INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Esterilização de mosto para a produção de etanol

ERIC ALBERTO DA SILVA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientador:
Prof. Dr. Valter Arthur

São Paulo
2019

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Esterilização de mosto para a produção de etanol

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

ERIC ALBERTO DA SILVA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientador:
Prof. Dr. Valter Arthur

São Paulo
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

DA SILVA, E. A. ***Esterilização de mosto para a produção de etanol***. 2019. 65 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Da Silva, Eric Alberto
Esterilização de mosto para a produção de etanol / Eric Alberto Da Silva; orientador Prof. Dr. Valter Arthur. -- São Paulo, 2019.
65 p.
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2019.
1. fermentação alcoólica. 2. esterilização de mosto. 3. feixe de elétrons. 4. radiação ionizante. 5. indústria sucroenergética. I. Arthur, Prof. Dr. Valter , orient. II. Título.

RESUMO

DA SILVA, E. A. ***Esterilização de mosto para a produção de etanol.*** 2019. 65 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

A produção brasileira de etanol na safra 2018/19 foi de aproximadamente 30,4 bilhões de litros. Na produção de etanol, realiza-se a extração do caldo de cana-de-açúcar, do qual se prepara o mosto que não é esterilizado. Os contaminantes presentes afetam negativamente a eficiência e produtividade, por isso, ao utilizar o mosto esterilizado é possível diminuir perdas do processo. Dentre os vários métodos que podem ser utilizados para a esterilização do mosto, destaca-se o feixe elétrons, porque permite tratar grande volume de mosto em pouco tempo, por esses motivos, os objetivos do trabalho foram: a) verificar os efeitos do tratamento com feixe de elétrons sobre mosto derivado da cana-de-açúcar; b) avaliar o potencial de esterilização e os efeitos físico-químico sobre açucares; c) avaliar o rendimento e a produtividade da fermentação alcoólica. Na primeira etapa do experimento, o mostro foi contaminado (10^7 UFC.mL^{-1}), posteriormente foi submetido à diferentes tratamentos radioativos de 0, 10, 20, 40 e 80 kGy (respectivamente T0, T1, T2, T3 e T4). Após os tratamentos foram feitas as análises por contagem total de microrganismo e bactérias totais e caracterizado pelos teores de carboidratos, glicerol, 5-HMF, furfural, fenólicos totais e flavonoides totais. Na segunda etapa foram utilizados os mostos sujeitos aos seguintes tratamentos da primeira etapa T0, T1, T2 e T3. A fermentação alcoólica utilizou a levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, que foi monitorada através da análise do desprendimento de CO_2. Também foram avaliados teores de carboidratos, glicerol, alcoólico, rendimento, produção, viabilidade celular e contaminação bacteriana e total. Após a primeira etapa foram observadores que os tratamentos apresentaram um redução das atividades dos microrganismos. Na análise de fenólicos totais houve um aumento, provavelmente pela degradação dos fenólicos complexos em mais simples, e, para as demais análises todos os tratamentos demonstraram resultados semelhantes entre si. Na etapa da fermentação, os resultados das análises demonstraram que ART foram consumidos 99,5%. O teor de manitol

apresentou um aumento, justificado por ser um indicador de contaminação. O rendimento mostrou aumento de até 5% em relação T0 e T3 ou T4 e 4% entre T0 e T1. As análises de teor glicerol, e viabilidade celular não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. Conclui-se que, é possível utilizar a aplicação dos feixes de elétrons para esterilizar o mosto, visando a produção de etanol, na dose de 80 kGy, ocorreu a esterilização do mosto e não há necessidade de se utilizar agentes antimicrobianos para o controle de contaminantes na fermentação alcoólica. O tratamento do mosto com feixe de elétrons não promoveu a inversão de açúcar. Foi observado um aumento do rendimento fermentativo para os mostos tratados com feixe de elétrons.

Palavra-chave: fermentação alcoólica; esterilização de mosto; feixe de elétrons; radiação ionizante; indústria sucroenergética.

ABSTRACT

DA SILVA, E. A. ***Must sterilization for ethanol production.*** 2019. 65 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Brazilian ethanol production in the 2018/19 harvest was approximately 30.4 billion liters. In the production of ethanol, the sugarcane juice is extracted from which the must is prepared which is not sterilized. Contaminants present negatively affect efficiency and productivity, so using sterile mash can reduce process losses. Among the various methods that can be used for the sterilization of the wort, the electron beam stands out, because it allows to treat large volume of wort in a short time, for these reasons, the objectives of the work were: a) to verify the effects of electron beam treatment on sugar cane must; b) to evaluate sterilization potential and physicochemical effects on sugars; c) evaluate the yield and productivity of alcoholic fermentation. In the first stage of the experiment, the specimen was contaminated (107 CFU.mL-1), subsequently submitted to different radioactive treatments of 0, 10, 20, 40 and 80 kGy (respectively T0, T1, T2, T3 and T4). After the treatments, total microorganism and total bacteria counts were analyzed and characterized by carbohydrate, glycerol, 5-HMF, furfural, total phenolics and total flavonoids. In the second stage were used musts subject to the following treatments of the first stage T0, T1, T2 and T3. The alcoholic fermentation used the yeast of Saccharomyces cerevisiae species, which was monitored by detachment analysis of CO2. Carbohydrate, glycerol, alcoholic content, yield, production, cell viability and bacterial and total contamination were also evaluated. After the first stage, it was observed that the treatments presented a reduction of the microorganisms activities. In the analysis of total phenolics there was an increase, probably due to the degradation of complex phenolics into simpler ones, and for the other analyzes all treatments showed similar results. In the fermentation stage, the results of the analyzes showed that ART was consumed 99.5%. The mannitol content showed an increase, justified by being an indicator of contamination. The yield showed an increase of up to 5% in relation to T0 and T3 or T4 and 4% between T0 and T1. Analysis of glycerol content and cell viability showed no significant difference

between treatments. It can be concluded that it is possible to use the electron beams application to sterilize the must, aiming at the 80 kGy ethanol production, the sterilization of the must occurred and there is no need to use antimicrobial agents to control contaminants. in alcoholic fermentation. The treatment of wort with electron beam did not promote sugar inversion. An increase in fermentative yield was observed for electron beam treated musts.

Key words: alcoholic fermentation; wine sterilization; electron beam; ionizing radiation; sugar-energy industry.

AGRADECIMENTOS

Expresso minha gratidão as pessoas e instituições que contribuíram para a concretização deste trabalho, em especial:

Aos Prof. Dr. Antônio Sampaio e ao Prof. Dr. Valter Arthur pela orientação, apoio, confiança, amizade e exemplo profissional e humano.

Ao Curso de Pós Graduação em Tecnologia Nuclear – Aplicações e a Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares - IPEN, pela formação acadêmica.

A Escola de Superior de agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ e o Centro Tecnológico de Radiações – CTR – IPEN, pelo uso do laboratórios (Laboratório de Tecnologia Sucroenergética e Bioenergia (LTSBio). Setor de Açúcar e Álcool, LAN/ESALQ/USP e Laboratório de Radioentomologia - DVPROD/CENA/USP).

Ao MSc. Rubens Perez Calegari, pelo auxílio em todo experimento.

A equipe técnica do LTSBio e GTSBio: MSc. Ana Paula Silva, MSc. Laysa M. Lewandowski, Giovanni M. Silveira, Gabriela M. F. L. L., Matheus R., Layna A, Ricardo S. F., Victor K. A., Vitor H., Maria C. P., Elias M., Rafael D., foram imprescindíveis durante a execução dos trabalhos.

A minha noiva Jasmim O. R. A. da Silva, pelo apoio e compreensão

A minha família, pai Celso J. da Silva, mãe Aldeni T. da Silva, irmã Anne F. da Silva, vó Maria T. da Silva, tia Martinha T. da Silva, demais familiares, amigos Prof. Dr. Antônio P. de Camargo e Prof. MSc. Douglas L. dos Reis e demais que apoiaram minha formação.

E a todos que não citados mais que ajudaram na conclusão deste trabalho.

“É mais fácil surfar uma onda do que criar o mar”

Flávio Augusto

“Cada sonho que você deixa pra trás, é um pedaço do seu futuro que deixa de existir.”

Steve Jobs

SUMÁRIO

Página

1 INTRODUÇÃO ***13***

2 OBJETIVOS ***16***

3 REVISÃO DA LITERATURA ***17***

3.1 Contaminação na fermentação alcoólica *17*

3.2 Feixe de elétrons *18*

3.3 Química das radiações *19*

3.4 Radiólise da água *19*

3.5 Efeito da radiação sobre carboidratos *22*

3.6 Interações da radiação com a matéria e microrganismos *22*

3.7 Esterilização do mosto por radiação *25*

4 MATERIAL E MÉTODOS ***27***

4.1 Locais de Execução da Pesquisa *27*

4.2 Material *27*

4.3 Procedimento experimental *27*

4.4 Etapa 1 – Ensaio de esterilização por feixe de elétrons *29*

4.4.1 Ensaios para a esterilização por feixe de elétrons *30*

4.5 Etapa 2 – Ensaio de fermentação alcoólica *31*

4.6.1 Análises microbiológicas *33*

4.6.2 Análises físico-químicas *34*

4.6.3 Determinação de etanol nos vinhos delevurados *36*

4.6.4 Rendimento fermentativo *36*

4.6.5 Produtividade de etanol *36*

4.7 Análises estatísticas *36*

4.8 Estudo de caso *37*

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO ***39***

5.1 Etapa 1 – Efeitos dos tratamento com feixe de elétrons nos mosto *39*

5.1.1 Análises microbiológicas *39*

5.1.2 Análise de carboidratos, manitol e glicerol *42*

5.1.3 Análise de potenciais Inibidores da fermentação *43*

5.2 Etapa 2 – Fermentação Alcoólica *46*

5.2.1 Açúcares redutores totais residuais no vinho *46*

5.2.2 Manitol.....47
5.2.3 Glicerol.....48
5.2.4 Viabilidade celular.....50
5.2.5 Contagem de bactérias totais.....51
5.2.6 Teor Alcoólico, produtividade e rendimento.....53
5.3 Estudo de caso – influência do rendimento alcoólico no faturamento de uma usina produtora de etanol padrão.....54
6 CONCLUSÕES.....56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....57

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 – Descrição dos tratamentos com radiação por feixe de elétrons. 29
Tabela 2 – Parâmetros analisados na Etapa 1 29
Tabela 3 – Doses de radiação aplicadas nas amostras em relação ao número de passadas e voltas no acelerador de elétrons. 31
Tabela 4 – Parâmetros analisados na Etapa 2 32
Tabela 5 – Descrição do sistema cromatográfico utilizado para as análises com o CG.....35
Tabela 6 – Resultados dos tratamentos de estilização por radiação por feixe de elétrons. 41
Tabela 7 – Resultados da análises de carboidratos após tratamento radiação por feixe de elétrons.....43
Tabela 8 – Resultados da análises de química após tratamentos com radiação por feixe de elétrons.....45
Tabela 9 – Análises físico-químicas do vinho. 47
Tabela 10 – Análise de teor de manitol, antes e depois da fermentação alcoólica 48
Tabela 11 – Concentrações de glicerol no vinho ($g.L^{-1}$).....50
Tabela 12 – Viabilidade celular pós fermentação.....51
Tabela 13 – Analises antes e depois da fermentação de contagem de bactérias totais. 52
Tabela 14 – Análises pós-fermentação de teor alcoólico, produtividade e rendimento alcoólico 54
Tabela 15 – Faturamento bruto de etanol por rendimentos alcoólicos de 1 usina sucroalcooleira.....55

LISTA DE FIGURA

Página

Figura 1 – Esquema básico do dispositivo de irradiação utilizando feixe de elétrons 18
Figura 2 – Fluxograma do cultivo do contaminante.....28
Figura 3 – Mesa móvel do Feixe de Elétrons. 30
Figura 4 – Ilustração da condução do ensaio de fermentação.....32
Figura 5 – Tratamentos de estilização por radiação por feixe de elétrons. 42
Figura 6 – Concentrações de compostos fenólicos totais (µg L^{-1}) em mostos submetidos à diferentes doses de radiação gerada por feixe de elétrons. 45
Figura 7 – Diferença do teor de manitol durante fermentação. 48
Figura 8 – Contagens de bactérias totais em amostras de mostos submetidos aos diferentes tratamentos, antes e após a fermentação 52
Figura 9 – Rendimentos fermentativos de mostos submetidos aos diferentes tratamentos de aplicação de radiações ionizantes.....54

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, industrializa aproximadamente de 641 milhões de toneladas de cana por ano. Em média 54% dessa cana é utilizada para a produção de etanol. O país é o segundo maior produtor de etanol do mundo atrás apenas dos Estados Unidos. A produção nacional de etanol na safra 2018/19 foi de aproximadamente 30,4 bilhões de litros. A cana-de açúcar é a principal fonte para produção de etanol nacional representando mais de 99% do volume total. O mercado sucroenergético é responsável por 2% do PIB nacional, valor acima de 100 bilhões de dólares (CHATTERJEE et al., 2016; FGV, 2017; UNICA, 2019).

