932 mg/L, 1199 mg/L e 1559 mg/L. Na avaliação da correlação entre acidez total determinada por titulação e análise do ácido láctico por método instrumental verificou-se que cerca de 93% do aumento do valor da acidez total pode ser explicado por uma relação linear com a produção de ácido láctico durante o processo de fermentação alcoólica, dessa forma a acidez total pode ser usada como um indicador indireto da contaminação por bactérias lácticas no processo de fabricação. A formação de ácido láctico durante o processo de produção de etanol, caracterizada pela presença de bactérias contaminantes ao processo, induz a perdas significativas de etanol. O monitoramento da presença de ácido láctico no processo de produção de etanol deve ser constante, intensificando-se a partir da etapa de tratamento do caldo, composição do mosto e principalmente na fermentação.

Palavras chave: produção de etanol; contaminação bacteriana; ácido láctico.

ABSTRACT

Bacterial contamination is a serious problem faced by the sugar and alcohol industries. The bacteria present in the sugar cane juice consume sucrose and produce lactic acid, which is reflected in losses of yield and productivity in the manufacture of ethanol, in addition to harming the yeast in the fermentation process. In this context, specific studies of the lactic acid presence in the fermentation process may contribute important information in the process control. The present study was conducted with samples collected at a sugar and alcohol mill in the state of Minas Gerais during the 2016/2017 harvest. Analyzes of pH, total acidity and lactic acid quantification were performed. The low pH of the PCTS broth (unprocessed cane juice) may indicate deterioration in the raw material, where the presence of lactic acid serves as indicator of microbiological quality. The average pH found in cane and PCTS broth was 4.90 and 4.98 indicating early cane deterioration. The increasing lactic acid content in the process may indirectly evidence contamination in equipment and consequently fermentable sugar losses. In this study, increasing lactic acid values were obtained from the must prior to the heat exchanger, with a value of 556 mg/L, and at the beginning of the process (PCTS broth and secondary broth) the values were on average 106 mg/L And 149 mg/L. In the fermentation tanks, lactic acid values of 932 mg/L, 1199 mg/L and 1559 mg/L were found. In the evaluation of the correlation between total acidity determined by titration and analysis of lactic acid by instrumental method, it was found that about 93% of the increase in the value of total acidity can be explained by a linear relation with the production of lactic acid during the Alcoholic fermentation, thus the total acidity can be used as an indirect indicator of lactic acid contamination in the manufacturing process. The formation of lactic acid during the ethanol production process, characterized by the presence of contaminating bacteria in the process, induces significant losses of ethanol. The monitoring of the presence of lactic acid in the ethanol production process must be constant, intensifying from the treatment stage of the broth, composition of the wort and mainly in the fermentation.

Keywords: ethanol production; bacterial contamination; lactic acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fórmula estrutural do etanol.....	04
Figura 2: Evolução da produção de etanol no Brasil nos últimos 10 anos.....	05
Figura 3: Fluxograma da fabricação do etanol.....	06
Figura 4: Reação de Gay-Lussac.....	09
Figura 5: Esquema resumido da glicólise	11
Figura 6: Destino do piruvato na fermentação alcoólica.....	12
Figura 7: Fórmula estrutural do ácido láctico	12
Figura 8: Redução de piruvato a lactato pela enzima lactato-desidrogenase.....	13
Figura 9: Fluxograma do processo de fabricação do etanol.....	19
Figura 10: Princípios de funcionamento do aparelho portátil da Roche	20
Figura 11: Valores médios de pH nos pontos de controle.....	24
Figura 12: Valores médios de ácido láctico nos pontos de controle	25
Figura 13: Valores médios de acidez total nos pontos de controle	26
Figura 14: Relação entre acidez total e ácido láctico nos pontos de controle.....	27
Figura 15: Análise de regressão linear entre entre acidez total e ácido láctico nos pontos de controle	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Antibacterianos usados na fermentação alcoólica e respectivos modos de ação, efeito e tipos de bactérias sensíveis	16
Tabela 2: Descrição dos pontos de coleta das amostras	18
Tabela 3: Resultados analíticos médios de pH, acidez total e ácido láctico nos diferentes estágios sequenciais de processamento do caldo de cana para produção de etanol	22
Tabela 4: Dados referentes às dosagens de ácido láctico das amostras coletadas na Usina Santa Maria (J. Pilon) em 5/7/2007	26
Tabela 5: Resultados analíticos para cálculo do balanço de massa do ácido láctico na fermentação	29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 JUSTIFICATIVA.....	2
1.2. OBJETIVO GERAL.....	3
1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 O ETANOL	4
2.2 FABRICAÇÃO DO ETANOL	5
2.3 ETAPAS DA FABRICAÇÃO DO ETANOL.....	7
2.4 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	11
2.5 O ÁCIDO LÁCTICO	12
2.6 CONTAMINAÇÃO DO MOSTO	14
3. METODOLOGIA.....	18
3.1. AMOSTRAGEM.....	18
3.2. PREPARO DAS AMOSTRAS	20
3.3. QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO LÁCTICO	20
3.4. DETERMINAÇÃO DO pH	21
3.5. DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TOTAL	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	22
4.1. RESULTADOS DAS ANÁLISES DE pH, ACIDEZ TOTAL E ÁCIDO LÁCTICO	22
4.2. AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE A ACIDEZ TOTAL E ÁCIDO LÁCTICO	27
4.3. ANÁLISE DA REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL EM VIRTUDE DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO	29
5. CONCLUSÃO.....	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXO A.....	37
ANEXO B.....	39

1. INTRODUÇÃO

Desde o Brasil Colônia, a cana-de-açúcar tem um grande valor comercial para o país. É a principal matéria-prima para a produção de açúcar e etanol. A cultura é ainda mais favorecida devido à grande importância estratégica como nova matriz energética e a criação de programas de incentivos fiscais (CRESTANA, 2006).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, isto ocorre porque apresenta uma vasta área territorial e um clima propício para o cultivo da cultura. São mais de 300 usinas de açúcar e álcool que processam cerca de 400 milhões de toneladas de cana por ano (FERRI et al., 2014). Segundo a União da Agroindústria Canavieira (2016), a produção de etanol na safra 2014/2015 foi um recorde dos últimos 10 anos, sendo produzidos 28.394.000m³ de etanol no Brasil.

O etanol é obtido da cana-de-açúcar por processo fermentativo, que se caracteriza por um processo biológico anaeróbico que converte os açúcares em etanol. O principal agente da fermentação é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que se alimenta dos açúcares presentes no caldo para obter energia para suas funções vitais e, conseqüentemente, produz o etanol (AMORIM, 2005). A fermentação é uma das etapas mais importantes e sem dúvida a mais crítica do processo. É necessário um controle de todos os fatores do processo que podem diminuir a produtividade do etanol (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009).

Dentre os vários fatores que interferem na fermentação, a contaminação bacteriana é um grave problema enfrentado pelas indústrias sucroalcooleiras. O processo de obtenção do caldo deve ser cercado de cuidados, pois, é um meio bastante favorável ao desenvolvimento de microrganismos, sendo necessário manter condições de assepsia desde a moagem, para não haver contaminação com microrganismos indesejáveis à fermentação (MOREIRA et al., 2009). As bactérias presentes no caldo consomem a sacarose e produzem ácido láctico, o que se reflete em perdas de rendimento da fabricação do etanol. Levando-se em consideração somente as bactérias homofermentativas, pode-se estimar que uma molécula de ácido láctico equivale a uma molécula de sacarose perdida e uma molécula de etanol não produzida. Perdas de rendimento em etanol de 1 a 5% foram observadas em contaminações com 10⁸ *Lactobacillus*/mL de mosto em fermentação (VENTURA, 2007).

1.1 JUSTIFICATIVA

O ácido láctico é produto do metabolismo das bactérias lácticas que contaminam a fermentação alcoólica. Portanto, a quantificação do ácido láctico é diretamente proporcional à população bacteriana efetivamente viável e ativa no processo. Cada molécula de ácido láctico presente no vinho¹ corresponde a uma molécula de etanol que deixou de ser produzida. Além, das perdas de rendimento e produtividade, a presença de ácido prejudica as leveduras e compromete o processo fermentativo (VENTURA, 2007).

Estudos específicos da presença do ácido láctico no processo fermentativo podem contribuir com informações importantes no controle de processo, bem como subsidiar tomadas de decisões para a melhoria da produtividade. O monitoramento da presença do ácido láctico durante a fabricação do etanol é uma prática rotineira nas usinas sucroalcooleiras, sendo um indicativo fundamental para uma intervenção direta no processo de fabricação, como a higienização das instalações. O método mais utilizado para a avaliação da presença de ácido láctico é o enzimático, método instrumental que por meio de um analisador automático identifica a presença de lactato L(+). Em muitos casos, por ser uma metodologia de custo elevado, pode se tornar inviável sua utilização diária. Outros parâmetros químicos de processo pode ser um bom indicativo da presença do ácido láctico, como é o caso da acidez, que também quantifica o ácido láctico produzido na fermentação bacteriana.

As etapas do processo de fabricação do etanol possibilitam condições favoráveis ao desenvolvimento de bactérias que produzem o ácido láctico, sendo fundamental identificar a partir de qual etapa a presença de ácido láctico já indica níveis insatisfatórios dessa substância, assim possibilitando ações preventivas para redução e/ou eliminação da contaminação bacteriana.

Neste contexto, para o desenvolvimento do setor sucroenergético, é necessário conhecer, analisar e aprimorar as etapas de produção do etanol. Sendo assim, o presente projeto visa avaliar a presença de ácido láctico no processo de produção de etanol assim como identificar as etapas críticas para seu monitoramento.

¹ Os substratos depois da fermentação são denominados vinho - uma mistura de substâncias líquidas, sólidas e gasosas de constituição variável.

1.2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de ácido láctico no processo de produção de etanol e identificar as etapas críticas para seu monitoramento.

1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a incidência de ácido láctico no processo de produção de etanol em uma usina do estado de Minas Gerais.
- Identificar as etapas de monitoramento de ácido láctico que são críticas no processo de produção de etanol.
- Analisar a interferência da presença do ácido láctico na produtividade do etanol.
- Avaliar a relação entre acidez total e a quantidade de ácido láctico e verificar a utilização deste parâmetro como indicador indireto da presença do ácido láctico.
- Avaliar a interferência do ácido láctico na produção do etanol.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O ETANOL

O etanol, também chamado álcool etílico (Figura 1) ou álcool comum, de fórmula molecular C_2H_6O é largamente empregado em vários seguimentos industriais. O etanol é um líquido incolor, de odor ardente e espontaneamente inflamável. No estado desidratado é solúvel em diversas substâncias orgânicas ou minerais, como ésteres, carburante e acetona (CHIEPPE JÚNIOR, 2012).

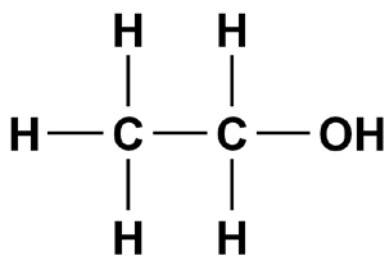


Figura 1. Fórmula estrutural do etanol.

Fonte: Adaptado de CHIEPPE JÚNIOR, 2012.

Esse composto é encontrado em bebidas alcoólicas, usado como solvente na área farmacêutica, na preparação de muitas substâncias e como combustível nos motores a explosão (substituindo a gasolina). Com a necessidade de se buscar novas tecnologias na aplicação dos combustíveis para o desenvolvimento sustentável e com o foco nos mercados, as empresas do seguimento produtivo do álcool combustível voltaram a dedicar uma maior produtividade com enfoque na qualidade (ANDRADE; CARVALHO; SOUZA, 2009).

O etanol pode ser obtido a partir de várias matérias-primas, no entanto, no Brasil é obtido principalmente da cana-de-açúcar, devido ao clima propício para a cultura e custo-benefício desta matéria-prima para as indústrias sucroalcooleiras (ANDRADE; CARVALHO; SOUZA, 2009). Na Figura 2, podemos verificar a evolução da produção de etanol no Brasil nos últimos 10 anos.

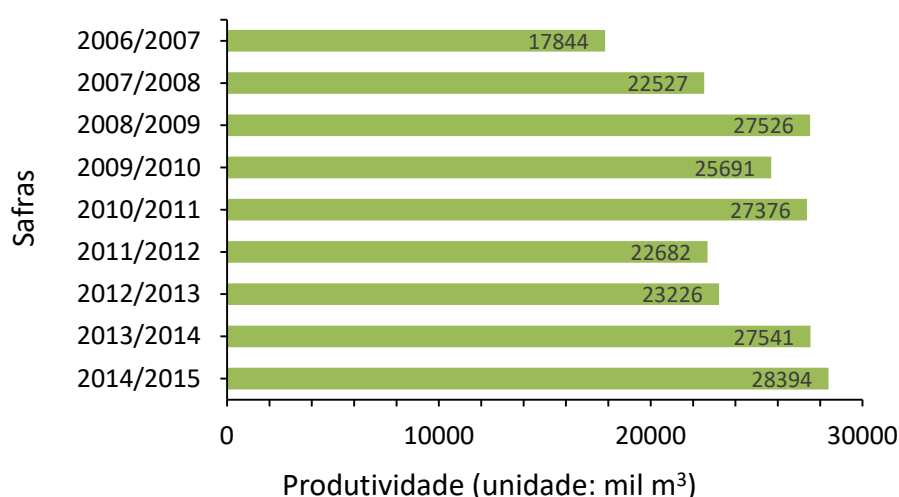


Figura 2. Evolução da produção de etanol no Brasil nos últimos 10 anos
Fonte: UNICA, 2016.

2.2 FABRICAÇÃO DO ETANOL

Segundo Novacana (2005), o Brasil apresenta dois períodos distintos de safra: de setembro a março no Norte-Nordeste, e de abril a novembro no Centro-Sul. Estima-se que para cada tonelada de cana moída produz-se em torno de 71 kg de açúcar e 42 litros de etanol.

Na produção do etanol é necessário diferenciar o etanol anidro (álcool etílico anidro) do etanol hidratado (álcool etílico hidratado) (CHIEPPE JÚNIOR, 2012):

- Anidro: o álcool anidro é caracterizado pelo teor alcoólico mínimo de 99,3° (INPM) Instituto Nacional de Pesos e Medidas, composto apenas de etanol ou álcool etílico. É utilizado como combustível para veículos (gasolina C) e como matéria-prima na indústria de tintas, solventes e vernizes.
- Hidratado: é uma mistura hidroalcoólica com teor alcoólico mínimo de 92,6° (INPM) composto por álcool etílico ou etanol. O álcool hidratado é usado na indústria farmacêutica, alcoolquímica e de bebidas, no combustível para veículos e em produtos para limpeza. O etanol é também usado como matéria-prima para a produção de vinagre e ácido acético.

O processo de fabricação do etanol está representado na Figura 3 e logo em seguida, a descrição das etapas.

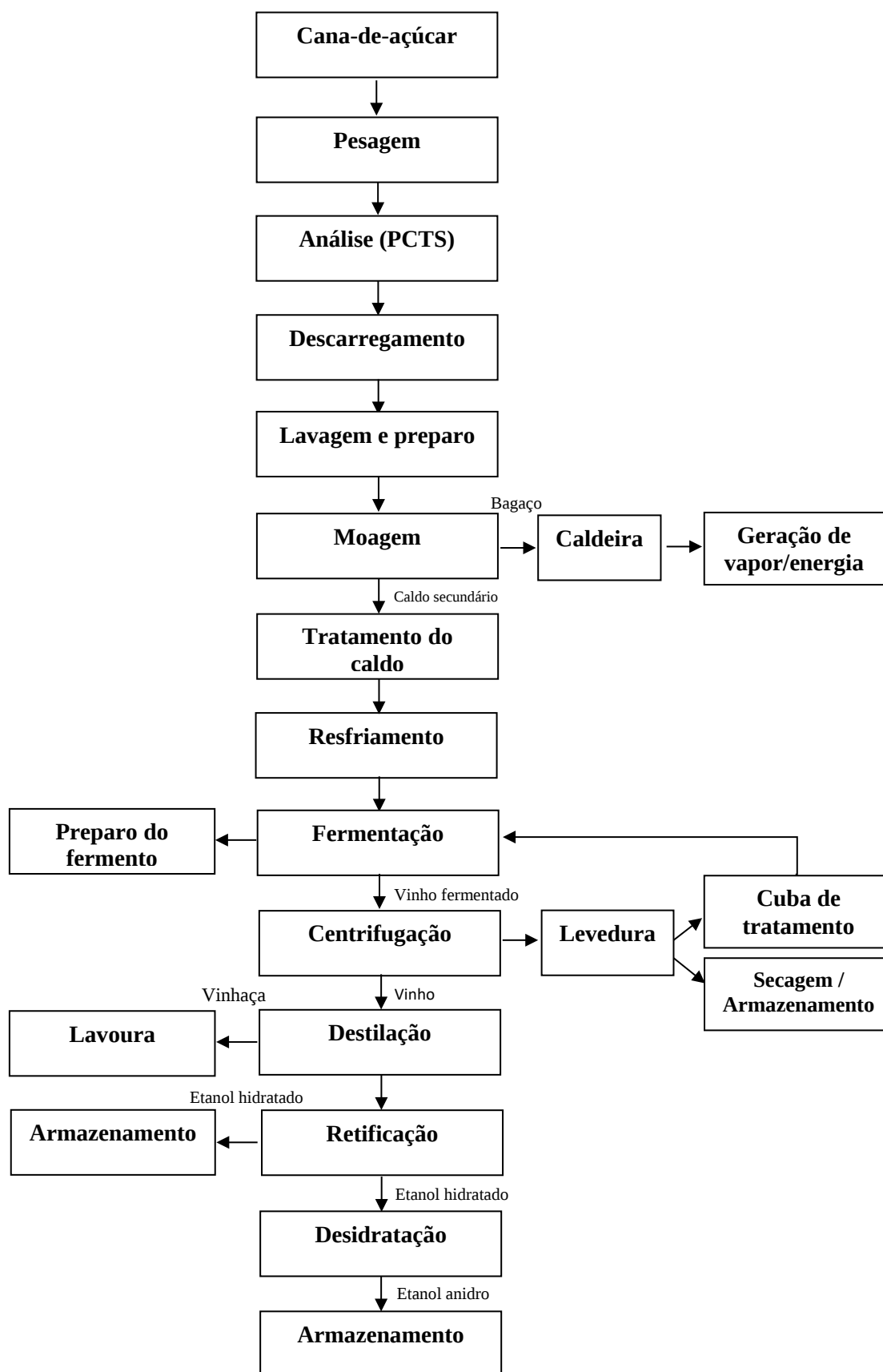


Figura 3. Fluxograma da fabricação do etanol
 Fonte: O autor.

2.3 ETAPAS DA FABRICAÇÃO DO ETANOL

CANA-DE AÇÚCAR: é a matéria prima principal para a indústria sucroalcooleira brasileira. A colheita, carregamento, transporte, pesagem, pagamento da cana pela qualidade, descarregamento e lavagem são intervenções determinantes para um bom comportamento industrial. A cana que chega a unidade industrial é processada o mais rápido possível, devido ao sincronismo entre o corte e a moagem, pois, a cana é uma matéria-prima sujeita a contaminação e conseqüentemente, de fácil deterioração (CTC, 2005).

PESAGEM: toda cana que entra na usina é pesada em balanças tipo plataforma. Pesa-se o caminhão com carga ao entrar na indústria e novamente na saída, já vazio, obtendo-se o peso da cana pela diferença. A pesagem é necessária para controlar: a quantidade de matéria prima, pagamento, cálculo da eficiência dos equipamentos e eficiência global da usina, assim como para quantificar eventuais perdas. Alguns caminhões são escolhidos dentro de um sistema estatístico preestabelecido para retirada de amostras na sonda, no laboratório de PCTS - Pagamento de Cana por Teor de Sacarose (CTC, 2005).

RECEPÇÃO E PREPARO: após passar pela balança, o veículo carregado desloca-se para o ponto de descarga da usina. Das mesas alimentadoras, a cana segue para a lavagem, após a lavagem a cana passa por picadores que trituram os colmos, preparando para moagem. Nesse processo, as células da cana são abertas sem perda do caldo, a cana desfibrada é exposta entre rolos submetidos a uma pressão que expulsa o caldo do interior das células. Em seguida, a cana é despejada nas mesas metálicas e encaminhada para a moagem (CTC, 2005).

MOAGEM: nesta fase do processamento da cana, o objetivo principal é extrair ao máximo o açúcar contido na cana através da remoção do caldo. Esta remoção é conseguida por meio de sucessivos esmagamentos da camada de bagaço à medida que essa camada passa pelos ternos de moenda. Além do esmagamento, é necessária também a adição de água ou caldo de embebição a partir do 2º terno de moenda, visando à diluição do açúcar existente na cana. Após a moagem o caldo é direcionado para o tratamento e o bagaço é direcionado para a caldeira para geração de vapor e energia elétrica (CAMARGO, 1990).

TRATAMENTO DE CALDO PARA FERMENTAÇÃO: o tratamento do caldo designado à produção de álcool é o mesmo tratamento realizado com o caldo destinado à produção de açúcar. O caldo precisa ser tratado para que seja garantida a qualidade de todo processo. O tratamento consiste em eliminar o excesso de sólidos em suspensão no caldo, conservar seus nutrientes e reduzir a atividade de microrganismos prejudiciais ao processo de fabricação do etanol. O tratamento do caldo inicia-se com a peneiração, para remoção do bagacilho e de outros sólidos, como areia ainda remanescente que não foi eliminada na lavagem da cana, entre outros. Em seguida, o caldo é aquecido a 105°C sem adição de produtos químicos e, logo depois, passa pelo processo de decantação. Após a decantação, o caldo clarificado irá para a pré-evaporação, no qual o mesmo é aquecido a 115°C, favorecendo a evaporação da água e a concentração a 20°Brix². Esse aquecimento favorece a fermentação por fazer uma “esterilização” do caldo reduzindo a população das bactérias e leveduras selvagens que concorreriam com a levedura do processo (COPERSUCAR, 1985).

RESFRIAMENTO DO CALDO: ao contrário do que ocorre na fabricação do açúcar, o caldo que servirá como matéria-prima na produção de álcool, deve ser resfriado. É comum a troca de calor do caldo aquecido com o caldo resfriado. Se a temperatura não for suficiente, o caldo que vai para a destilaria deve passar em um trocador de calor no qual trocará calor com água fria até atingir a temperatura de 30°C (COPERSUCAR, 1985).

PREPARO DO MOSTO: o mosto é um líquido açucarado que pode ser fermentado, é composto de caldo clarificado, melaço e água. O caldo quente que vem do pré-evaporador é resfriado a 30°C em trocadores de calor tipo placa e é enviado às dornas de fermentação, ele define as condições gerais de trabalho para a condução da fermentação como regulação da vazão, devido o teor de açúcares e temperaturas, usando-se densímetros, medidores de vazão e controlador de °Brix automático para monitorar o processo (COPERSUCAR, 1985).