O etanol brasileiro é obtido exclusivamente por via fermentativa, a partir de açúcares da cana-de-açúcar e do milho, utilizando leveduras. A eficiência deste agente biológico em transformar o açúcar do caldo de cana em etanol depende muito da qualidade do mosto a ser fermentado. Normalmente, esse substrato não é esterilizado antes de ser utilizado, o que possibilita a entrada de grande número de contaminantes no processo, isso afeta negativamente a eficiência e a produtividade do processo (STUPIELLO; HORII, 1981).

A utilização de mosto esterilizado para a produção de álcool pode permitir o uso de linhagens de leveduras selecionadas, com características desejáveis e que essas características se mantenham durante toda a safra. Além disso, é possível diminuir custos pela eliminação e/ou redução do uso de antibióticos, antiespumantes, tratamento ácido do fermento e consumo de outros insumos. Também é possível reduzir o tempo de reciclo das leveduras na unidade industrial, o que permite aumentar a produtividade em razão do tempo. Outro aspecto interessante é que permite ter mosto fermentado com características microbiológicas semelhantes no decorrer da safra. Isso facilita a obtenção de álcoois especiais, como o álcool neutro. Ademais, permite otimizar o processo, reduzindo custos e aumentando a produtividade. Também se deve ressaltar que algumas tecnologias, que hoje não são usuais, pela falta de estabilidade do processo produtivo, podem se tornar viáveis se trabalhando em condições assépticas (BRAZZACH et al., 1976; NOLASCO JUNIOR, 2005).

Existem vários métodos que podem ser utilizados para a esterilização do mosto para a produção de álcool. Contudo, na indústria do açúcar e álcool, o

volume de caldo processado é muito grande, de modo que os métodos tradicionais, como: o aquecimento convencional ou o uso de agentes químicos tornam-se muito onerosos, seja pelo tempo de residência do substrato a ser tratado ou pelo custo do agente a ser utilizado, o que normalmente inviabiliza tais procedimentos. Isto, em geral, inviabiliza tal operação. Por outro lado, essa indústria apresenta superávit energético, o que pode ajudar a contornar esse problema, ou melhor, é autossuficiente em energia sendo que parte desta energia pode ser utilizada para gerar uma fonte que permita esterilizar o mosto.

Por esses motivos, acredita-se que o uso de feixe de elétrons é uma boa estratégia para a esterilização do mosto, pois podem ser instalados na própria linha de produção e utilizar de parte da energia excedente do processo. Essa ferramenta em potencial, já tem sido utilizada para reduzir a carga microbiana em outros materiais, tais como grãos de cereais, águas residuárias e açúcares (BORRELY; DEL MASTRO; SAMPA, 1998; PODADERA, 2007b; RELA, 2003).

Algumas pesquisas também têm demonstrado a eficiência da aplicação dos feixes de elétrons para promover a desinfecção e esterilização de meios, como tratamento de efluentes. Nestes estudos, têm-se verificado que doses de exposição de 1 kGy permitem desinfecção de aproximadamente 90% das bactérias presentes no meio e a dose 7 kGy promove a esterilização do meio (SKOWRON et al., 2013). Essas diferenças de valores de dose são justificadas conforme os resultados dos estudos conduzidos por Borrely, Del Mastro & Sampa (1998). Estes autores relataram que, conforme as espécies de microrganismos que se pretende eliminar há necessidade de se aplicar diferentes doses de radiações ionizantes, de modo que, conforme o alvo de interesse se deve utilizar doses distintas (C. F MORAES et al., 2004; MOHD NASIR et al., 2010).

Os feixes de elétrons têm sido estudados para o controle de microrganismos em alimentos. Segundo Pillai & Shayanfar (2014), em trabalhos conduzidos pela Food and Agriculture Organization (FAO) são relatados que, no mundo todo, há perdas significativas de alimentos pela ação de microrganismos contaminantes. Em países subdesenvolvidos, essas perdas chegam a 75% de todo alimento armazenado. Dada a importância, estudos para o controle de microrganismos em alimentos demonstraram que a aplicação de doses de 25 e 60 kGy não oferecem riscos à saúde ou promovem perdas nutricionais significativas sobre a qualidade dos alimentos (BHAT; KARIM ALIAS; PALIYATH, 2012). Além

disso, também demonstraram que as doses de radiações ionizantes recomendadas para a desinfeção de alimentos frescos, tais como frutas e vegetais eram de cerca de 1 a 3 kGy. No caso do tratamento para a desinfecção de brotos comestíveis a dose de 1 kGy era o suficiente e para o tratamento de sementes as doses necessárias eram na faixa de 8 kGy a 30 kGy (LUNG et al., 2015).

Além do controle microbiano, também já foram estudadas com sucesso outras aplicações das radiações ionizantes, tais como a redução de substâncias tensoativos aniônicas, com isso facilitando a biodegradação da carga orgânica de efluentes tratados e facilitando a recuperação da água (C. F MORAES et al., 2004; MOHD NASIR et al., 2010).

Visando as mais diversas aplicações dos feixes de elétrons existem milhares de unidades espalhadas pelo mundo. Segundo Calvo et al. (2012) atualmente, existem distribuídas pelo mundo mais de 1500 unidades de feixe de elétrons. No Brasil, segundo o autor, já foram instalados 24 sistemas, os quais estão em órgãos governamentais e da iniciativa privada. Essas unidades têm sido utilizadas para diversas aplicações. Portanto, essa é uma tecnologia que já está disponível no país e por isso o interesse de estudar novas aplicações para utilizá-la.

2 OBJETIVOS

1. Avaliar a aplicação de feixes de elétrons para a esterilização de mosto obtido a partir de cana-de-açúcar;

2. Avaliar os efeitos dos feixes de elétrons sobre os açúcares presentes no mosto;

3. Avaliar o rendimento e a produtividade da fermentação alcoólica em mosto esterilizado com o uso de feixes de elétrons;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Contaminação na fermentação alcoólica

Na produção de álcool, as bactérias com maior frequência são do grupo gram-positivo, na qual são predominantes na fermentação alcoólica, devido sua tolerância ao teor alcoólico, sendo os gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus* os de maior ocorrência. A contaminação bacteriana além de produzir ácidos, que inibem a fermentação alcoólica e diminuem a formação de álcool; ainda pode formar polissacarídeos, os quais aumentam a viscosidade do caldo e causam entupimentos nas tubulações, centrífugas, peneiras e trocadores de calor; a floculação do fermento, que proporciona a diminuição na velocidade de fermentação, acarretando perda de células de leveduras pelo fundo da dorna e dificultam a operação das centrífugas (BREXÓ; SANT'ANA, 2017; NOBRE; HORII; ALCARDE, 2007; RASMUSSEN et al., 2015).

Os maiores prejuízos causados pela contaminação bacteriana são a degradação da sacarose e a formação de ácidos lático e acético que ocasionam perda de açúcar e a intoxicação das leveduras (FREDERICK, 1994; OLIVA-NETO, P.; YOKAYA, 1997).

A população de bactérias contaminantes em mosto para fermentação atinge níveis superiores a 10^7 células por mL, o que pode acarretar significativa queda no rendimento alcoólico, da ordem de até 55 % do valor teórico esperado. Além disso, contaminações de 10^8 a 10^9 células bacterianas por mL de mosto podem promover quedas de até 90 % do rendimento alcoólico (ALTERTHUM, F.; CRUZ, M. R. M.; VAIRO, M. L. R.; GAMBASSI, 1984; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; CAMPOS, 1981; CECCATO-ANTONINI, 2018).

Quando os níveis de ácido lático e outros ácidos orgânicos, provenientes do metabolismo de bactérias contaminantes, atingem valores de 5 a 6 g L^{-1} de mosto, as perdas de rendimento alcoólico podem chegar a 60 % (AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, 1982).

Em fermentações conduzidas em presença de 5 x 10^6 bactérias mL^{-1}, sendo 5 x 10^3 bactérias mL^{-1} produtoras de ácidos, são observadas reduções no

rendimento da fermentação da ordem de 11,4 % (KHAN; HOQ, 1990; LOPES et al., 2016).

As correlações entre o tamanho da população contaminante e as perdas em rendimento na formação de etanol devem ser bem interpretadas, embora seja óbvio que cada molécula de açúcar direcionada à produção de ácido lático, resulta na perda de duas moléculas de etanol que poderiam ser produzidas pelas células de leveduras (BAYROCK et al., 2003; POWER, 2003).

3.2 Feixe de elétrons

O feixe de elétrons é um tipo de radiação ionizante, a qual é produzida em aceleradores de elétrons. Estes podem ser definidos como sistemas no qual se estabelece um potencial de alta voltagem entre um cátodo e uma ânodo num tubo de vácuo. O cátodo emite feixe de elétrons chamados de raios catódicos ou feixes eletrônicos, que seguem o mesmo princípio do tubo de televisão, em que a grande diferença é que este último utiliza, aproximadamente, 25.000 volts de energia, enquanto o acelerador utiliza da ordem de milhões de volts. O esquema de funcionamento deste equipamento pode ser ilustrado na Figura 1 (RELA, 2003).

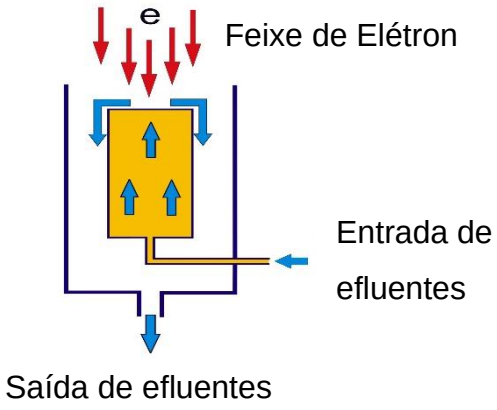

Figura 1 – Esquema básico do dispositivo de irradiação utilizando feixe de elétrons
Fonte - RELA, 2003

.

3.3 Química das radiações

A radiação gama proveniente de isótopos radioativos, os elétrons e os raios x gerados nos aceleradores, são conhecidos como radiações ionizantes, que interagem com os produtos e no resultado de colisões com elétrons orbitais que constituem esses produtos, perdem energia para esses elétrons, que por sua vez são excitados adquirindo níveis mais altos de energia ou são expulsos completamente de suas órbitas colidindo com outros elétrons orbitais (MOLINS, 2001; RELA, 2003).

Os produtos da ionização, os íons, os elétrons secundários, átomos e moléculas excitadas subsequentemente perdem suas energias para o meio que o circundam e se revertem em estados estáveis de radicais livres (RELA, 2003).

A energia proveniente da radiação ionizante ao interagir com a matéria é absorvida pelo meio e redistribuída entre os átomos e moléculas que a constituem, produzindo, entre outras espécies, os radicais livres H+ e OH-, altamente reativos (RELA, 2003).

Esses radicais ao interagirem com as moléculas produzem oxidação, redução, dissociação e degradação. Os radicais livres podem combinar-se para formar algumas moléculas ativas, como é o caso do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e do ozônio (O_3), produtos estes importantes também do ponto de vista de desinfecção (RELA, 2003).

A interação da radiação ionizante com a matéria pode ser de modo direto ou indireto. A ação direta é considerada como a interação da matéria com a molécula-alvo, enquanto que a ação indireta ocorre quando a molécula-alvo é afetada por alguma espécie química formada após a interação da radiação com a água (MOLINS, 2001).

3.4 Radiólise da água

As radiações ionizantes provenientes de raios gama ou de feixes de elétrons são capazes de quebrar ligações químicas quando são absorvidas pelos materiais. Os produtos da ionização podem ser eletricamente carregados (íons) ou neutros (livres de radicais). Estes, então, podem promover reações que causam

alterações no material irradiado, conhecidas como radiólise. São essas reações que causam a destruição de microrganismos, insetos e parasitas durante a irradiação de alimentos (FELLOWS, 2018).

As alterações químicas sofridas pelo alimento irradiado são induzidas pela ação direta de macro e micro nutrientes presentes no alimento, ou uma ação indireta provocada por intermediários reativos formados pela radiólise da água (OH et al., 2006).

Em alimentos com alto conteúdo de água (≥ 60 %), a radiação ionizante é absorvida pelo composto em maior concentração, ou seja, a água, podendo provocar a formação dos radicais (OH^-), elétrons solvatados (e_{aq}), átomos de hidrogênio (H), hidrogênio molecular (H_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e estes radicais por sua vez interagem com os componentes dos alimentos, interação essa denominada secundária (AL-ASSAF et al., 2016; JOSEPHSON; PETERSON, 1983a; PHILLIPS, 1962).

As formações dos átomos de hidrogênio e dos radicais hidroxilas ocorrem quando a radiação eletromagnética ou partículas carregadas interagem com a água, a ionização ocorre ao longo do caminho da partícula ou elétrons primário de recuo. A cada ponto em que ocorre a retirada de elétrons, os elétrons secundários formados possuem energia suficiente para futuras ionizações (retirada de elétrons). Segundo Phillips (1962), após 10^{-18} a 10^{-16} segundos da passagem da partícula pela água ocorre uma série de reações, conforme pode se resumir a seguir:

$$H_2O + e_1 \longrightarrow H_2O^+ + e_2 + e_s \qquad (1)$$

Onde:

e_1 e e_2: elétrons de recuo

e_s: elétrons secundários

Os elétrons secundários, também, podem iniciar processos de ionização (PHILLIPS, 1962).

$$H_2O + e_s \longrightarrow H_2O^+ + e_{s1} + e_s \qquad (2)$$

A água ionizada é convertida na radical hidroxila em 10^{-12} segundos (PHILLIPS, 1962).

$$H_2O^+ + H_2O \longrightarrow H_3O^+ + \cdot HO \quad (3)$$

A formação dos átomos de hidrogênio se dá pela captura de um elétrons secundário pela água que leva a formação de $H2O^-$, que através da reação seguir produz hidrogênio (PHILLIPS, 1962).

$$H_2O \longrightarrow H + OH^- \quad (4)$$

A radiólise da água pode ser resumida pelas reações apresentadas a seguir (PHILLIPS, 1962).

$$H_2O \longrightarrow H_2O^+ + e^- \quad (5)$$

$$H_2O^+ + aq. \longrightarrow H^+ aq + OH \quad (6)$$

$$e^- + H_2O \longrightarrow OH^- + H \quad (7)$$

$$OH^- + H^+_{aq} \longrightarrow H_2O \quad (8)$$

$$H_2O \longrightarrow H + OH \quad (9)$$

As espécies formadas ($\cdot OH$, e_{aq}^- e H) são bastante reativas, portanto, duram pouco tempo em solução. O radical hidroxila é um agente oxidante, enquanto o elétrons aquoso e o átomo de hidrogênio são agentes redutores (PHILLIPS, 1962).

A formação de hidrogênio e do peróxido de hidrogênio ocorre por combinação com dos radicais citados anteriormente. Estas reações ocorrem em 10^{-7} segundos após a passagem das partículas carregadas. As reações estão demonstradas a seguir (AL-ASSAF et al., 2016; PHILLIPS, 1962):

$$H + H \longrightarrow H_2 \quad (10)$$

$$OH + OH \longrightarrow H_2O_2 \quad (11)$$

3.5 Efeito da radiação sobre carboidratos

A química da radiação dos carboidratos é complexa, uma vez que numerosos produtos radiolíticos são possíveis. Dos radicais livres produzidos pela radiação de um sistema aquoso, o radical hidroxila (OH^-) é de primordial importância na radiólise de carboidratos. Ele atua retirando um hidrogênio ligado ao átomo de carbono. O radical formado pode reagir provocando a formação de outros compostos (NAWAR, 1986).

Os produtos radiolíticos provenientes de carboidratos consistem principalmente de ácidos e compostos carbonílicos (BOTHNER-BY, C. T.; BALAZS, 1957; VILLAVICENCIO, 1998). Contudo, pode ocorrer também a formação de malonaldeído e outros compostos, porém a formação desses compostos está relacionada ao pH da solução, o qual deve ser alcalino, portanto como a maioria dos alimentos apresenta pH ácido, esses compostos não são facilmente encontrados (SCHERZ, 1970).

A radiação em soluções de carboidratos pode levar a alterações de pH, rotação óptica, poder redutor, viscosidade e espectro de ultravioleta. Os produtos formados a partir de açúcares irradiados em fonte de 60 Co e em acelerador de elétrons são semelhantes, porém a atmosfera em que ocorre a irradiação, o valor do pH, a temperatura do material, o conteúdo de água do produto, a dose irradiada e a taxa de dose irradiada são fatores que podem afetar os produtos formados (LUCIA et al., 2015; PHILLIPS, 1972; WAISIKIEWICZ, J. M.; YOSHII, F.; NAGASAWA, N.; WACH, R. A.; MITOMO, 2005).

3.6 Interações da radiação com a matéria e microrganismos

A absorção da radiação ionizante causa mudanças químicas nos componentes celulares dos microrganismos, as quais podem ter consequências para a atividade das células. De todos os efeitos que estão envolvidos na ação da

radiação sobre as células, a mudança no seu DNA, a qual afeta as funções vitais das células, incluindo a reprodução, é considerada a mais importante (WOLFF; DEAN; URBAIN, 1986). Como consequência das mudanças induzidas pela radiação pode ocorrer a morte celular, a qual, geralmente, está associada à perda da capacidade da célula se reproduzir (MOLINS, 2001).

A radiação ionizante exerce um efeito letal aos microrganismos, tais como: bactérias, fungos, vírus, algas e protozoários, através de efeitos direto e indireto das radiações, cabendo destacar a existência de um alvo de ataques principal que é o material genético da célula, DNA e/ou RNA (FELLOWS, 2018).

Radiações ionizantes (fótons ou elétrons) inativam os microrganismos devido a danos a estruturas vitais nas células, mais frequentemente no material genético. Os danos impedem a multiplicação e também a realização da maioria das funções celulares. Os prejuízos ao material genético ocorrem em decorrência da colisão direta entre as radiações ionizantes e o material genético, ou como um resultado da interação da radiação ionizante com alguma molécula da célula, a qual, por sua vez reage com o material genético. Na maioria das células, a molécula adjacente é a água (JOSEPHSON; PETERSON, 1983b).

Em primeiro momento, os efeitos são simples. Um fóton de energia ou um elétrons atinge o material genético da célula e causa uma lesão no DNA. A lesão pode quebrar apenas uma hélice simples do DNA, ou, se a orientação do DNA é apropriada, a energia ou elétrons pode quebrar a dupla hélice do DNA. A lesão na hélice simples pode não ser letal e dela pode resultar em mutações. No entanto, um grande número de lesões na hélice simples do DNA pode exceder a capacidade de reparo da célula microbiana, o que resulta na morte celular (DICKSON, 2001).

Lesões nas duplas-hélices ocorrem quando fótons ou elétrons atingem áreas dessas regiões do DNA. O efeito disso é o rompimento do DNA em duas partes. Como o mecanismo necessário para o reparo das lesões das duplas hélices, em geral, ultrapassa a capacidade de todos os agentes biológicos, as lesões nas duplas hélices são quase sempre letais. Entretanto, pelo fato de ser necessária a orientação do DNA em relação à fonte de radiação, lesões nas duplas

hélices ocorrem muito menos frequentemente do que lesões na hélice simples (DICKSON, 2001).

As interações das radiações ionizantes com moléculas adjacentes ao material genético são mais complexas. A química da radiação da água é bem conhecida. A radiação provoca na molécula de água a perda de um elétrons, produzindo H_2O^+ e e^-. Estes produtos reagem com outras moléculas de água para produzirem inúmeros compostos, incluindo o hidrogênio e radical hidroxila, hidrogênio molecular e oxigênio, bem como peróxido de hidrogênio. Os radicais hidroxilas (OH^-) e os peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) parecem ser os componentes mais reativos dessas interações. Essas moléculas reagem com o ácido nucléico e ligam-se quimicamente com a hélice simples em um outro ácido nucléico, bem como se ligam no par de bases da hélice oposta. Desde que a localização da ionização na molécula de água seja aleatória, as subsequentes reações com ácidos nucléicos são aleatórias. Com a interação direta de radiações com o DNA, a ação indireta pode resultar em lesões na hélice simples ou na dupla-hélice, com os mesmos efeitos da ação direta (MOLINS, 2001).

Além do efeito sobre o material genético, a radiação tem vários efeitos sobre outros componentes celulares. Aplicando radiação sobre as células, essa pode interagir direta ou indiretamente com componentes das células, tais como membranas, enzimas e plasmídeos. Essas interações podem ter potencial letal sobre a célula ou sobre elas mesmas, mas em muitos casos, salvo se existirem prejuízos ao material genético. Estas interações podem ter o papel na sobrevivência de células injuriadas, na qual a célula tem danos letais ao material genético, podem ter complicações em outras estruturas que dificultam ou impedem a sobrevivência da célula injuriada (MOLINS, 2001).

A sensibilidade de vários compostos orgânicos à radiação é proporcional ao peso molecular deles, com base nessa suposição, tem sido estimado que uma dose de 0,1 kGy poderia prejudicar 0,0005 % dos aminoácidos, 0,14 % das enzimas e 2,8 % do DNA dentro de uma dada célula (POLLAND, 1966). É difícil separar os efeitos devido a lesões no material genético e lesões em material não-genético. Entretanto, um importante aspecto nesse tocante é que as lesões não estão associadas a uma região específica do material genético ou componente celular.

Isso é um ponto importante para a lucidação da resistência de certas bactérias à radiação, especialmente, em relação a capacidade de microrganismos desenvolverem ou adquirem resistência a radiação (DICKSON, 2001).

Os esporos de bactérias são geralmente mais resistentes a qualquer processo de inativação do que células vegetativas. Há necessidade de maiores doses de radiações ionizantes para inativar esporos do que células vegetativas de bactérias. Segundo Wolff, Dena e Urbain (1986) as doses letais para as células vegetativas são de 0,5 a 10 kGy e para os esporos de bactérias essas doses devem ser de 10 a 50 kGy.

3.7 Esterilização do mosto por radiação

As radiações ionizantes já foram testadas com sucesso para o controle de agentes microbianos em soluções açucaradas por diversos autores. (ACOSTA, S.; LODOS, 1982; IIZUKA; SHIBABE; ITO, 1968; SAMUTA; ARAMAKI; HASHIZUME, 1997)

Segundo Zeller, Oliveira e Zago (1984) a dose mínima de radiação gama para a esterilização de xarope de cana é de 12,67 kGy. Esses autores também encontraram que a dose de 10 kGy de radiação gama é a mais efetiva para conservar o xarope, sobre condições ambientais, durante 105 dias. Os autores ainda observaram que nesse período que o teor de açúcares redutores totais (ATR) é 14 % menor nas amostras testemunhas do que nas amostras de xarope tratadas com 10 kGy de raios gama.

Melaços contaminados com *Bacillus subtilis* têm a carga microbiana reduzida em até 99 % quando submetidos à radiação gama em doses de 5 a 10 kGy (WOLFF; DEAN; URBAIN, 1986).