PREPARO DO FERMENTO: os mostos preparados industrialmente devem ser inoculados com as leveduras, que são os microrganismos responsáveis pela fermentação alcoólica. Para que a fermentação tenha uma condução satisfatória, é necessário que se adicione aos mostos uma quantidade compatível de microrganismos capazes de transformar rapidamente os açúcares em álcool e gás carbônico. Os fermentos ou “pés-de-cuba” são o inóculo inicial. Na

² °Brix: mede o teor de sólidos solúveis no caldo, cujo valor, no caso do caldo de cana, é próximo ao teor da sacarose.

maioria das destilarias brasileiras é empregado como inóculo inicial o fermento desidratado, dada a possibilidade de compra da quantidade inicialmente necessária, evitando-se a operação de multiplicação e seus riscos. Esse tipo de inoculação é chamado de partida direta, pois não é necessária a multiplicação prévia dos fermentos. No caso da utilização de cultura pura, é requerido da indústria um melhor nível tecnológico, pois, a partir de pequenas quantidades de levedura seca viva ou acondicionada em tubos de cultura, deve-se produzir a quantidade inicial necessária (RIBEIRO, 2007).

FERMENTAÇÃO: a fermentação acontece em tanques designados como dornas de fermentação, no qual o mosto é misturado com o fermento ajustado (pé-de-cuba) na proporção de 2/1, respectivamente. Os açúcares (sacarose, glicose e frutose) são transformados em álcool segundo a reação de Gay-Lussac representada na Figura 4 (AMORIM, 2005):

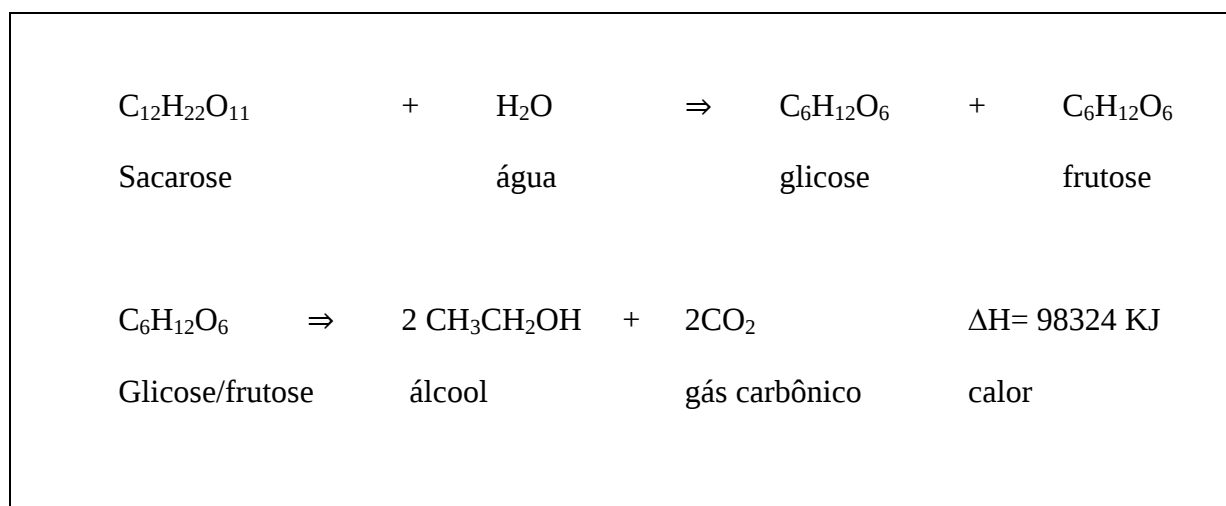


Figura 4. Representação da reação de Gay-Lussac.
Fonte: Adaptado de AMORIM, 2005.

Conforme observado na Figura 4, a fermentação produz gás carbônico e calor. O gás é lavado de modo a restaurar o álcool evaporado e arrastado pelo CO_2 . Devido ao calor liberado e a necessidade de se manter a temperatura da fermentação por volta de $32^\circ C$, é adotado um sistema de resfriamento. Após um tempo de 4 a 12 horas, a fermentação finaliza gerando um produto final de teor alcoólico entre 7 e 10%, denominado vinho fermentado (AMORIM, 2005).

CENTRIFUGAÇÃO DO VINHO: depois de encerrada a fermentação, o mosto denomina-se vinho, o qual será utilizado no processo de destilação para a obtenção do etanol. Das dornas de fermentação, o vinho é centrifugado de modo a separar o fermento. Este fermento restaurado é denominado leite de levedura e retorna às cubas de alimentação. O vinho delevurado é enviado à dorna volante e depois às colunas de destilação (RIBEIRO, 2007).

DESTILAÇÃO: o vinho que vem da fermentação possui, em sua composição, 7 a 10 °GL em volume de álcool, além de outros componentes de natureza líquida, sólida e gasosa. Dentre os líquidos, além do álcool, encontra-se a água (com teores de 89 a 93%), glicerina, álcoois homólogos superiores³, furfural, aldeído acético, ácidos succínico e acético, em quantidades bem menores. Já os sólidos são representados por bagacilho, leveduras e bactérias, açúcares não-fermentescíveis, sais minerais, matérias albuminoides e outros, e os gasosos, principalmente pelo CO₂ (gás carbônico) e SO₂ (dióxido de enxofre). O álcool presente neste vinho é recuperado pela destilação, processo que se utiliza dos diferentes pontos de ebulição das diversas substâncias voláteis presentes, separando-as. Nessa etapa o etanol é separado do vinho. O vinho, inicialmente com 7 a 10°GL é decomposto em duas correntes, flegma (vapores com 40 a 50 °GL) e vinhaça (que segue para a lavoura como fertilizante com menos de 0,03°GL). Essa etapa de destilação elimina ainda impurezas como aldeídos e ésteres (DELGADO, 1975).

RETIFICAÇÃO: a etapa de correção visa concentrar a flegma natural da destilação de forma a alcançar um grau alcoólico de 96°GL na saída e retirar impurezas como álcoois homólogos superiores, aldeídos, ésteres, aminas, ácidos e bases (DELGADO, 1975).

DESIDRATAÇÃO: nessa etapa o etanol hidratado é concentrado para produzir o etanol anidro. A desidratação pode ser de três formas: 1) Destilação azeotrópica, utilizando Ciclohexano; 2) Destilação extrativa, utilizando MEG- Monoetilenoglicol; 3) Desidratação por adsorção, utilizando peneira molecular (ESALQ, 1995).

ARMAZENAMENTO: os álcoois produzidos (hidratado e anidro) são quantificados e armazenados em tanques de amplo volume onde são estocados para futura comercialização (COPERSUCAR, 1988).

³ Álcoois homólogos superiores: álcool isobutílico, álcool amílico e álcool propílico.

2.4 FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

Atualmente, a produção de etanol no Brasil é realizada por processos de fermentação (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009). Segundo Ribeiro (2010) “A fermentação alcoólica é um processo biológico comum a todos os substratos açucarados, no qual estes são transformados em etanol e dióxido de carbono”.

O processo de fermentação alcoólica ocorre através da ação de um grupo de microrganismos unicelulares que são denominadas leveduras. A cepa mais utilizada na produção de etanol é a *Sacchsromyces cerevisiae*. Suas células possuem diâmetros que variam de 2 a 8 micrômetros. Sua reprodução é feita basicamente por brotamento, dando origem a uma nova célula (TOSETTO, 2008).

A levedura é um microrganismo facultativo, sendo assim, tem a capacidade de utilizar duas vias distintas de transformação do açúcar no processo fermentativo. Na primeira denominada glicólise mostrada na Figura 5, a sacarose é degradada até ácido pirúvico, por uma sequência ordenada de reações catalisadas por enzimas específicas (TOSETTO, 2008).

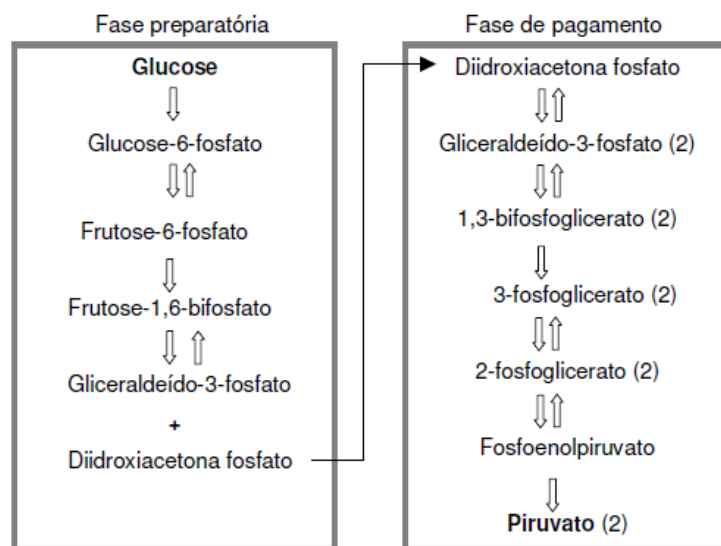


Figura 5. Esquema resumido da glicólise.
Fonte: Adaptado de VENTURA, 2007.

Em anaerobiose, o piruvato é convertido em etanol e CO_2 em um processo de dois passos. Na primeira reação, o piruvato sofre a descarboxilação em uma reação irreversível catalisada pela enzima piruvato descarboxilase. Na segunda reação, através da ação da enzima

álcool desidrogenase, o acetaldeído é reduzido a etanol, na presença do NADH (Figura 6). Assim, a levedura transforma glucose em etanol e CO_2 e não em lactato (VENTURA, 2007).

Na presença de oxigênio, a levedura tem a capacidade de transformar parte do açúcar em CO_2 , biomassa e água. Esta reação ocorre devido o deslocamento reacional de parte do ácido pirúvico para o Ciclo de Krebs onde será oxidado enzimaticamente (TOSETTO, 2008).

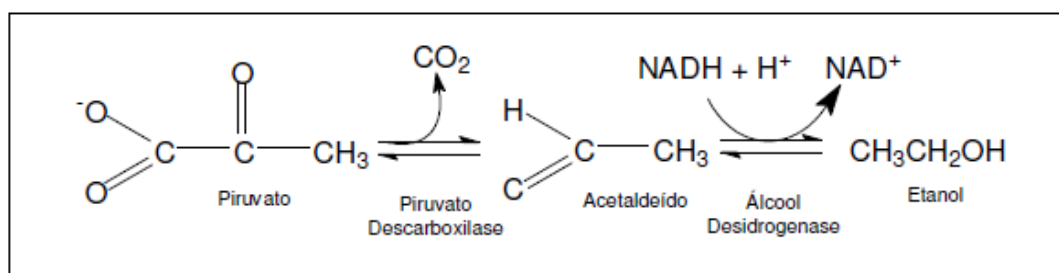


Figura 6. Conversão do piruvato em etanol na fermentação alcoólica.
Fonte: Adaptado de VENTURA, 2007.

No decorrer do processo fermentativo pode ocorrer a contaminação bacteriana, a qual interfere negativamente na produção. As bactérias consomem parcialmente os substratos do meio reduzindo a produção de etanol e também produzem metabólitos tóxicos que inibem as leveduras, favorecendo a floculação e ocasionando a perda de eficiência na fermentação (CARVALHO; MONTEIRO, 2011).

2.5 O ÁCIDO LÁCTICO

O ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanóico), representado na Figura 7, é o principal produto do metabolismo das bactérias contaminantes no mosto de cana de açúcar em fermentações etanólicas.

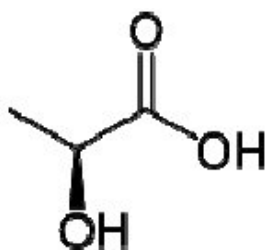


Figura 7. Fórmula estrutural do ácido láctico
Fonte: Adaptado de VENTURA, 2007.

É um líquido viscoso, higroscópico, inodoro, de sabor azedo, ponto de fusão 18°C e ponto de ebulição 122°C; pode ser sintetizado quimicamente ou por via biológica por bactérias lácticas. Pode também, ser produzido nos tecidos musculares em atividades intensas, em que ocorre limitação de oxigênio (VENTURA, 2007).

O principal produto do metabolismo das bactérias lácticas é o ácido láctico, por meio de rota metabólica do piruvato obtido na glicólise. A redução do piruvato a lactato se dá em condição de anaerobiose e é catalisada pela enzima lactato desidrogenase, como pode ser visto na Figura 8. Muitos microrganismos não podem metabolizar o ácido láctico, sendo então, excretado em meio fermentativo (VENTURA, 2007).

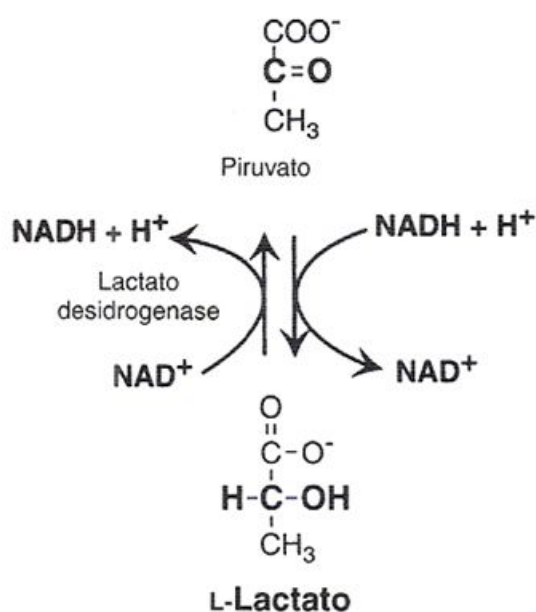


Figura 8. Redução de piruvato a lactato pela enzima lactato-desidrogenase
Fonte: Adaptado de CHAMPE; HARVEY, 2000.

A produção de ácido láctico por certas bactérias tem um objetivo antagônico entre os microrganismos, sendo assim, estes têm como objetivo sua sobrevivência e perpetuação da espécie. Isto inclui a produção de substâncias tóxicas a outras espécies que afetam negativamente a viabilidade das células de leveduras. As leveduras viáveis duram menos tempo na dorna de fermentação e tem que ser substituídas por outras viáveis (NAVES et al, 2010). A concentração inibitória de ácido láctico para a *Saccharomyces cerevisiae* varia de 10-40 g/L, sendo que 80% de diminuição da massa de células de levedura ocorre com 38g/L (VENTURA, 2007).

2.6 CONTAMINAÇÃO DO MOSTO

O processo de fermentação deve ser cercado de cuidados, pois, as bactérias láticas são encontradas desde a etapa inicial do processo, podendo colonizar colmos, raízes e folhas da cana-de-açúcar (matéria-prima) e o mosto. O caldo de cana é um meio bastante favorável ao desenvolvimento de microrganismos que podem sobreviver aos tratamentos do caldo e em condições adversas de pH e temperatura podendo se estabelecer nas dornas de fermentação. As leveduras da fermentação alcoólica competem pelo substrato com bactérias que normalmente habitam as dornas. Um processo de fermentação considerado satisfatório apresenta níveis de bactérias próximos a 10^5 células/mL (ANGELIS, 2010).

A fermentação industrial, pela dimensão do processo, não é conduzida em condições ideais de assepsia. A contaminação bacteriana, principalmente por bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bacillus*, está sempre presente e, dependendo de sua intensidade, compromete o rendimento do processo fermentativo. A quantidade de microrganismos contaminantes na cana-de-açúcar pode variar de acordo com as condições do processo tais como formas de colheita, tipo de transporte, o tempo decorrido entre o corte da cana e seu processamento na usina, armazenamento, estado da matéria-prima ao chegar na usina (limpa, suja, seca, molhada, deteriorada, com raízes) (LOPES, 2008).

As bactérias láticas sobrevivem às condições do processo industrial, pois, toleram altas temperaturas, altos teores de etanol, baixo pH e multiplicam-se rapidamente. Em condições anaeróbias metabolizam glicose convertendo em ácido láctico para obtenção de energia, crescimento e manutenção de suas células; isto leva a diminuição na produção do etanol (LOPES, 2008). Rodini (1985) isolou e identificou microrganismos de mosto fermentado de 17 destilarias. Os gêneros contaminantes mais comuns foram: *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc mesenteroides*, *Micrococcus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus lylae*, *Panococcus* sp. e *Acinetobacter calcoaceticus*.

Mesmo que a contaminação seja uma situação rotineira para as usinas deve se evitar ao máximo a sua ocorrência, em função dos prejuízos que traz. Alguns fatores podem auxiliar no aparecimento desses contaminantes, como as características e qualidade do fermento utilizado, o método de preparo do pé-de-cuba, o não atendimento às condições de pH, concentração do mosto, temperatura, quantidade insuficiente de levedura para a fermentação do mosto, a falta de higiene e limpeza dos equipamentos, do meio, dos operadores, entre outros (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006).

A contaminação bacteriana é indicada pelo aumento da formação de ácido láctico no vinho, sendo o principal problema de redução de rendimento no processo fermentativo visto que cada molécula de glicose que é convertida na produção do ácido láctico resulta na perda de duas moléculas de etanol que poderiam ser produzidas pela levedura. No decorrer do processo fermentativo ocorrem diversas interações entre leveduras e bactérias, principalmente a inibição das leveduras pelas bactérias. Estudos apontam que a contaminação bacteriana leva a uma queda no rendimento fermentativo de até 40% quando apresenta níveis de 10^7 a 10^8 células/mL e quedas de até 90% do rendimento esperado, quando a concentração de bactérias na fermentação atinge níveis de 10^8 a 10^9 células/mL (NAVES et al., 2010).

Lyons (2003) afirma que uma destilaria dificilmente terá uma fermentação estéril e como a levedura é relativamente um microorganismo de crescimento lento, quando comparada com a maioria dos microrganismos infecciosos, torna-se crucial que se tenha formas de controle do desenvolvimento destes contaminantes para proteger o processo fermentativo.

De acordo com Narendranath (2003), os métodos mais utilizados no controle de bactérias na indústria do etanol, incluem limpeza e sanitização eficiente dos equipamentos, lavagem ácida das leveduras e o uso de antibióticos durante a fermentação. Para se reduzir o nível de contaminação bacteriana do mosto é necessário manter uma boa assepsia dos trocadores de calor, eliminação de pontos mortos nas tubulações, realização adequada dos processos de filtração, decantação, clarificação, evaporação e um tratamento térmico do caldo (CARVALHO; MONTEIRO, 2011)

Sabe-se que ao término do processo de fermentação alcoólica, procede a centrifugação do vinho levedurado, onde se faz a separação do vinho a ser destilado para produção de etanol e o creme de leveduras que retornará ao processo fermentativo. Atualmente a lavagem ácida desse fermento de forma contínua é o principal método de controle de contaminantes evitando assim a floculação das células de levedura. O tratamento com ácido sulfúrico é feito reduzindo o pH do fermento diluído em água a uma faixa entre 2,0 e 3,0 e, às vezes até inferior a 2,0, onde pode-se ter prejuízos na viabilidade das células de levedura. Após a adição de ácido sulfúrico e água, o fermento é mantido na cuba sob constante agitação por um período de tempo variável, onde não se deve exceder três horas, em função da queda de viabilidade celular das leveduras provocada pelo contato com o ácido sulfúrico (OLIVA-NETO, 1995).

Lima et al. (2001) também atestam que devido ao fato de não se esterilizar os mostos a serem fermentados é recorrente a utilização de antibióticos nas fermentações industriais para obtenção de etanol. Segundo os autores, a ação sanitizante desses produtos é decorrente das suas propriedades bacteriostáticas, tornando as fermentações mais puras e regulares.

Um fator a ser explorado nas indústrias sucroalcooleiras visando à diminuição de perdas industriais, é a eliminação ou redução dos contaminantes microbiológicos, especialmente as bactérias formadoras do ácido láctico (Valsechi, 2005). A utilização de antibióticos no processo apresenta diversas vantagens, sendo a principal a atuação imediata destes sobre as bactérias sem afetar o microrganismo útil (AQUARONE; SATO, 2001).

Oliva-Neto e Yokoya (2001) avaliaram o efeito antimicrobiano de diversos agentes químicos e alguns antibióticos, através do teste de concentração inibitória mínima (C.I.M) para *S. cerevisiae*, *L. fermentum* e *L. mesenteroides*. Os produtos mais efetivos contra as bactérias e inócuos para a levedura foram os antibióticos clindamicina e penicilina V ácida. Conforme Narendranath (2003) a penicilina já foi bastante estudada e utilizada em fermentações industriais, porém, em detrimento de sua pouca estabilidade em pH<5, outros antibióticos de amplo espectro têm sido empregados.

Tabela 1. Antibacterianos usados na fermentação alcoólica e respectivos modos de ação, efeito e tipos de bactérias sensíveis.

Antibacteriano	Mecanismo de ação	Efeito	Bactérias sensíveis
Bacitracina	Afeta a parede celular	Bactericida	Gram (+)
Cloranfenicol	Inibe síntese de proteínas	Bacteriostático	Gram (+) e (-)
Kamoran	Afeta a bomba iônica	Bactericida	Gram (+)
Lazolacida	Altera a pressão osmótica	Bactericida	Gram (+) e (-)
Monensina	Afeta a membrana celular	Bactericida	Gram (+)
Penicilina G	Inibe síntese da parede celular	Bactericida	Gram (+)
Penicilina V	Inibe síntese da parede celular	Bactericida	Gram (+)
Polimixina	Afeta a membrana celular	Bactericida	Gram (-)
Salinomicina	Afeta a membrana celular	Bactericida	Gram (+)
Streptomicina	Inibe síntese de proteínas	Bactericida	Gram (+) e (-)
Tetraciclina	Inibe síntese de proteínas	Bacteriostático	Gram (+)
Virginiamicina	Inibe síntese de proteínas	Bactericida	Gram (+) e (-)

Fonte: Adaptado de VENTURA, 2007.

Andrietta, Oliveira e Stupiello (1995) avaliaram a concentração de inibição mínima para cinco antimicrobianos em meio de cultivo de inóculos com as variedades *Bacillus* e *Lactobacillus*. A virginiamicina controlou cinco das oito bactérias com a dosagem de 0,25 ppm; a penicilina controlou cinco bactérias com 0,5 ppm e uma com 2 ppm. Quaternário de amônia inibiu todas as 8 bactérias com 10 ppm.

O efeito de Kamoran WP sobre bactérias isoladas da fermentação alcoólica, em indústrias brasileiras, foi estudado por Stroppa et al. (2000). Os resultados apresentaram que o crescimento bacteriano e o consumo de açúcar foram fortemente inibidos pelo antibiótico em todas as dosagens estudadas (1 – 6 ppm). A utilização de Kamoran WP ocasionou grande diminuição da população ao final do ensaio, sem mostrar formação de células resistentes (VENTURA, 2007).

3. METODOLOGIA

O presente trabalho de pesquisa foi conduzido no Laboratório de Processos Industriais do Instituto Federal de Goiás – Campus Itumbiara e no laboratório industrial da usina. As amostras foram coletadas em uma usina de açúcar e álcool estado de Minas Gerais durante a safra 2016/2017.

3.1. AMOSTRAGEM

As amostras foram coletadas *in situ* com a usina sucroalcooleira em operação rotineira para produção de etanol em cinco dias distintos. Foram coletadas duas amostras em cada ponto do processo de acordo com o especificado na Figura 9 e descrito na Tabela 2, as análises foram realizadas em duplicata, totalizando 90 amostras.