A radiosensibilidade (valores de D10) de algumas bactérias produtoras de ácido lático associadas com a fermentação foram de 0,61 kGy para o *Lactobacillus brevis*, 0,60 kGy para o *Lactobacillus platarum* e 0,5 kGy para o *Leuconostoc mesenteiroides* (BYUN, M.W. CHA, B.S. KWON, J.H. CHO, 1989).

Ao irradiar o mosto de cana com radiação gama, em doses de 2 a 10 kGy, é observado um aumento na eficiência de fermentativa e na quantidade de

álcool produzido. Esse aumento é equivalente àquele promovido pelo uso de agentes químicos com atividade antimicrobiana (ALCARDE, 2000).

Zago e Rela, (2007), destacaram resultados satisfatórios do uso de feixe de elétrons para o controle de microrganismos contaminantes em sementes de milho. Além disso, ainda relataram que essa tecnologia é promissora para outras aplicações.

Segundo Acosta & Lodos, (1982) e Alcarde (2000), a radiação ionizante obtida a partir de radiação gama pode ser utilizada para o tratamento de mosto visando a fermentação alcoólica. Contudo, a aplicação industrial da radiação gama é limitada pela dificuldade de instalação e de uso de uma fonte contendo elementos radioativos em uma usina. Por outro lado, a utilização de uma fonte emissora de radiação ionizante, equipada com sistema de liga/desliga e versátil, por isso o acelerador de elétrons pode ser mais interessante (ALCARDE, 2000; PODADERA, 2007a; RELA, 2003).

Podadela (2007), avaliou a aplicação de feixe de elétrons para o controle microbiano em açúcar líquido invertido e relatou que o equipamento é bastante interessante para uso na indústria sucroalcooleira porque permite ser instalado diretamente na linha de produção e apresenta simplicidade de operação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais de Execução da Pesquisa

Os trabalhos foram realizados Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares) em parceria com o CENA/USP (Centro de Energia Nuclear na Agricultura) e a ESALQ/USP (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"), através do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN) – Setor de Açúcar e Álcool, no Laboratório de Tecnologia Sucroenergética e Bioenergia (LTSBio).

Foram utilizados os laboratórios e a infraestrutura da Universidade de São Paulo (Laboratório de Tecnologia Sucroenergética e Bioenergia (LTSBio). Setor de Açúcar e Álcool, LAN/ESALQ/USP e Laboratório de Radioentomologia - DVPROD/CENA/USP) e do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Laboratório de Fontes Intensas de Radiação - Aceleradores de Elétrons e Irradiadores Gama (LFIR), do Centro de Tecnologia das Radiações – CTR/IPEN). Nas instalações do CTR-IPEN foram conduzidos os estudos de esterilização do mosto e nas Unidades da USP foram realizados os ensaios de fermentação.

4.2 Material

O melaço utilizado para a fermentação alcoólica foi obtido em uma usina na região de Piracicaba - SP e foi caracterizado no Laboratório de Tecnologia Sucroenergética do Setor de Açúcar e Álcool- LAN/ESALQ/USP.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi adquirida de um supermercado na região de Piracicaba – SP da marca Fleischman®.

4.3 Procedimento experimental

O experimento foi dividido em duas etapas. Na etapa 1 o melaço passou pelo tratamento físico-químicos de clarificação, após clarificação a mosto clarificado foi contaminado com solução contaminante.

Para o preparo do mosto, o melaço foi inicialmente clarificado. Para tal o melaço foi diluído com água destilada para obter teor de 25 ºBrix. Posteriormente, para cada 2 L de melaço diluído e fervido foram adicionadas 2,5 $g.L^{-1}$ de fosfato de sódio monobásico ($NaH_2PO_4.H_2O$). Em seguida, foi realizada a esterilização desse material em autoclave, utilizando temperatura de 120 ºC, 1 atm durante 20 min.

Após esta etapa, o melaço foi resfriado e mantido em repouso por 48 horas. Na sequência, o sobrenadante foi sifonado e submetido ao procedimento de esterilização em autoclave, conforme descrito anteriormente. Para o preparo do mosto obtido a partir de melaço clarificado, o teor de sólidos solúveis foi ajustado para 17,5 ºBrix.

Para o preparo da suspensão de microrganismos contaminantes, foi utilizado um Erlenmeyer de 250 mL no qual foi adicionado 100 mL melaço clarificado ou de mosto com brix de 17,5 e 5 gramas de solo, coletada de um canavial na região de Piracicaba – SP. A coleta do solo foi realizada em profundidade máxima de até 5 cm. Após a inoculação do substrato com o solo, o Erlenmeyer foi mantido incubado, em *shaker*, sob agitação de 80 rpm, em temperatura de 30 °C ,durante 24 h. Decorrido o período de incubação, a suspensão microbiana contaminante foi filtrada em filtro de café, após filtragem a suspensão microbiana contaminante foi retornada para o Erlenmeyer e adicionado mais 100 mL de melaço tratado ou substrato obtido a partir de mosto clarificado, com brix de 17,5, incubando durante 24 h a 30°C mantendo a agitação de 80 rpm. Decorrida a segunda etapa de incubação para a multiplicação dos contaminantes foi feita contagem de microbiana por placa Petri, e resfriado a 4 ºC e mantido até o uso na primeira etapa.

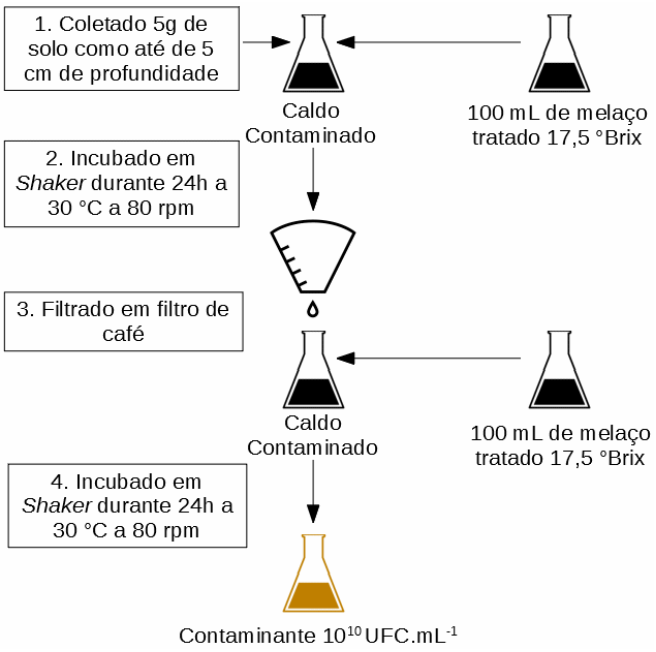

Figura 2 – Fluxograma do cultivo do contaminante.

4.4 Etapa 1 – Ensaio de esterilização por feixe de elétrons

Na primeira etapa do ensaio o material para o ensaio com o feixe de elétrons foi manuseado na sala de preparo do CTR, no qual foi preparado o mosto a partir do melaço clarificado mistura com o contaminante, chegando a uma contaminação 10^7 UFC.mL^{-1} microrganismos totais. O material obtido foi fracionado em 5 grupos de tratamentos, conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Descrição dos tratamentos com radiação por feixe de elétrons.

Tratamentos	Dose de radiação
T0	sem dose
T1	10 kGy
T2	20 kGy
T3	40 kGy
T4	80 kGy

T: Tratamento

Após os tratamentos, os materiais (mostos) passaram por caracterização através de análises químicas e microbiológicas, conforme a Tabela 2 e descritos no Tópico 4.6. Na sequência os mostos foram divido em 5 Erlenmeyer de 500 mL por tratamento, ocupando 200 ml do Erlenmeyer, e encaminhado para segunda parte do experimento.

Tabela 2 – Parâmetros analisados na Etapa 1

Determinações	Método	Referência
Contaminação total	Contagem de placa de ágar	(OLIVEIRA et al., 1996)
Contaminação de bactéria	Contagem de placa de ágar	(OLIVEIRA et al., 1996)
Teor de carboidratos	Cromatografia Iónica	(METROHM, 2006)
5-HMF	Cromatografia Gasosa	(OSHA, 1988)
Furfural	Cromatografia Gasosa	(OSHA, 1988)

Fenólicos Totais	Espectrometria UV-vis	(JULKUNEN-TIITTO, 1985)
Flavonoides	Espectrometria UV-vis	(MABRY et al. 1970)

4.4.1 Ensaios para a esterilização por feixe de elétrons

A irradiação das amostras foi realizada no Centro Tecnológico de Radiações (CTR) do Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares (IPEN – CNEN SP). As amostras foram irradiadas pelo Acelerador Industrial de Elétrons do tipo Dynamitron – Job 188, modelo DC 1500/25/4, fabricado pela empresa RDI-Radiation Dynamics Incorporation®.

O processo de esterilização escolhido foi por bateladas, devido as limitações operações da bancada experimental disponível para o uso do equipamento. Para tratar as amostras de mosto por feixe de elétrons, o mosto foi foi acondicionado em recipientes de borosilicanato (marca Pirex®) e revestidos por filmes plásticos de 0,01 mm de espessura. Cada recipiente recebeu o volume de 300 ml de amostra, o que permitiu forma uma lâmina de mosto de 4 mm de altura. Em cada batelada, 4 recipientes foram irradiados conforme a ilustrado na Figura 3.

Figura 3 – Mesa móvel do Feixe de Elétrons.

O Acelerador de Elétrons foi fixado a energia, largura e corrente do feixe elétrons foi de 1,5 MeV, 112 cm e 5,61 mA, respectivamente. A velocidade de deslocamento da bandeja sob a fonte de feixe de elétrons foi 6,72 $m.mim^{-1}$, proporcionando uma dose 5 kGy por cada vez que passava sob a referida fonte. As doses de radiação aplicadas foram as descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Doses de radiação aplicadas nas amostras em relação ao número de passadas e voltas no acelerador de elétrons.

Tratamentos	Dose de radiação	Nº de passadas
T0	sem dose	0
T1	10 kGy	2
T2	20 kGy	4
T3	40 kGy	8
T4	80 kGy	16

T: tratamento

4.5 Etapa 2 – Ensaio de fermentação alcoólica

Na segunda etapa do experimento foi conduzido ensaio de fermentação alcoólica. Os materiais escolhidos para segunda etapa foram dos tratamentos T0, T1, T2 e T3 disponibilizado da Etapa 4.4.1.

Cada tratamento foi conduzido em 4 Erlenmeyer de 500 mL, representando 4 repetições por tratamento. Em cada um desses Erlenmeyer (biorreator) foram adicionados 200 mL de mosto tratado e inoculada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (3 % $m.v^{-1}$), conforme demonstrado na Figura 4. Todos os biorreatores foram mantidos a 30 °C, sob agitação de 80 rpm até o final da fermentação.

A condução da fermentação foi monitorada pelo desprendimento de CO_2. Para tal, os biorreatores foram pesados a cada 30 minutos. Sendo que, quando a massa desses biorreatores estabilizaram, a fermentação foi considerada encerrada, pois não havia mais desprendimento de CO_2 e por consequência o consumo de substrato.

Ao finalizar as fermentações todas as amostras foram centrifugadas sob 3925 *g* durante 15 minutos. As amostras de vinho delevedurado obtidas foram

armazenadas em freezer, sob temperatura de - 20ºC para posterior análises. As análises químicas e microbiologias são referenciadas na Tabela 4 e descritos no tópico 4.6.