Tabela 2. Descrição dos pontos de coleta das amostras.

Amostras	Local da amostragem	Material de amostra
P1	Caldo PCTS (matéria-prima)	Caldo de cana não processada
P2	Calha receptora sob o conjunto de moendas	Caldo de cana secundário
P3	Caixa de caldo misto	Caldo de cana secundário + Caldo filtrado
P4	Caixa receptora de caldo na saída do decantador	Caldo decantado
P5	Tubulação de caldo na entrada dos trocadores de calor	Mosto pré trocadores de calor a placas
P6	Tubulação de saída de caldo dos trocadores de calor	Mosto pós trocadores de calor a placas
P7	Tubulação de saída de fermento da dorna 1 (Início da fermentação)	Vinho levedurado ou levurado
P8	Tubulação de saída de fermento da dorna 3 (Meio da fermentação)	Vinho levedurado ou levurado
P9	Tubulação de saída de fermento da dorna 5 (Final da fermentação)	Vinho levedurado ou levurado

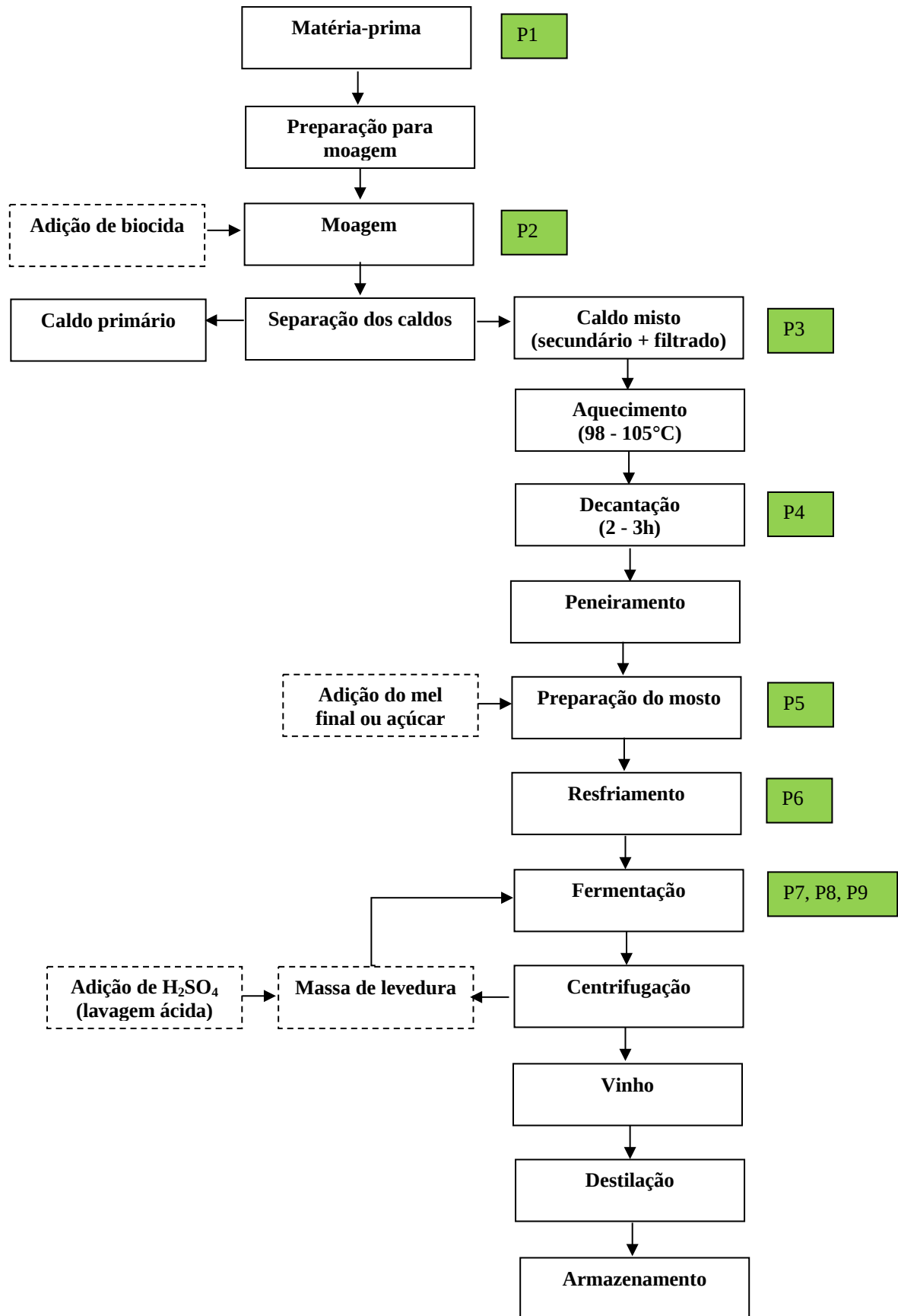


Figura 9. Fluxograma do processo de fabricação do etanol – pontos de amostragem.
Fonte: O autor.

3.2. PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras foram coletadas em frascos esterilizados e armazenadas imediatamente em caixa térmica mantida em refrigeração, até serem encaminhadas ao laboratório e conservadas em congelamento (-18°C) até o momento das análises. As amostras foram descongeladas naturalmente e realizadas as análises à temperatura ambiente. Os caldos PCTS, secundário e secundário + filtrado, foram filtrados à vácuo, para eliminação dos resíduos insolúveis. As amostras retiradas nas dornas 1, 3 e 5 foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 RPM em centrífuga de laboratório para a separação da massa de leveduras.

3.3. QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO LÁCTICO

A quantificação de ácido láctico foi realizada em todas as etapas definidas utilizando-se de método instrumental, através de um analisador automático para identificação de lactato L (+), modelo Accutrend Lactato (Roche AG-Alemanha). O aparelho é dotado de fotômetro de reflexão e fitas reagentes descartáveis impregnadas com enzima imobilizada lactato oxidase (LOx), extraída de *Aerococcus viridans*, linhagem recombinante.

A amostra é colocada sobre uma malha na superfície da fita que retém as células de levedura e, a seguir, permeia até uma camada de fibra de vidro, contendo as enzimas imobilizadas e a zona de detecção. O lactato, em presença de um mediador, é degradado a piruvato em um minuto, através da LOx (reação 3). As etapas das reações no medidor são descritas na Figura 10.

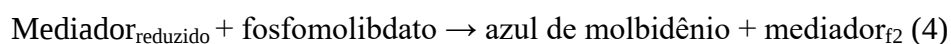
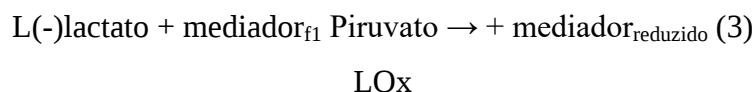


Figura 10. Princípio de funcionamento do aparelho portátil da Roche

O fotômetro de reflexão avalia o resultado dos produtos da reação por colorimetria em 657nm (reação 4). O coeficiente de variação fica na média de 5% e exatidão de 0,957. Efetuados os ajustes e calibrações, descritos no manual do aparelho, foram injetadas 25µL das amostras preparadas, e em cerca de 1 minuto os resultados estavam disponíveis.

A concentração de ácido láctico foi apresentada no aparelho em mmol/L. Para fins deste experimento os resultados da concentração de ácido láctico foram convertidos para mg/L, conforme o esquema seguinte:

$$\text{Massa molar do ácido láctico} = 90 \text{ g/l}$$

$$1 \text{ mol do ácido láctico corresponde a } 90 \text{ g/l}$$

$$1 \text{ mmol/l deste ácido é } = 90 / 1000 = 0,09 \text{ g/l ou } 90 \text{ mg/l}$$

3.4. DETERMINAÇÃO DO pH

O pH foi determinado por potenciometria direta, sendo a análise realizada conforme as normas do Instituto Adolfo Lutz (2008). Foi utilizado medidor de pH, Tecnopon, modelo mPA – 210.

3.5. DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TOTAL

A análise de acidez foi realizada por titulação de neutralização conforme método AOAC (2005) disponível no ANEXO.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação dos resultados da relação entre o método de determinação da acidez total e o de medição do teor de ácido láctico L (+) foi utilizada análise de regressão linear, usando o software Excel (MICROSOFT, 2010). Os resultados também foram submetidos a análise de variância na regressão pelo teste F a um nível de 5% de significância ($p < 0,05$), sendo utilizado o software Excel (MICROSOFT, 2010).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. RESULTADOS DAS ANÁLISES DE pH, ACIDEZ TOTAL E ÁCIDO LÁCTICO

As análises físico-químicas realizadas para fins deste trabalho de pesquisa foram o pH, a acidez total e a quantificação de ácido láctico, sendo os resultados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados analíticos médios de pH, acidez total e ácido láctico nos diferentes estágios sequenciais de processamento do caldo de cana para produção de etanol.

Pontos de amostragem		pH	Acidez total (mg/L)	Ácido láctico (mg/L)
P1	PCTS	4,90	2040	106
P2	Caldo secundário	4,98	1785	149
P3	Caldo Misto (secundário + filtrado)	5,52	1995	234
P4	Caldo decantado	5,35	1980	297
P5	Mosto pré trocador de calor	5,62	2250	556
P6	Mosto pós trocador de calor	5,27	3315	709
P7	Dorna 1	4,40	3720	932
P8	Dorna 3	4,22	4770	1199
P9	Dorna 5	4,31	4710	1559

De acordo com a Tabela 3, o valor médio do pH no caldo PCTS é 4,90. Este resultado indica deterioração da matéria-prima recebida na usina. O caldo PCTS é extraído por meio de sondas oblíquas, que penetram em meio aos feixes de cana, dispostos no interior das carretas, no momento em que estas adentram à usina para efetuar a pesagem. A presença de ácidos orgânicos diminui o pH do caldo de cana, podendo servir de indicador de deterioração da matéria-prima. Segundo Fernandes (2003) uma cana fresca e sadia deve apresentar pH do caldo entre 5,3 a 5,5.

Conforme Oliveira Filho (2010) com uma matéria de qualidade é possível obter melhores resultados na indústria. O processamento de cana com qualidade inferior reduz significativamente a velocidade de trabalho na indústria, aumentando o consumo dos insumos relacionados ao processo, desgaste dos equipamentos ocasionado pela acidez do caldo de cana, produto final com menor qualidade e queda no rendimento industrial.

Mutton (2008) afirma que a cana de açúcar pode sofrer diversos tipos de deteriorações, desde os tratos culturais até a entrega no pátio industrial, dentre estes fatores destacam-se: fisiológicos causados pelo florescimento, queima da cana, inversão da sacarose, entre outros. A deterioração microbiológica da cana, causada pela presença de microrganismos contaminantes, resulta na formação de compostos nocivos à cultura e ao processo industrial tais como: ácidos orgânicos, gomas e polissacarídeos.

Observa-se que o valor médio de pH para o caldo secundário (4,98) também se apresenta abaixo do valor de pH de caldo de cana sadia (5,3 a 5,5), apontando também uma deterioração como no PCTS. Tal fato pode ser devido a deterioração inicial da matéria-prima recebida, que já apresentava alterações de pH.

O caldo misto (secundário + filtrado) apresentou valor médio de pH (5,52) dentro dos valores recomendáveis (5,3 a 5,5), acredita-se que em função do caldo filtrado possuir pH mais elevado, em detrimento da utilização do leite de cal (hidróxido de cálcio) no processo de tratamento do caldo para a produção de açúcar, com o intuito de clarificação e neutralização de pH do caldo. Sendo que este retorna em meio ao caldo secundário, e é resultante da filtragem dos lodos residuais da decantação dos caldos das fábricas de açúcar e etanol.

O caldo decantado e o mosto pré-trocador de calor a placas (resfriamento) apresentam valores médios de pH dentro do valor recomendável, o que pode evidenciar a qualidade no tratamento térmico realizado nos aquecedores pré-decantação do caldo misto.

O mosto pós-trocador de calor a placas (resfriamento) apresentou valor médio de pH inferior ao mosto pré-trocador de calor a placas, deveu-se provavelmente a contaminação bacteriana deste, quando em contato com as placas do equipamento.

Nas dornas de fermentação, percebe-se o decaimento do valor de pH, o que pode ser justificado pela dosagem contínua de ácido sulfúrico na etapa de pré-tratamento do fermento, onde se deve intensificar o controle microbiológico do processo e pelo modelo de fermentação contínuo que é adotado na usina.

Conforme Facciotti (2001) o processo de fermentação contínuo tem por principais características uma alimentação contínua do meio de cultura à uma determinada vazão de caldo a ser fermentado, devendo ser igual ao volume de retirada desse caldo após sofrer fermentação, mantendo assim o volume de reação constante (nível da fermentação estabilizado).

Ainda segundo Eduardo (1991) e Facciotti (2001) as principais vantagens do processo contínuo são: menores equipamentos, tempo de uso otimizado ou maior capacidade de fermentação com os mesmos equipamentos, tempo de fermentação menor, obtenção de caldo fermentado uniforme, menor gasto com mão de obra, maior facilidade no emprego de controle avançados. Porém também existem desvantagens, cuja principal é o aumento da probabilidade de contaminação bacteriana do meio fermentativo.

Portanto o modelo de fermentação contínua é mais susceptível a contaminação bacteriana, devido a este não permitir a completa assepsia dos equipamentos, ocorrerá então uma condição não estéril na fermentação. A variação dos valores de pH nos pontos de coleta pode ser visualizado na Figura 11.

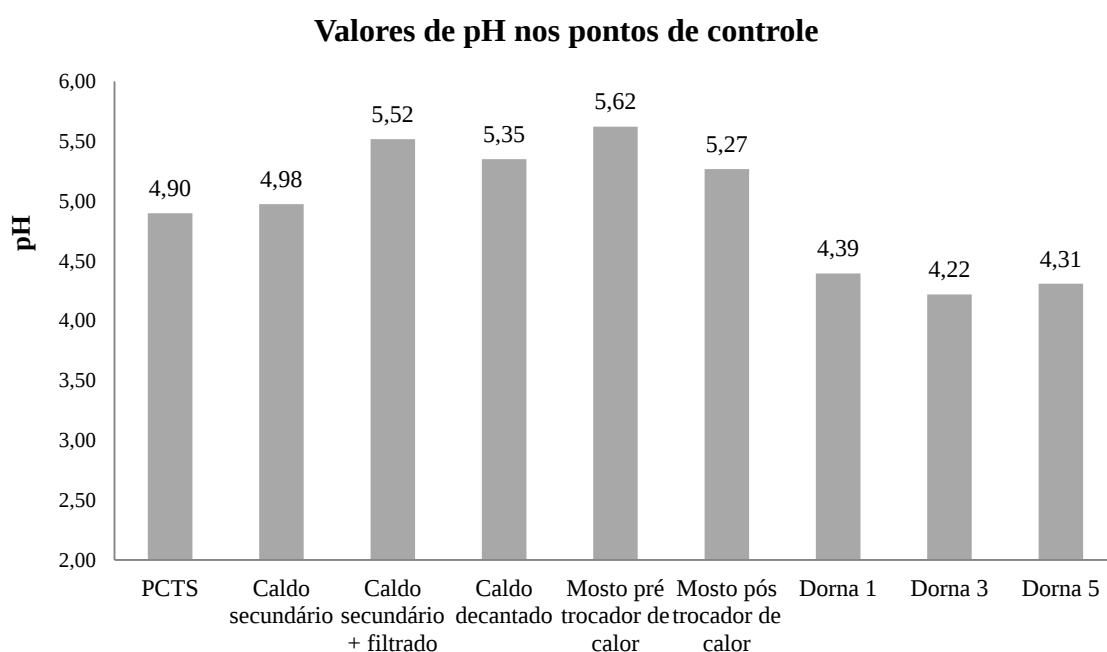


Figura 11. Valores médios de pH nos pontos de controle

Neste experimento pode-se verificar um aumento gradativo na quantidade de ácido láctico, conforme pode ser visto na Figura 12.

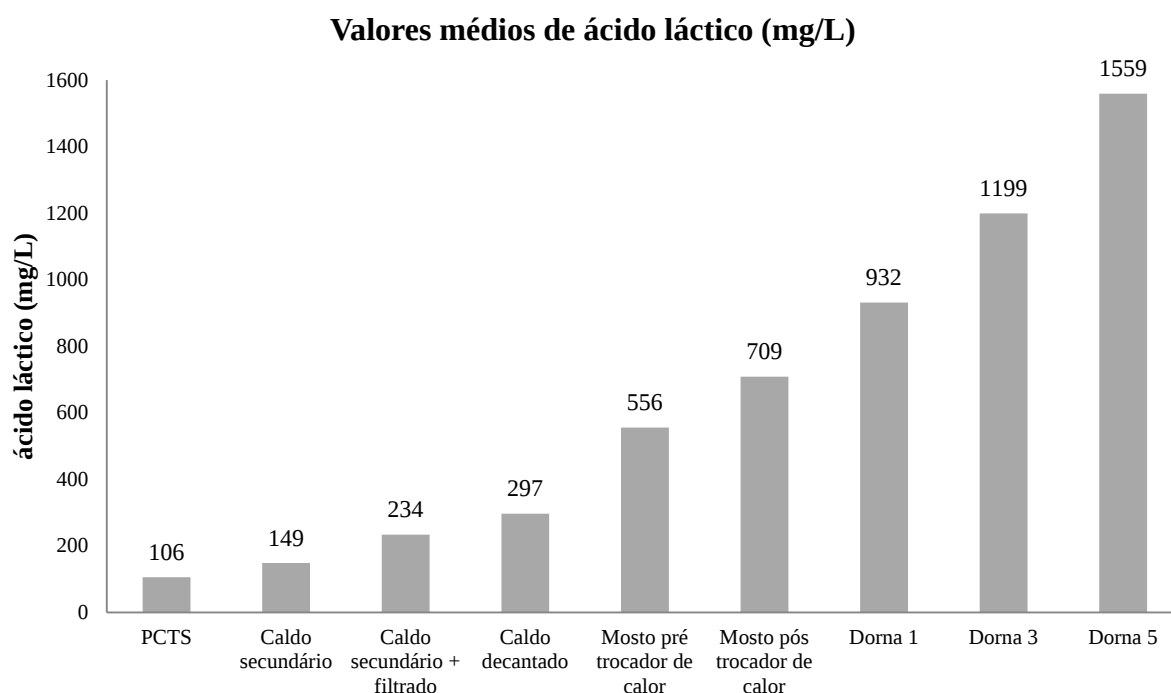


Figura 12. Valores médios de ácido láctico nos pontos de controle

No início do processo (PCTS), a análise se torna necessária para verificar a qualidade e o nível de contaminação decorrente das condições de cultivo, colheita e transporte. Durante o processamento as bactérias lácticas conseguem sobreviver às condições de processo industrial como: dosagem de bactericida, altas temperaturas, baixo pH e altos teores de etanol. Tal fator é evidenciado pelo aumento no teor de ácido láctico durante o processo, uma vez que as fermentações não ocorrem em condições de esterilidade.

Conforme Rossell (2008) a qualidade da água de diluição do mosto e água de lavagem do fermento é muito importante no processo fermentativo. Geralmente, as destilarias captam águas superficiais com teores variáveis de materiais em suspensão, coloides e diversos microrganismos. Sendo que, o tratamento dessa água nem sempre é conduzido de forma adequada, contribuindo para o aumento da população bacteriana presente na fermentação.

Durante o processo fermentativo (amostras A7, A8 e A9) o teor de ácido láctico atingiu valores acima da concentração inibitória mínima de 800 mg/L, conforme Ventura (2007) a partir desse valor registra-se os teores alcoólicos mais baixos e menores crescimentos da levedura. Os resultados obtidos por Moreira et.al (2009) após realizar estudos sobre a dosagem de ácido láctico no processo de produção de etanol via fermentação contínua na usina Santa Maria, localizada no interior de São Paulo, demonstram diferentes concentrações

nas diversas etapas do processo. Pode ser verificada a presença de ácido láctico em todas as etapas do processo de produção de etanol, onde os valores mínimos foram encontrados no mosto e os valores máximos na etapa final da fermentação (Dorna 10) conforme pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4: Dados referentes às dosagens de ácido láctico das amostras coletadas na Usina Santa Maria (J. Pilon) em 5/7/2007.

Amostras	Resultados (mMol/L)
Média Mosto	2,61 ± 0,06
Média Dorna 1	3,86 ± 0,02
Média Dorna 2	3,61 ± 0,20
Média Dorna 3	3,40 ± 0,13
Média Dorna 4	3,92 ± 0,06
Média Dorna 5	3,95 ± 0,12
Média Dorna 6	4,60 ± 0,05
Média Dorna 7	4,64 ± 0,03
Média Dorna 10	4,80 ± 0,05

Fonte: Adaptado de Moreira et. al., 2009.

Em relação à acidez total o comportamento desta variável se mostrou semelhante ao da avaliação do ácido láctico. Os resultados da acidez são apresentados na Figura 13.

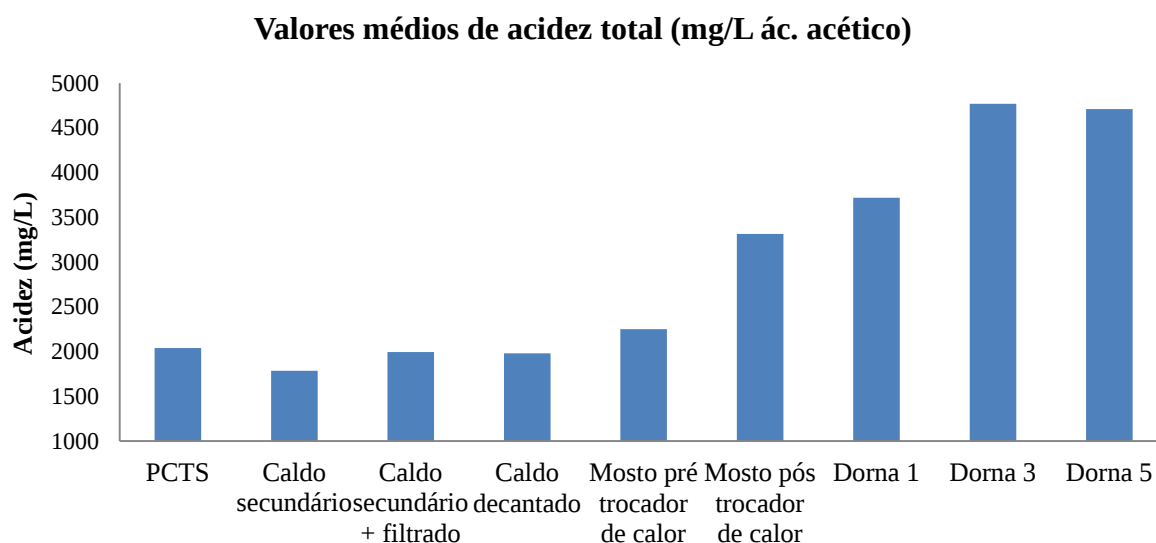


Figura 13. Valores médios de acidez total nos pontos de controle

4.2. AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE A ACIDEZ TOTAL E ÁCIDO LÁCTICO

A presença de ácido láctico no processo de produção de etanol é um sério problema no que se refere ao rendimento. O monitoramento por vezes está restrito a determinados períodos de fabricação podendo ocorrer 12 em 12 horas, onde a identificação do ácido láctico é realizada para fins de verificação do teor desta substância.