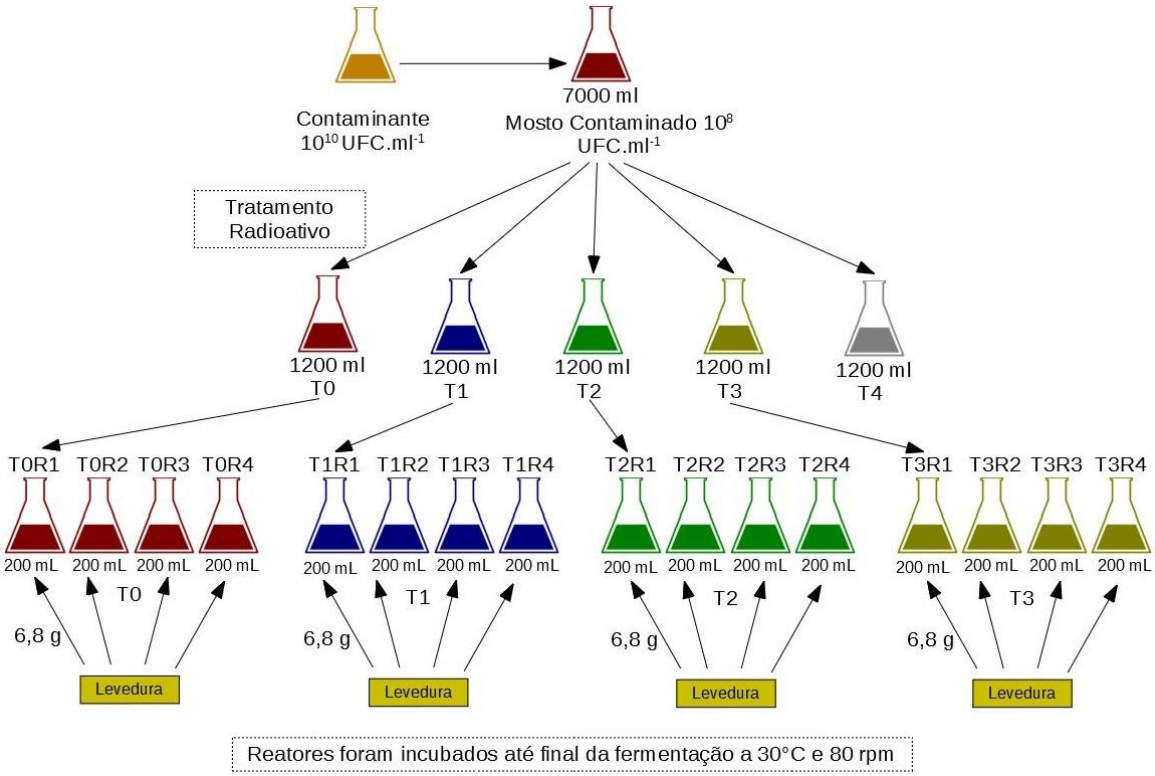

Figura 4 – Ilustração da condução do ensaio de fermentação.

T: Tratamento, R: Repetição.

Tabela 4 – Parâmetros analisados na Etapa 2

Determinações	Método	Referência
Viabilidade celular	Microscopia ótica	(PIERCE, 1970)
Contaminação de bactéria	Contagem de placa de ágar	(OLIVEIRA et al., 1996)
Teor de carboidratos	Cromatografia Iónica	(VIDOTTI et al., 2009)
Teor Alcoólico	Destilação e densidade	(DA SILVA et al., 2003)
Biomassa de levedura	Massa úmida	(DA SILVA et al., 2003)

4.6 Parâmetros avaliados

4.6.1 Análises microbiológicas

a) Análise da viabilidade celular das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*

Foi realizada através da coloração diferencial das células vivas pela solução de azul de metileno 0,1% e a contagem das células vivas e mortas de acordo com Pierce (1970).

Para a análise foi coletado 0,5 mL de vinho levedurado e diluído em 4,5 mL de água destilada, desta solução foi coletado 0,3 mL e adicionado 0,3 mL de solução de azul de metileno 0,1% e agitado para homogeneização; na sequência com 0,1 mL de solução foi transferido para câmera de Neubauer. A contagem da câmera foi feita no microscópio óptico com aumento de 400x, após fazer a contagem dos números de células vivas e mortas foi aplicado a equação 12, Contagem de celular vivas divida pela soma das células vivas e mortas. As contagens foram feitas em triplicatas antes da fermentação e por tratamento após o final da fermentação.

$$VC = cv / (cv + cm) * 100\ \% \qquad (12)$$

VC = Viabilidade Celular

cv = Células vivas

cm = Células mortas

b) Contagem total de microrganismos totais e bactérias totais

Para a contagem total de microrganismos foi feita inoculação das amostras de mosto, tratados, não tratado, antes e após fermentação, em meio de cultivo YEPD.

O meio YEPD foi composto por 1% de extrato de levedura; 1% de peptona; 2% de glicose e 2% para contagem total meio foi utilizado YEPD + 10 mg L^{-1} cicloheximida. Após o preparo, foi esterilizado em autoclave, e vertido em placas de Petri já esterilizadas. Para a diluição das amostras foram utilizados tubos contendo água salinizada 0,1% cloreto de sódio. Para diluição em série foram utilizados tubos com proporção de 10^{-1} por etapa até chegar a diluição de 10^{-8}, de

acordo com metodologias descritas por Oliveira et al. (1996). A partir de cada tubo de amostra diluído foi retirado 0,1 mL de amostra e espalhado em meio em placa com meio solidificado e com o auxílio da alça de Drigalsky, com movimentos circulares. Na sequencia, as placas foram incubadas sob a 30 °C, por 48 horas em câmara para crescimento microbiano. Decorrido esse período foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC).

4.6.2 Análises físico-químicas

a) Determinação de sacarose, frutose, glicose, glicerol e manitol no mosto e no vinho:

Os teores de sacarose, frutose, glicose, glicerol e manitol foram determinados por cromatografia iônica, utilizando cromatógrafo de íons, marca Metrohm® modelo 930 Compact IC Flex, com detector amperométrico e coluna MetrospecCarb 1. Para a análise, foi utilizada uma solução de NaOH 100 mmol L^{-1} como eluente, em velocidade de fluxo de 1 mL $minuto^{-1}$, sob temperatura do forno de 35°C (METROHM, 2006; VIDOTTI et al., 2009).

b) Determinação cromatográfica de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) e Furfural

As análises de 5-HMF e Furfural foram realizadas por cromatografia gasosa, pelo método descrito por Osha (1988). As amostras de mosto foram diluídas 10 vezes e filtradas em filtro tipo Milex® de 0,45 µm de diâmetro de poro. O volume de injeção foi de 2 µL, foi utilizado o cromatógrafo gasoso, modelo CG-2014 da marca Shimadzu®, equipado com detector de ionização de chama (FID). A taxa de split foi 1:8, fase móvel de gás nitrogênio (N_2). Foi utilizada a uma coluna capilar, modelo ZB-5, Phenomemex®, comprimento 60 m, diâmetro da entrada 0,32 mm, espessura de 1,0 µm, a uma vazão do gás de arraste na coluna foi de 6,0 $mL.min^{-1}$, pressão de trabalho 229,0 kPa, vazão total 57,0 $mL.min^{-1}$, velocidade linear 58,6 $cm.s^{-1}$, vazão de 3,0 $mL.min^{-1}$ e tempo de corrida de 41,17 minutos. Na Tabela 5 segue a rampa de aquecimento da corrida.

Tabela 5 – Descrição do sistema cromatográfico utilizado para as análises com o CG.

Temperatura °C	Tempo de retenção Min	Taxa de aquecimento $°C.min^{-1}$
50	5	0
150	5	5
170	1	3
220	1	20

c) Análise de compostos fenólicos totais:

O conteúdo de fenólicos totais foi avaliado segundo Julkunen-Tiitto (1985). O teor de compostos fenólicos nas amostras foi determinado pelo método de Folin–Ciocalteau. Utilizando 100 µL de amostra, misturados em 900 µL de água deionizada, em seguida adicionado 0,5 mL dos reagentes de Folin–Ciocalteau diluído 1:10 (v/v) com água deionizada. Após 40 minutos de reação foram adicionados 2,5 mL de solução de Na_2CO_3 a 4% (m/v). Na sequência, foram realizadas as leituras de absorbância utilizado o espectrômetro UV, modelo Mini-1240, marca Shimadzu® em 725 nm. O conteúdo de fenólicos totais foi expressos como $mg.mL^{-1}$ (em equivalentes de ácido tânico).

d) Análises de flavonoides totais

Os conteúdos de flavonoides totais foram obtidos segundo o método descrito por Mabry et al. (1970). Os conteúdos de flavonoides totais foram determinados a partir de uma mistura de 500 µL das amostras, 4,3 mL de solução 80% de etanol, 0,1 mL de solução a 10% (m/v) de $Al(NO_3)_3$ e 0,1 mL de solução 1 M de acetato de sódio ($C_2H_3NaO_2$). Após 40 minutos de reação, sob temperatura ambiente, a leitura dos valores de absorbância foi feita em espectrofotômetro em comprimento de ondas de 415 nm, marca Shimadzu® e modelo UV-Vis Spectrophotometer UV Mini – 1240. Sendo que o conteúdo de flavonoides foi calculado com base em uma curva de calibração de rutina ($mg.mL^{-1}$) e branco foi utilizado etanol 70%.

4.6.3 Determinação de etanol nos vinhos delevurados

Os vinhos foram centrifugados sob 3925 g, durante 10 minutos, em seguida, 25 mL do vinho delevedurado (sobrenadante) foram transferidos para o injetor de um microdestilador para álcool, modelo TE-012, marca Tecnal e destilado por arraste em vapor, recolhendo-se 25 mL do destilado, em balão volumétrico.

As amostras destiladas foram submetidas à análise de densidade em um densímetro digital, marca Schimidt Haensch, modelo EDM 5000, com temperatura estável a 20 ºC, com desvio de 0,05 ºC. Para a calibração do equipamento, foram injetados ar e água, respectivamente, conforme programação do equipamento. Assim com equipamento calibrado foram transferidas as de amostra no tubo receptor, e tomando cuidado para não haver formação de bolhas de ar dentro do tubo de leitura. Completado o tubo com a amostra, foi realizada a leitura, a qual foi expressa como percentual em volume de álcool puro existente no volume da mistura ($v.v.^{-1}$), correspondente ao ºGL.

4.6.4 Rendimento fermentativo

O rendimento fermentativo foi calculado com base na concentração de açúcares redutores totais e na concentração de álcool no vinho delevedurado. Com base na relação estequiométrica da fermentação alcoólica, foi considerado que 100% de rendimento ocorre quando há formação de 51,11 g (64,75 mL) de etanol a partir de 100 g de açúcares redutores totais.

RF = g de etanol obtidos no vinho / (ART fornecido × 0,5111) x 100 (14)

4.6.5 Produtividade de etanol

Com base na concentração alcoólica do vinho ao final da fermentação, por volume de vinho, e no tempo de fermentação, foi calculada a produtividade, em gramas de álcool por hora ($g.L.h^{-1}$).

4.7 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado para a duas etapas do experimento foi o inteiramente casualizado. Os resultados obtidos nas duas etapas deste projeto foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e ao Teste de comparação de médias de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados foram analisados pelo programa SAS (HERZBERG, 1990).

4.8 Estudo de caso

O estudo de caso foi utilizado produção padrão de um usina sucroalcooleira. Os indicadores de ATR (açúcar total recuperável) e preço do etanol estão conforme a realidade brasileira. Assim as variáveis foram médias do indicadores de 1 ano ou 1 safra.

Os valores de produção de etanol foram calcula a partir das Equações 15 e 16. Foi utilizado valor produção total de cana-de-açúcar de 1 usina sucroalcooleira, vezes porcentagem de ATR por tonelada de cana-de-açúcar, vezes a porcentagem de produção de cada tipo de etanol e divido pelo o fator de conversar de ATR para álcool hidratado (1 L para 1,6913 kg de ATR) e álcool anidro (1 L para 1,7651 kg de ATR) (CONSELHO DOS PRODUTORES DE CANA-DE-AÇÚCAR; PAULO., 2006).

$$EH = PTC * PATR * PEH / 1,6913 \quad (15)$$

$$EA = PTC * PATR * PEA / 1,7651 \quad (16)$$

PTC = Produção total de 1 usina sucroalcooleira

PATR = Porcentagem de ATR por tonelada de cana-de-açúcar

PEH = Porcentagem de ATR voltando para produção e etanol hidratado

PEA = Porcentagem de ATR voltando para produção e etanol anidro

O cálculo de venda do etanol por litro foi utilizado a média da série de preços do litro de etanol de maio de 2018 a abril de 2019 dos indicador semanal do etanol hidratado combustível e do etanol anidro combustível (sem ICMS – Imposto sobre Circulação de Mercadorias e Serviços e PIS/Cofins – Programas de Integração Social – Contribuição para Financiamento da Seguridade Social). Assim estimativa de faturamento bruto em reais da produção total de etanol hidratado utilizou a equação 17 e etanol anidro equação 18.

$$L \text{ de etanol} * PPEH * VH / 0,96 = L \text{ de etanol hidratado} \quad (17)$$

L de etanol * PPEA * VA / 0,996 = L de etanol anidro (18)

PPEH = Porcentagem de produção de etanol hidratado

PPEA = Porcentagem de produção de etanol anidro

VH = Valor médio de venda do etanol hidratado em reais

VA = Valor médio de venda do etanol anidro em reais

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Etapa 1 – Efeitos dos tratamento com feixe de elétrons nos mosto

5.1.1 Análises microbiológicas

Os resultados dos tratamentos avaliados demonstraram que, no tratamento de controle foi observado a média 10^7 UFC.mL^{-1} para microrganismos totais e 10^5 UFC.mL^{-1} para bactérias totais (Tabela 5). Estes resultados corroboram com aqueles informados na literatura, conforme o trabalho conduzido por Lopes et al. (2016). Os tratamentos com aplicação de radiações ionizante propostos demostraram que ocorreram redução contínua de UFC.mL^{-1} para microrganismos totais e para as bactérias, conforme o aumento das doses de radiação aplicadas, com uma exceção pontual observada para a contagem bacteriana no T2. Infere-se que o aumento na contagem bacteriana, observada no T2, pode ter sido por sido específica para este estudo, por motivo não elucidado, e não venha ser uma regra para contagem bacteriana de materiais tratados por feixe de elétrons. Segundo a literatura, os microrganismos contaminantes podem ser diferentes espécies de fungos, leveduras e bactérias, exemplos possíveis são microrganismos dos gêneros *Fusarium*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Torula, Pichia, Bacillus, Lactobacillus, Acetobacter, Clostridium e Leuconostoc*. Todas essas espécies citadas produzem alguns dos seguintes ácidos orgânicos (butírico, acético, fórmico, láctico), que podem prejudicar o processor de produção alcoólica (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006; CAETANO & MADALENO, 2011; CRISTINA; FERREIRA; OMIR, 2008; INAI et al., 2013; SHURYAK, 2019).

O mosto tratado com a dose de 10 kGy (T1), apresentou redução na contagem de microrganismos totais de $4{,}5.10^3$ UFC.mL^{-1} e para contagem de bactérias totais a redução observado foi de $1{,}7.10^2$ UFC.mL^{-1}. Trabalho conduzido por Costa et al. (2018), foi notado a redução de microorganismos totais, de 10^3 UFC.mL^{-1} para bactéria gram-positiva como *Lactobacillus fermentum*, após o tratamento com ácido sulfúrico pH 2,0-3,0 com repouso 1-2 h. E o *Lactobacillus* está entre os gêneros mais encontrados em fermentações alcoólicas industriais (BREXÓ; SANT'ANA, 2017).

No tratamento submetido à dose de 20 kGy (T2) foi observado uma redução de $7,9.10^3$ UFC.mL^{-1} para microrganismos totais e $9,8.10^1$ UFC.mL^{-1} para bactérias totais.

Nas amostras de mosto submetido à dose de 40 kGy (T3) foi observado uma redução de $7,4.10^4$ UFC.mL^{-1} microrganismos totais e $7,2.10^2$ UFC.mL^{-1} bactérias totais. Estes valores foram semelhantes ao observados em estudos do Bayrock et al. (2003), com uso de antibiótico *Penicillin G.* com as doses de 0,1-0,2 mg.L^{-1} que chegam a reduzir 10^5 UFC.mL^{-1} de *Lactobacillus paracasei*.

No tratamento com a dose 80 kGy (T4) foi observado a falta de presença de UFC para microrganismos totais e bactérias totais. Assim o tratamento T4 mostra-se estéril.

A médias dos tratamentos T0 e T1 entre análises de microrganismos totais e bactérias totais é observado diferença significativa, portanto pode representar a presença de microrganismos diferente de bactéria nestas amostras.

As amostras de tratamento T2 e T3 apresenta médias semelhança entre as análises de microrganismos totais e bactérias totais, afirmando o que literatura condiz que bactérias possui menor radiosensibilidade do que os fungos (JUNG; LIM; BAHN, 2017; SHURYAK, 2019).

Na literatura estima-se a dose de radiação ionizante deve ser entre 10-45 kGy para atingir uma redução de 99,99% (equivalente a 10^4 UFC.mL^{-1}) do microrganismos totais. Assim como na literatura, neste trabalho foi observado estas mesmas reduções no T3 (maior que 10^4 UFC.mL^{-1}) e T4 (maior que 10^7 UFC.mL^{-1}), portanto considerando dose 40kGy foi suficiente para atingir estilização comercial (PINTO; MOREIRA, 2018; VASCONCELOS; MELO FILHO, 2010).

O valor D_{10}, Valor de dose para diminuir 90% atividade do microrganismos, para dose de 10 kGy para microrganismos totais 3,05 kGy e para bactérias totais 4,80 kGy, valor dentro do observado na literatura de D_{10} de 1 a 10 kGy para arqueias, procariontes e eucariontes. Existem estudos como espécie de bactérias como *Deinococcus radiodurans* quem valor de D_{10} pode chegar a 12 kGy (JUNG; LIM; BAHN, 2017).

Principais fatores para aumento da radiosensibilidade: comprimento do genoma, mecanismo de recuperação do DNA, substâncias antioxidantes como vitaminas, presença de carotenoides e flavonoides (JUNG; LIM; BAHN, 2017; VARAKUMAR et al., 2014).

No trabalho dos Diezmann & Dietrich (2009) que foi isolar diversas espécies leveduras presentes em vinícolas, em sequência testar sua tolerância a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), foi observado que a levedura da espécie *Saccharomyces c.* presente do solo de videira apresentaram maior tolerância a solução. Portanto os microrganismos presentes no solo podem apresentar um resistência maior a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzidos pela água durante a exposição de doses de radiação ionizante, assim este fator poderá influenciar radioresistência dos microrganismos presentes na solução contaminante deste trabalho.

Tabela 6 – Resultados dos tratamentos de estilização por radiação por feixe de elétrons.

Tratamentos Doses	**YEDP UFC.ml^{-1}**	**YEDP + Ciclohexamida UFC.ml^{-1}**	**C.V. %**	**DMS**
T0 – Controle	$1{,}0.10^7$ ($\pm 0{,}0.10^0$) eB	$1{,}0.10^5$ ($\pm 0{,}0.10^0$) eA	0,00	0,00
T1 – 10 kGy	$5{,}5.10^3$ ($\pm 1{,}8.10^3$) dB	$8{,}3.10^2$ ($\pm 2{,}9.10^2$) cA	5,07	0,38
T2 – 20 kGy	$2{,}1.10^3$ ($\pm 2{,}7.10^2$) cA	$1{,}8.10^3$ ($\pm 6{,}0.10^2$) dA	3,84	0,28
T3 – 40 kGy	$2{,}6.10^2$ ($\pm 8{,}5.10^1$) bA	$2{,}2.10^2$ ($\pm 1{,}5.10^1$) bA	4,35	0,23
T4 – 80 kGy	$0{,}0.10^0$ ($\pm 0{,}0.10^0$) aA	$0{,}0.10^0$ ($\pm 0{,}0.10^0$) aA	0,00	0,00
C.V. (%)	3,06	4,05		
DMS	0,27	0,29		

T: Tratamento; C.V.: Coeficiente de variação; D.M.S.: Diferença mínima significativa. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre si submetidas ao Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na mesma linha, diferem estatisticamente entre si, submetidas ao Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Entre parênteses encontram-se os desvios padrão de cada tratamento.

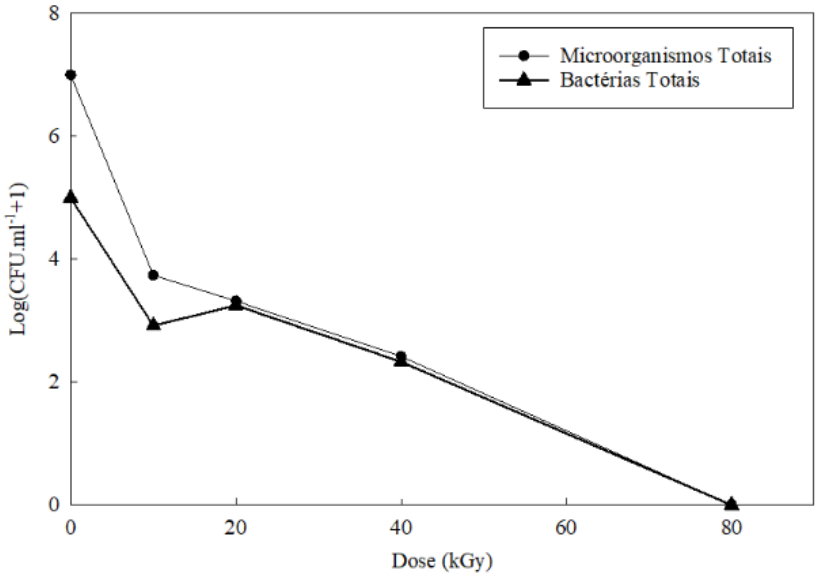

Figura 5 – Tratamentos de estilização por radiação por feixe de elétrons.

5.1.2 Análise de carboidratos, manitol e glicerol

Em todos os tratamentos, os resultados de análise dos mostos demonstrarem que os teores de sacarose (médias 99,65-103,30 $g.L^{-1}$) e glicose (médias 20,88-22,55 $g.L^{-1}$) foram estatisticamente semelhantes entre si. Contudo, os resultados analíticos dos teores de frutose (médias 20,04-22,47 $g.L^{-1}$) nesses mostos apresentaram diferenças entre os tratamentos. As diferenças nos teores de frutose não foram muito expressivas porque o somatória de ART (médias 145,99-152,15 $g.L^{-1}$) nos mostos foram semelhantes entre sim em todos tratamentos. Isto indica que os efeitos das radiações interferiram pouco nas concentrações dos carboidratos.

Os resultados da estabilidade dos teores carboidratos estão de acordo com aqueles demonstrados no trabalho de Lima (2012), quem analisou possíveis mudanças na coloração do xarope de caldo de cana-de-açúcar após tratamentos com radiações ionizantes. No trabalho desse autor, os teores de carboidratos em materiais submetidos à doses de 0 a 20 kGy mostraram resultados semelhantes entre si após exposição de radiação ionizantes do cobalto 60 ou feixe de elétrons. No trabalho conduzido Oliveira et al., (2008) no qual foi adicionado caldo de cana de açúcar em suco de frutas e submetido a radiação gama, não observaram diferenças nos teores de carboidratos entre tratamentos com dose de até 20 kGy. Em outro estudo, realizado por Zeller, Oliveira & Zago (1984) submetendo xarope

de cana-de-açúcar à doses de radiação de 0 a 40 kGy, também não verificaram diferenças nos teores de sacarose, glicose e frutose entre tratamentos os investigados.

Nas amostra analisadas não foi encontrado presença de glicerol e as análises de teor de manitol apresentaram diferença significativa, mas não expressivas para ser discutidas. Todos valores analisados estão expostos na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultados da análises de carboidratos após tratamento radiação por feixe de elétrons.