O método instrumental utilizado neste experimento tem custo elevado sendo assim, foi realizado acompanhamento da acidez total com a finalidade de se avaliar a correlação entre a presença do ácido láctico com o desenvolvimento da acidez total. Os resultados demonstram que o desenvolvimento da acidez ocorre de forma concomitante ao aumento do teor de ácido láctico, como pode ser observado na Figura 14.

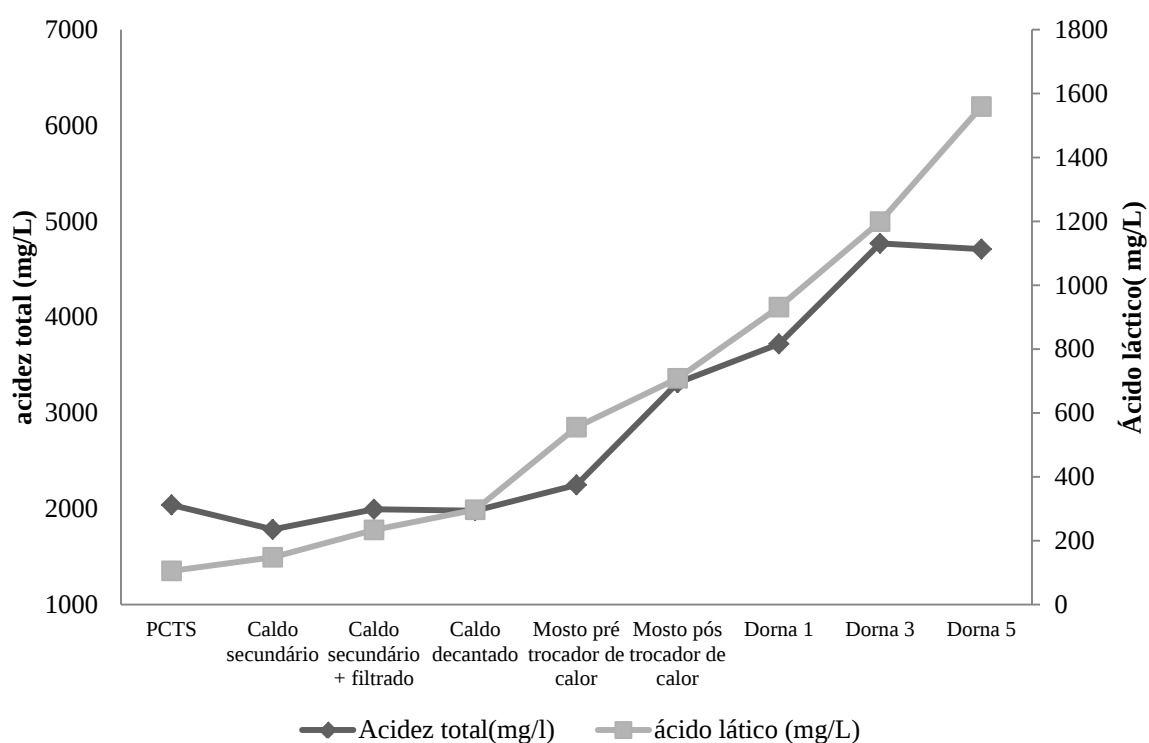


Figura 14. Relação entre acidez total e ácido láctico nos pontos de controle

Observa-se que o desenvolvimento da acidez em todas as etapas do processo de fabricação tem correspondência com a presença de ácido láctico nas respectivas etapas. Tal

relação torna-se mais evidente principalmente a partir do caldo decantado na qual os dois parâmetros apresentam valores crescentes até a última etapa avaliada.

A análise de regressão foi realizada com a finalidade de se estabelecer qual o nível da correlação existente entre os resultados da determinação da acidez total e concentração de ácido láctico obtido pelo método instrumental. A linha de regressão linear pode ser observada na Figura 15.

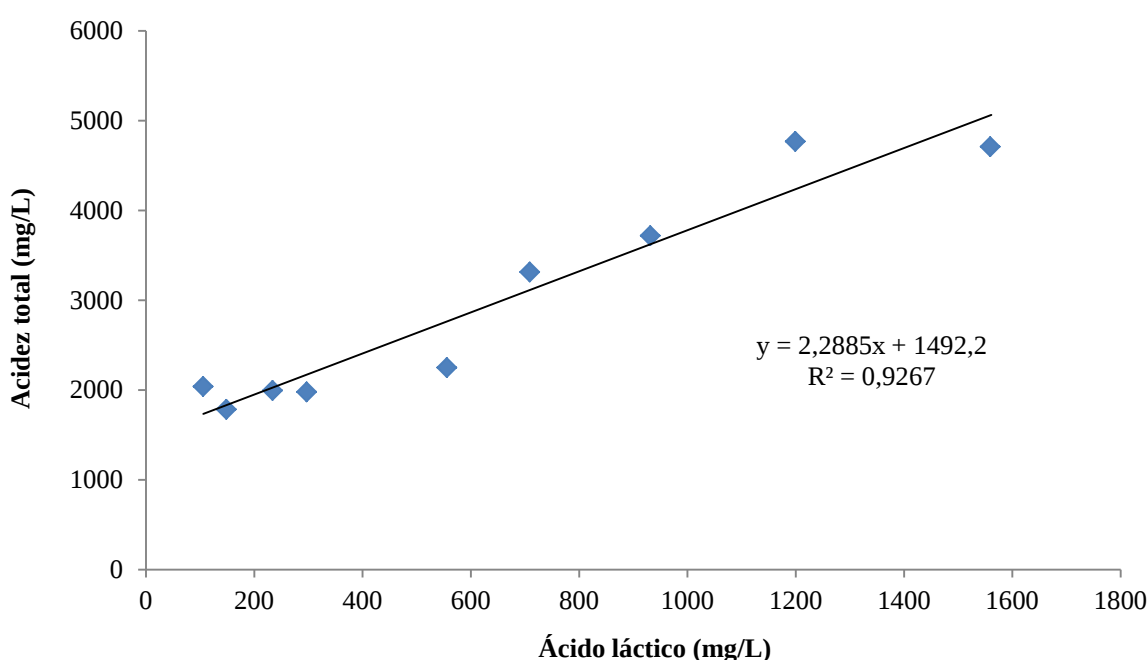


Figura 15. Análise de regressão linear entre acidez total e ácido láctico nos pontos de controle

Pelos resultados infere-se que um aumento nos valores de ácido láctico implica em um aumento nos valores de acidez total, pois o valor de R^2 (R-quadrado), na amostragem observada, indica que cerca de 93% do aumento do valor da acidez total pode ser explicado por uma relação linear com a produção de ácido láctico durante o processo de fermentação alcoólica. No entanto, outros componentes presentes no caldo e mosto antes e pós-fermentação contribuem com a acidez total, que representam 7% de variação.

A análise de variância da regressão entre acidez total determinada por titulação e os valores de ácido láctico pelo método enzimático, no nível de significância considerado (95%)

evidencia que o aumento do valor do ácido láctico é significativo para explicar o aumento nos valores da acidez total.

4.3. ANÁLISE DA REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL EM VIRTUDE DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO

A quantificação do ácido láctico formado no processo de fermentação alcoólica (excetuando-se o ácido láctico que está entrando no sistema através do substrato é aquele que recircula em meio a creme de leveduras) pode ser determinada com base no cálculo da acidez produzida na fermentação, conforme COPERSUCAR (2001) e Fernandes (2003) e em cálculos de balanço de massa por estequiometria de processo industrial, descritos por Gomide (1979) conforme a equação 1:

$$QAL = QV \times VV - (QM \times VM - QL \times VL) \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

QAL = teor de ácido láctico produzido na fermentação (Kg)

QV = teor de ácido láctico no vinho (Kg/ m³)

VV = volume de vinho fermentado (m³)

QM = teor de ácido láctico no mosto (Kg/ m³)

VM = volume de mosto alimentado no reator (m³)

QL = ácido láctico no levedo tratado (Kg/m³)

VL = volume de levedo inoculado no fermentador (pé de cuba) (m³)

A Tabela 5 apresenta os resultados analíticos para cálculo do balanço de massa do ácido láctico na fermentação.

Tabela 5. Resultados analíticos para cálculo do balanço de massa do ácido láctico na fermentação.

Amostras/dados de processo	Volume/tempo (m³/h)	Leitura (mmol/l)	Leitura (mg/L)	Leitura (g/m³)	Leitura (kg/m³)	Ácido láctico total (kg)
Fermento tratado	80	4,94	444,6	444,6	0,446	35,68
Mosto alimentação	150	7,87	708,3	708,3	0,7083	106,245
Vinho fermentado	225	17,32	1559	1559	1,559	350,775

Fonte: Dados do autor.

Abaixo segue o demonstrativo do cálculo do balanço de massa do ácido láctico na fermentação.

$$QAL = QV \times VV - (QM \times VM - QL \times VL)$$

$$QAL = 1,559 \times 225 - (0,7083 \times 150 + 0,446 \times 80)$$

$$QAL = 208,85 \text{ Kg}$$

Dados:

Massa molar do etanol = 46 g/mol

Massa molar da glicose = 180 g/mol

Densidade do etanol = 0,7894 g/cm³

Etanol massa teórica = 0,5111

Etanol absoluto = 0,6475

Cálculo 1:

Massa molar do etanol = 46 g/mol

Massa molar do ácido láctico = 90 g/mol

Então: 208,85 Kg de ácido láctico x 46 / 90 / 0,7894

Volume de ácido láctico em etanol será = 135,22 L

Cálculo 2:

$$208850 / 90 = 2320,55 \text{ mols}$$

1 mol de glicose ----- 2 mols de ácido láctico

X mols ----- 2320,55 mols

$$X = 1160,275 \text{ mols de glicose}$$

$$1160,275 \times 180 = 208849,5 \text{ g} / 1000 = 208,8495 \text{ Kg de glicose} \times 0,6475$$

Volume de ácido láctico em etanol é 135,23 L

Considerando-se que são centrifugadas 24 dornas por dia, sendo que cada uma apresenta capacidade volumétrica 225 m³, pode-se afirmar através do cálculo do balanço de massa de ácido láctico produzido na fermentação que o volume da perda diária de etanol será de 3245,28 litros. Tomando por base o preço do etanol anidro no site da União dos Produtores de Bioenergia (UDOP) em 2017 no valor de R\$ 1,6325, a perda seria de R\$ 5.297,91/dia.

Diante a estimativa de perda de etanol diária apresentada, sugere-se fazer a intervenção com bactericidas durante as etapas de extração do caldo, tratamento do caldo, no substrato açucarado (mosto) e após os trocadores de calor a placas. Sugere-se também a dosagem de antibacterianos específicos as bactérias lácticas contaminantes, onde esses seriam eficazes na diminuição da população bacteriana instalada no processo, a consequente redução das bactérias lácticas proporcionaria melhorias significativas na produtividade de etanol.