Trat.	Sacarose	Frutose	Glicose	Manitol	Glicerol	ART
	$g.L^{-1}$	$g.L^{-1}$	$g.L^{-1}$	$g.L^{-1}$	$g.L^{-1}$	$g.L^{-1}$
T0 – 0 kGy	102,03 (±0,09) a	22,47 (±0,31) b	22,55 (±0,14) a	0,28 (±0,01) ab	n.d.	152,15 (±0,52) a
T1 – 10 kGy	102,77 (±0,47) a	21,04 (±0,89) ab	22,24 (±1,43) a	0,28 (±0,01) ab	n.d.	151,19 (±2,44) a
T2 – 20 kGy	103,30 (±3,79) a	20,04 (±1,00) a	20,88 (±1,55) a	0,30 (±0,06) b	n.d.	149,38 (±4,33) a
T3 – 40 kGy	99,65 (±0,09) a	20,35 (±0,54) a	21,00 (±0,65) a	0,27 (±0,01) ab	n.d.	145,99 (±1,19) a
T4 – 80 kGy	101,49 (±2,30) a	20,10 (±0,11) a	21,05 (±0,13) a	0,22 (±0,02) a	n.d.	147,72 (±2,65) a
C.V. (%)	1,96	3,19	4,60	10,05	n.d.	1,73
DMS	5,36	1,78	2,66	0,07	n.d.	6,94

T: Tratamento; C.V.: Coeficiente de variação; D.M.S.: Diferença mínima significativa. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre si submetidas ao Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Entre parênteses encontram-se os desvios padrão de cada tratamento.

5.1.3 Análise de potenciais Inibidores da fermentação

As análises de flavonoides totais (médias 23,47-27,99 $mg.L^{-1}$), furfural (médias 0,61-0,64 $mg.L^{-1}$) e 5-HMF (médias 0,43-0,45 $mg.L^{-1}$) não demostraram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre médias por tratamento, afirmando a falta de degradação dos carboidratos apresentados na Tabela 7, logo as doses de radiação

não deve produzir esses inibidores que podem prejudicar viabilidade celular das leveduras durante a fermentação alcoólica (EGGLESTON; AMORIM, 2006; MOLINS, 2001).

Em relação aos teores de compostos fenólicos totais nos mostos submetidos aos tratamentos T1 (980,68 $mg.L^{-1}$), T2 (1012,64 $mg.L^{-1}$), T3 (1089,38 $mg.L^{-1}$), T4 (1108,79 $mg.L^{-1}$), em comparação com o tratamento controle (T0:925,27 $mg.L^{-1}$), foram encontrados aumentos de 6 %, 9,44 %, 17,74 % e 19,83 % (Figura 6), respectivamente. Os resultados média do tratamento T0 (Tabela 8) foi diferente dos demais tratamentos. Logo os resultados das médias dos tratamentos T1 e T2 foram semelhantes entre si e diferente dos de T3 e T4 que são semelhantes entre si.

O crescimento de composto fenólicos pode ser justifica pela degradação de compostos complexos em composto mais simples, como ácidos fenólicos, que devem apresentar no mosto tratado. Trabalho como De Camargo et al. (2011) esse tipo de degradação em composto fenólicos foram observados em amendoim tratados em dose 10 e 15 kGy, outra trabalho como de Varakumar et al. (2014) com suco de manga com tratamentos de 0 a 5 kGy, mostraram aumento até 21,1% de aumento de fenólicos simples. O trabalho dos Jayaprakasha & Patil (2006) com frutas cítricas e laranja-de-sangue relatados vários compostos polifenólicos em frutas e vegetais que exibem atividades antioxidantes, assim a decomposição do fenólicos complexo podem reativar porção fenólica, por capturando radicais livres via doação de hidrogênio ou doação de elétrons.

Tabela 8 – Resultados da análises de química após tratamentos com radiação por feixe de elétrons.

Tratamentos	Fenólicos totais (mg.L^{-1})	Flavonoides totais (mg.L^{-1})	Furfural (mg.L^{-1})	5-HMF (mg.L^{-1})
T0 – 0 kGy	925,27 (±13,72) a	26,74 (±1,57) a	0,61 (±0,00) a	0,44 (±0,00) a
T1 – 10 kGy	980,68 (±11,74) b	23,47 (±5,22) a	0,64 (±0,02) a	0,44 (±0,03) a
T2 – 20 kGy	1012,64 (±16,20) b	25,18 (±7,92) a	0,63 (±0,02) a	0,43 (±0,01) a
T3 – 40 kGy	1089,38 c(±9,94) c	25,44 (±1,11) a	0,62 (±0,01) a	0,43 (±0,02) a
T4 – 80 kGy	1108,79 (±28,00) c	27,99 (±4,61) a	0,63 (±0,01) a	0,45 (±0,00) a
C.V. (%)	1,68	18,61	2,33	4,04
DMS	46,11	12,88	0,04	0,05

T: Tratamento; C.V.: Coeficiente de variação; D.M.S.: Diferença mínima significativa. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre si submetidas ao Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Entre parênteses encontram-se os desvios padrão de cada tratamento.

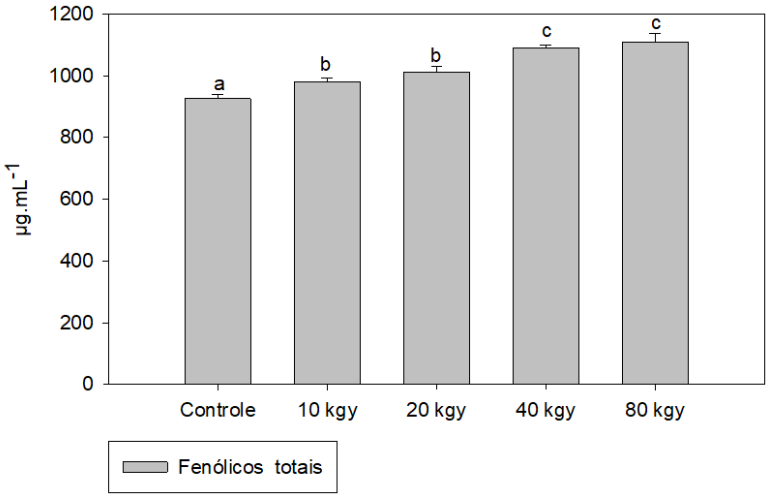

Figura 6 – Concentrações de compostos fenólicos totais (µg L^{-1}) em mostos submetidos à diferentes doses de radiação gerada por feixe de elétrons.

5.2 Etapa 2 – Fermentação Alcoólica

Durante a fermentação o monitoramento do desprendimento de CO_2 foi utilizado para acompanhar a fermentação. Quando os pesos dos reatores estabilizassem foi o término das fermentações. As fermentações duraram em média de 8 horas. Esse resultado é semelhante ao observado na fermentação da indústria, segundo as informações de Walter et. al., (2015), em investigação utilizando mosto contendo 150 $g.L^{-1}$ de ART (17,5 °Brix). Os teores de açúcares encontrados também foram semelhantes aos recomendados por alguns autores para a indústria sucroalcooleira, fica em 16 a 18% (TONOLI, 2017). Concentrações maiores do que essas podem influenciar negativamente a fermentações, através da inibição das levedura e diminuição do rendimento fermentativo (NOVELLO, 2015).

5.2.1 Açúcares redutores totais residuais no vinho

As análise de teor de sacarose não foi detectado a presença da sacarose em todos os tratamento. Com isso pode-se dizer que microrganismo presentes em todos tratamentos foi capaz de consumir toda sacarose presente no mosto.

Foi observado nas médias das somatória de ART dos vinhos a semelhança entre os tratamento T0 (0,35 $g.L^{-1}$) e T01 (0,38 $g.L^{-1}$), e diferente do T2 (0,51 $g.L^{-1}$) e T3 (0,44 $g.L^{-1}$) que ambos são diferentes entre si.

Apesar do mosto ser derivado de melaço, que geralmente possui quantidade maior de açucares redutores do que a o mosto derivado de caldo de cana ou xarope, a presença de açúcar redutores no final da fermentação foi de 0,5% do inicial, assim essa diferença observada entre tratamento se torna irrelevante para fim deste trabalho. O teor frutose (0,10-0,14 $g.L^{-1}$) presente não teve sua ação de inibição ou estimulante na fermentação devido seu valor não está entre valores 4,33-6,05% para estimular e 59,56-63,85% para inibir a fermentação (ARROYO-LÓPEZ; QUEROL; BARRIO, 2009).

Tabela 9 – Análises físico-químicas do vinho.

Tratamentos	Sacarose	Frutose	Glicose	ART
	$g.L^{-1}$	$g.L^{-1}$	$g.L^{-1}$	$g.L^{-1}$
T0 – 0 kGy	n.d.	0,10 (±0,01) a	0,25 (±0,01) ab	0,35 (±0,02) a
T1 – 10 kGy	n.d.	0,14 (±0,01) ab	0,24 (±0,02) a	0,38 (±0,03) a
T2 – 20 kGy	n.d.	0,13 (±0,01) b	0,39 (±0,04) c	0,51 (±0,05) c
T3 – 40 kGy	n.d.	0,11 (±0,01) ab	0,32 (±0,32) bc	0,44 (±0,01) b
C.V. (%)	n.d.	16,43	13,59	9,31
DMS	n.d.	0,04	0,08	0,07

T: Tratamento; C.V.: Coeficiente de variação; D.M.S.: Diferença mínima significativa. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre si submetidas ao Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Entre parênteses encontram-se os desvios padrão de cada tratamento.

5.2.2 Manitol

Foram observados aumentos dos teores manitol entre o início e o término das fermentações de 46%, 39%, 26% e 18% respectivos aos tratamento T0, T1, T2 e T3.

A média do tratamento T0 (0,41 $g.L^{-1}$) é semelhança com T1 (0,39 $g.L^{-1}$) e diferente de T2 (0,38 $g.L^{-1}$) e T3 (0,32 $g.L^{-1}$). A media do tratamento T1 mostra semelhança com T2 e diferente de T3 que difere de todos tratamentos (Tabela 9).

O aumento da presença de teor manitol pode ser utilizado como um indicador de presença de contaminantes no mosto da pós fermentação, com aumento deste composto pode se tornar um problema se encontrado em concentrações maiores do que 2,5 $g.L^{-1}$, que prejudicaria a viabilidade celular podendo prejudicar a produção de etanol (EGGLESTON et al., 2007; EGGLESTON; LEGENDRE; TEW, 2004; LOPES et al., 2016).

Tabela 10 – Análise de teor de manitol, antes e depois da fermentação alcoólica

Tratamentos	**Manitol**	**Manitol**
	$g.L^{-1}$	$g.L^{-1}$
Fermentação	Antes	Depois
T0 – 0 kGy	0,28 (±0,01) ab	0,41 (±0,02) c
T1 – 10 kGy	0,28 (±0,01) ab	0,39 (±0,01) bc
T2 – 20 kGy	0,30 (±0,06) b	0,38 (±0,02) b
T3 – 40 kGy	0,27 (±0,01) ab	0,32 (±0,00) a
C.V. (%)	10,05	3,51
DMS	0,07	0,02

T: Tratamento; C.V.: Coeficiente de variação; D.M.S.: Diferença mínima significativa. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre si submetidas ao Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Entre parênteses encontram-se os desvios padrão de cada tratamento.

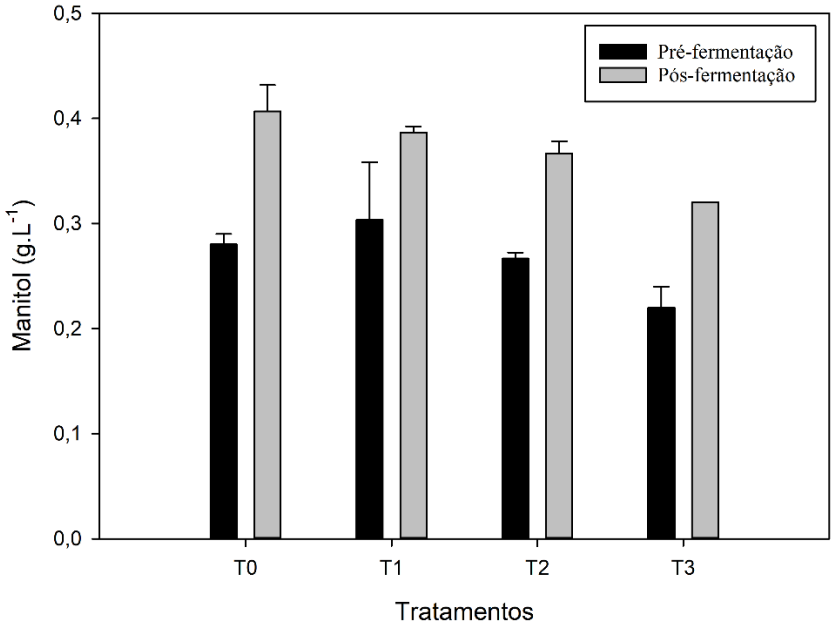

Figura 7 – Diferença do teor de manitol durante fermentação.