5. CONCLUSÃO

- Além de ser um desafio para pesquisadores e para a indústria sucroalcooleira, os indicadores de deterioração da cana de açúcar, devem possibilitar agilidade, possuir baixos custos e serem extremamente confiáveis. Estudos devem possibilitar aos gestores sucroalcooleiros (agroindustrial) informações importantes no controle dos processos, de modo a auxiliar nas tomadas de decisões, para melhorias na qualidade da matéria-prima e na produtividade industrial. Dessa forma, o ácido láctico foi quantificado em nove pontos de amostragem, sendo que estes podem ser considerados, mais relevantes ao monitoramento dos pontos críticos de controle para o processo produtivo de etanol.
- Como pode-se evidenciar durante o monitoramento das etapas do processo, o baixo pH do caldo PCTS (caldo de cana não processada) pode indicar deterioração na matéria-prima, onde a presença de ácido láctico serve como indicador da qualidade microbiológica;
- O aumento crescente do teor de ácido láctico no processo pode indicar contaminação bacteriana em equipamentos e consequentemente perdas de açúcares fermentescíveis;
- Pode-se afirmar que é na etapa de fermentação ocorre aumento substancial do ácido láctico, o que caracteriza contaminação nas dornas de fermentação e consequentemente redução na produtividade de etanol;
- O monitoramento da presença de ácido láctico no processo de produção de etanol deve ser constante, intensificando-se a partir da etapa de tratamento do caldo, composição do mosto e principalmente na fermentação;
- Pela análise de regressão linear, a acidez total pode ser usada como um indicador indireto da contaminação por bactérias lácticas.
- A formação de ácido láctico durante o processo de produção de etanol, caracterizada pela presença de bactérias contaminantes ao processo, induz a perdas significativas de etanol no processo analisado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, Henrique Vianna. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 2005.

ANDRIETTA, M. G. S.; OLIVEIRA, A. J.; STUPIELLO, J. P. Determinação de concentração inibitória mínima para cinco antimicrobianos sobre bactérias G (+) isoladas na indústria brasileira de fermentação alcoólica. **STAB – Açúcar, álcool e subprodutos**, Piracicaba, v. 13, n. 6, p. 42-43. 1995.

ANDRIETTA, M. G. S., STECKELBERG, C., ANDRIETTA, S. R., Bioetanol - Brasil 30 anos na vanguarda. **Multi-Ciência: Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da UNICAMP**, v. 7, p. 1-16, out. 2006.

ANDRADE, Ednilton; CARVALHO, Sergio Roberto Garcia de; SOUZA, Lucas Fernandes de. Programa do Proálcool e o etanol no Brasil. **ENGEVISTA**, V. 11, n. 2. p. 127-136, dezembro 2009.

ANGELIS, D. F. **Contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2010. Disponível em: <<http://www.cca.ufscar.br/~vico/Contaminacao%20bacteriana%20na%20fermentacao%20etanolica.pdf>>. Acesso em 20 mar. 2016.

AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS (2005). 945.08. **Fixed acids**. 2005.

AQUARONE, E.; SATO, S. Controle de contaminações microbianas em processos fermentativos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDL, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v. 3, cap. 25, p. 583-593.

CAMARGO, C. A. **Conservação de energia na indústria do açúcar e do álcool: Manual de recomendações**. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas, 1990.

CARVALHO, G. G. de; MONTEIRO, R. A. B. A influência do teor de acidez e da contaminação bacteriana do mosto no rendimento fermentativo industrial para produção de etanol. **FAZU em Revista**, Uberaba, nº 8, p. 47-54, 2011.

CEBALLOS-SCHIAVONE, C. A. D. 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**. 2009. 177 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2009.

CHAMPE, Pamela C.; HARVEY, Richard A. **Bioquímica Ilustrada**. Artmed: Porto Alegre, 2000.

CHIEPPE JÚNIOR, João Baptista. **Tecnologia e fabricação do álcool**. Inhumas: IFG; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012. 74 p.

COPERSUCAR. **Tratamento do caldo**. Piracicaba: Copersucar, 1985.

COPERSUCAR, Centro de Tecnologia Copersucar – série industrial n° 20. **Fundamentos dos processos de fabricação de açúcar e álcool**. Piracicaba: 1988.

COPERSUCAR. **Manual de métodos analíticos – Controle químico da fermentação**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 2001.

CRESTANA, Sílvio. **O Brasil produzindo o futuro**. Agricultura tropical. Dezembro 2006. Disponível em: <http://www.agroanalysis.com.br/12/2006/conteudo-especial/agricultura-tropical-o-brasil-produzindo-o-futuro>. Acesso em 20 mar. 2016.

CTC, Centro de Tecnologia Canavieira. **Curso de Operações de Moendas**. Piracicaba: 2005.

CTC, Centro de Tecnologia Canavieira. **Manual de controle químico da fabricação de açúcar**. Piracicaba: 2005.

DELGADO, A.A. **Tecnologia do Açúcar e das Fermentações Industriais**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP, 1975.

EDUARDO, J.H.P. **Fermentação Contínua**. Stab: Açúcar, Álcool e Subprodutos, Piracicaba, v.9, n° 4/5, p.42-45, mar-jun 1991.

ESALQ - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. **Enciclopédia Agrícola Brasileira**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1995.

FACCIOTTI, Maria Cândida Reginato. Fermentação Contínua. In: Schmidell et al. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. v.2. São Paulo: Edgar Blücher, 2001.

FERNANDES, Antônio Carlos. **Cálculos na agroindústria de cana-de-açúcar**. 2 ed. Piracicaba: STAB – Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil, 2003.

FERRI, Alencar; COSTA, Augusto de Souza; BATISTOTEL, Margareth; NAKA, Marco Hiroshi. Análise do perfil de produção de etanol em usinas localizadas na região da Grande Dourados –MS. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18; p. 251-268, 2014.

GOMIDE, R. **Estequiometria industrial**. 2. ed. São Paulo: Ed. do autor, 1979.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDL, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgar Blucher, 2001. v. 3, cap. 1, p. 1-43.

LYONS, T. P. Alcohol production: a traditional process changing rapidly. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. p.IX-XI.

LOPES, Angela Romero. **Produção de ácido láctico por lactobacilos em diferentes meios de cultivo**. 2008. 67 f. Dissertação (Mestrado). UNESP - Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho", Rio Claro, 2008.

MOREIRA, A. L., ALMEIDA, R. J. A., SCABBIA, R. J. A., TEIXEIRA, R. R. P. Dosagem de ácido láctico na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar. **Biológico**, São Paulo, v.71, n.1, p. 69-76, Jan./Jun., 2009.

MUTTON, M. J. R. Reflexos da qualidade da matéria-prima sobre a fermentação etanólica. In: Workshop sobre "Produção de etanol: qualidade da matéria-prima". **Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas**. Lorena-SP, maio 2008.

NARENDRANATH, N. V. Bacterial contamination and control in ethanol production. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. Chapter 20, p. 287-298.

NAVES, Raquel Ferreira; FERNANDES, Fernanda de Sousa; PINTO, Osvaldo Gomes; NAVES, Plínio Lázaro Faleiro. Contaminação microbiana nas etapas de processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usina alcooleira. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.6, N.11; 2010, p. 1-16.

NOVACANA. **A produção de cana-de-açúcar no Brasil (e no mundo)**. 2005. Disponível em: <<https://www.novacana.com/cana/producao-cana-de-acucar-brasil-e-mundo/>>. Acesso em 20 mar. 2016.

OLIVA-NETO, P. **Estudo de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por leveduras**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, Brasil, 1995.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria from the alcohol industry to several compounds. **Brazilian Journal of Microbiology**, Sao Paulo, v. 32, n. 1, p. 10-14, 2001.

OLIVEIRA FILHO, J. H. de. **Recepção, preparação, moagem, difusão e clarificação do caldo**. Apostila do Módulo VII. Processamento na indústria Sucroalcooleira. FAZU: Uberaba, 2010.

RIBEIRO, E.J. **Fermentação na Produção de Álcool Etílico**. Módulo I. Processamento na Indústria Sucroalcooleira. Uberaba: Fazu. 2007. Vol. I, II e III.

RIBEIRO, E. J. **Fermentação Alcoólica**. Uberaba, 2010.

RODINI, M.A.T. **Isolamento, caracterização e identificação de bactérias contaminantes de dornas de fermentação nas destilarias alcoólicas**. 1985. 92 f. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1985.

ROSSELL, C.E. V. Qualidade da matéria-prima. In: Workshop sobre “Produção de etanol: qualidade da matéria-prima”. **Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas**. Lorena – SP, maio de 2008.

STROPPA, C. T.; ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; SERRA, G. E. Use of penicillin and monensin to control bacterial contamination of Brazilian alcohol fermentations. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 102, n. 1214, p. 78-82, 2000.

TOSETTO, G. M. **Comportamento de linhagens industriais de *Saccharomyces* frente a compostos inibitórios presentes no melaço de cana-de-açúcar na produção de bioetanol**. 2008. 258 p. Tese (Dourado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

UDOP - União dos Produtores de Bioenergia. **Indicadores de mercado**. Disponível em: <<http://udop.com.br/>>. Acesso em 01 maio 2017.

UNICA - UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA - **Estatísticas**. 2016. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/unicadata>>. Acesso em 30 mar. 2016.

VALSECHI, O. A. **Efeito da radiação de microondas sobre *Lactobacillus fermentum*; linhagens: CCT4145; CCT4146 e FT038B**. 2005. 123 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

VENTURA, Ribeiro. **Quantificação do ácido láctico na Fermentação etanólica como parâmetro de Monitoramento do processo**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, área de concentração Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Campus de Rio Claro, 2007.

ANEXO A

ACIDEZ TOTAL EM BEBIDAS DESTILADAS E MISTAS POR TITULAÇÃO (AOAC)

1 Escopo

Determinação de Acidez Total por titulometria em bebidas destiladas e mistas derivadas (alcoólica por mistura). Pode-se realizar as titulações monitoradas por pHmetro ou opcionalmente com indicador fenolftaleína para as amostras límpidas.

2 Fundamentos

A metodologia preconizada pela AOAC consiste em dois procedimentos complementares: a acidez total é determinada sob titulação direta da amostra.

3 Reagentes, padrões e materiais

- Solução de hidróxido de sódio 0,1 M
- Solução indicadora de fenolftaleína 1%
- Água ultrapura ou deionizada
- Pipeta volumétrica de 50 mL (utilizar uma por amostra em ambos os ensaios)
- Erlenmeyer de boca larga 250 mL (dois por amostra)
- Bastão de vidro (um por amostra)
- Proveta de 100 mL

4 Equipamentos

- Bureta eletrônica (ou bureta de vidro)
- pHmetro
- Agitador magnético

5 Precauções analíticas

Uso de Equipamentos de Proteção Individual.

6 Procedimentos

- Proceder em duplicata.

- Transferir 50 mL da amostra e 50 mL de água destilada para erlenmeyer
- Inserir os eletrodos de pH e de temperatura ou adicionar 2-3 gotas de fenolftaleína, dependendo da característica da amostra.
- Proceder à titulação da amostra com solução de hidróxido de sódio 0,1 M até o ponto de equivalência (pH 8,2 ou coloração rosa estável), com o auxílio do agitador magnético.
- Anotar o volume de titulante.

7 Resultados: fórmulas de cálculo

$$AT_{(g/L)} = 60/a \times V_{AT} \times M_{NaOH}$$

AT acidez total, expressa em g/L (ácido acético)

vAT volume de titulante no ensaio da acidez total

M molaridade do titulante

8 Referência

AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS (2005) 945.08. Fixed acids.

ANEXO B

RESUMO DOS RESULTADOS DA ANÁLISE DE REGRESSÃO

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,962665
R-Quadrado	0,926725
R-quadrado ajustado	0,916257
Erro padrão	349,4297
Observações	9

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	10809642	10809642	88,53027	$3,19 \times 10^{-5}$
Resíduo	7	854707,6	122101,1		
Total	8	11664350			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	1492,181	193,978	7,692524	0,000117	1033,495467	1950,866	1033,495	1950,866
Acidez	2,288492	0,243222	9,409053	0,000	1,713362804	2,863622	1,713363	2,863622