5.2.3 Glicerol

Em relação aos teores de glicerol não foram detectados presença de desse composto antes da fermentação, após as fermentações os teores de glicerol foram semelhantes entre si, conforme o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). O tratamentos apresentaram médias de glicerol de 15,52-16,01 $g.L^{-1}$ (Tabela 10) valor superior do

que citado por Ponce et al. (2016) que uma fermentação sem influencias não deve passar de 1% $m.v^{-1}$, logo isso mostra levedura sofreu estresse osmótico elevando a produção de glicerol.

Ao se utilizar a *Saccharomyces cerevisiae* para fermentação tem seu principal produto o etanol, mas nesse processo a produção de outro subprodutos e o mais abundante deles é o CO_2, seguido pelo glicerol, o qual é uma resposta primaria da levedura a osmotolerância, que está relacionado ao aumento da atividade das enzimas glicerol-3-fosfato desidrogenase e glicerol-3-fosfato fosfatase (JONES; GADD, 1990; MELO, 2006).

Existem alguns fatores que influenciam na produção de glicerol, pode se citar a contaminação do mosto durante a fermentação. Segundo Cherubin (2003), durante a fermentação alcoólica a contaminação na ordem 10^7 UFC mL^{-1} elevou a formação de glicerol de 10,9% a 14,7%. Outros fatores podem influenciar na produção de glicerol, como mostra o trabalho do D'Aamore et al. (1988), os quais descrevem que em fermentação com mais de mais de 20% de açúcares pode influenciar o aumento de produção do glicerol, assim tal comportamento se justifica como defesa da levedura contra pressão osmótica causada pelo alto teor de açucares ou por ambiente adversos como valores de pH < 3,5, falta de nutrientes, alta temperatura e metabólicos como acúmulo de etanol que inibi o crescimento celular (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008; PEREIRA et al., 2012; TONOLI, 2017).

Em todos os tratamentos foram encontrados médias de glicerol de 15,52-16,01 $g.L^{-1}$ valores maiores do que citado por Ponce et al. (2016). Estes autores relatam que fermentações não deve passar de 1% $m.v^{-1}$ (10 $g.L^{-1}$) de glicerol, portanto para todos tratamentos as levedura sofreram estresse osmótico elevando a produção de glicerol.

Tabela 11 – Concentrações de glicerol no vinho ($g.L^{-1}$)

Tratamentos	Glicerol $g.L^{-1}$	Glicerol $g.L^{-1}$
Fermentação	Antes	Depois
T0 – 0 kGy	n.d.	15,52 (±0,69) a
T1 – 10 kGy	n.d.	15,61 (±0,16) a
T2 – 20 kGy	n.d.	16,01 (±0,30) a
T3 – 40 kGy	n.d.	15,86 (±0,14) a
C.V. (%)		2,72
DMS		0,77

T: Tratamento; C.V.: Coeficiente de variação; D.M.S.: Diferença mínima significativa. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre si submetidas ao Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Entre parênteses encontram-se os desvios padrão de cada tratamento.

5.2.4 Viabilidade celular

Os resultados de análises da viabilidade celular das leveduras no final da fermentação, todas as média ser tonaram semelhantes.

As leveduras utilizadas para os ensaios de fermentação foram provenientes do mesmo lote e apresentaram viabilidade inicial média de 88%. Depois dos ensaios de fermentação foi verificado que a viabilidade celular das leveduras reduziu para a faixa de 79,48-81,28 %. De modo que foram observadas perdas de viabilidade celular da ordem de 9 a 10%. Esta queda de viabilidade possivelmente se deve por causa do esgotamento dos teores nutrientes e a formação de inibidores durante a fermentação, pois os resultados são semelhantes entre todos os tratamentos. Isso indica que a contaminação não deve ter exercido efeito sobre a viabilidade celular das leveduras.

Estudos mostram que contaminação acima de 10^8 UFC mL^{-1} pode causar queda na viabilidade das leveduras de até 60 % após 5 ciclos fermentativos (CHIN; INGLEDEW, 1993). Nobre et. al (2007) ao estudar o cultivo misto de *S. cerevisiae* e *B. subtilis* observaram que contaminações acima de 10^6 UFC mL^{-1} reduziram em 59,2 % a viabilidade da levedura.

Tabela 12 – Viabilidade celular pós fermentação

Tratamento	Viabilidade %
T0 – Cont.	81,28 (±2,23) a
T1 – 10 kGy	80,40 (±2,28) a
T2 – 20 kGy	79,48 (±1,84) a
T3 – 40 kGy	80,65 (±1,70) a
C.V. (%)	2,52
DMS	3,67

T: Tratamento; C.V.: Coeficiente de variação; D.M.S.: Diferença mínima significativa. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre si submetidas ao Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Entre parênteses encontram-se os desvios padrão de cada tratamento.

5.2.5 Contagem de bactérias totais

No término da fermentação foram feitas análises de bactérias totais para avaliar contaminação bacteriana do processo. A média do tratamento T0 ($5,1.10^5$ UFC ml^{-1}) se mostrou diferente dos T1 ($6,5.10^2$ UFC ml^{-1}), T2 ($1,8.10^2$ UFC ml^{-1}) e T3 ($6,4.10^2$ UFC ml^{-1}) e estes são semelhantes entre tratamentos (Tabela 12). T2 se mostrou diferença entre análises de bactérias totais antes e depois da fermentação com queda de $1,0.10^1$ UFC ml^{-1} da contagem de bactérias totais. A Figura 8 mostra comparação entre contagem de baterias totais antes e depois da fermentação.

Conforme Lopes et al. (2016) contaminação por bactérias normalmente encontrada no processo produção e etanol por tonelada está em torno 3.8-9.9 x 10^7 UFC.mL^{-1}. assim todos tratamentos mostraram médias menores do que citado na literatura.

Tabela 13 – Analises antes e depois da fermentação de contagem de bactérias totais.

Tratamentos	YEDP + Ciclohexamida UFC ml^{-1}	YEDP + Ciclohexamida UFC ml^{-1}	C.V.	DMS
Fermentação	Antes	Depois	%	
T0 – 0 kGy	$1,0.10^5$ ($\pm 0,0.10^0$) dA	$5,1.10^5$ ($\pm 4,2.10^5$) bA	4,98	0,59
T1 – 10 kGy	$8,3.10^2$ ($\pm 2,9.10^2$) bA	$6,5.10^2$ ($\pm 5,9.10^2$) aA	10,90	0,68
T2 – 20 kGy	$1,8.10^3$ ($\pm 6,0.10^2$) cB	$1,8.10^2$ ($\pm 4,4.10^1$) aA	4,57	0,28
T3 – 40 kGy	$2,2.10^2$ ($\pm 1,5.10^1$) aA	$6,4.10^2$ ($\pm 6,9.10^2$) aA	14,04	0,78
C.V. (%)	3,62	11,18		
DMS	0,31	0,95		

T: Tratamento; C.V.: Coeficiente de variação; D.M.S.: Diferença mínima significativa. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre si submetidas ao Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na mesma linha, diferem estatisticamente entre si, submetidas ao Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Entre parênteses encontram-se os desvios padrão de cada tratamento.

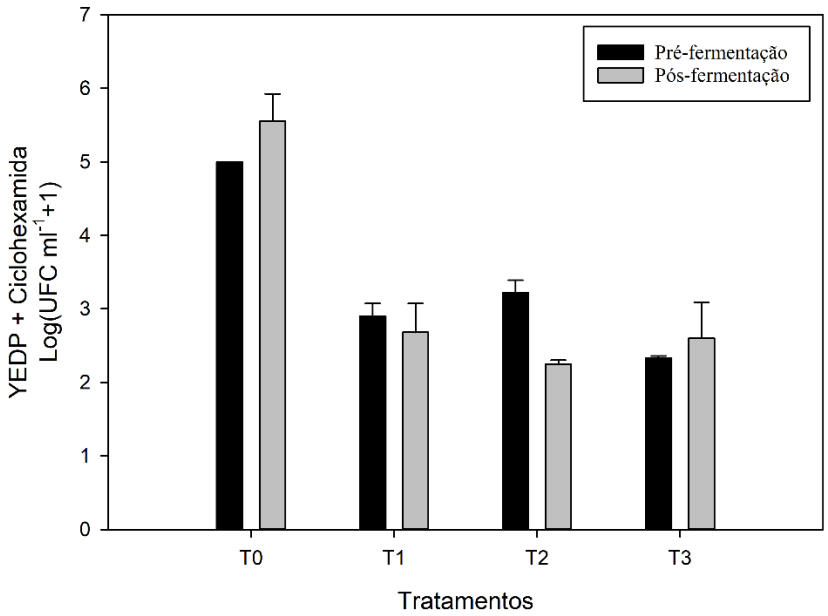

Figura 8 – Contagens de bactérias totais em amostras de mostos submetidos aos diferentes tratamentos, antes e após a fermentação

5.2.6 Teor Alcoólico, produtividade e rendimento

Em relação teor alcoólico e a produtividade, foi observador a semelhança entre médias tratamento T0 (teor alcoólico: 8,47 $v.v^{-1}$, produtividade: 10,5 $v.v^{-1}.h^{-1}$) e T3 (teor alcoólico: 8,65 $v.v^{-1}$, produtividade: 10,8 $v.v^{-1}.h^{-1}$) são diferentes de T1 (teor alcoólico: 8,81 $v.v^{-1}$, produtividade: 11,1 $v.v^{-1}.h^{-1}$) e T2 (teor alcoólico: 8,80 $v.v^{-1}$, produtividade: 11,0 $v.v^{-1}.h^{-1}$) e os T1, T2 e T3 são semelhantes entre si. O cálculo de produtividade foi considerando a média de produção durante as 8 horas de fermentação.

O cálculo de rendimento foi observado que a média de T0 (88 %) e diferente de T1 (92 %), T2 (93 %) e T3 (93 %) que são semelhantes entre si. Foi observado uma diferença de 5% entre T0 e T3 (Figura 9). A fim de esclarecimento não houve detecção de etanol antes da fermentação em todos tratamentos. O ART do fim da fermentação foi subtraído do valor inicial para calcula o rendimento fermentativo.

Essas diferenças do teor alcoólico e produtividade se justificada pelas pequenas variações de açúcares no início da fermentação que se torna irrelevante após o cálculo do rendimento.

Para Ferrari (2013) que avaliando a cinética do processo fermentativo observou rendimentos fermentativo variando de 73,2 a 87%, estudos como de Borges (2008) avaliando o processo de fermentação em batelada alimentada também verificou rendimentos entre 81 e 84,3% e Walter et al. (2015) comenta industrial valores de rendimentos alcoólicos para fermentações de 16-17% ART pode chegar a 91%, logo o tratamento controle está dentro do que se encontra na usina e o tratamento com radiação chegam a valores superior do que literatura demostra.

Tabela 14 – Análises pós-fermentação de teor alcoólico, produtividade e rendimento alcoólico

Tratamento	Teor Alcoólico ($v.v^{-1}$)	Produtividade ($v.v^{-1}.h^{-1}$)	Rendimento %
T0 – 0 kGy	8,47 (±0,23) a	10,5 (±0,03) a	88 (±2) a
T1 – 10 kGy	8,81 (±0,16) b	11,0 (±0,02) b	92 (±2) b
T2 – 20 kGy	8,80 (±0,05) b	11,1 (±0,01) b	93 (±1) b
T3 – 40 kGy	8,65 (±0,16) ab	10,8 (±0,02) ab	93 (±2) b
C.V. (%)	1,94	1,72	1,99
DMS	0,24	0,03	0,01

T: Tratamento; C.V.: Coeficiente de variação; D.M.S.: Diferença mínima significativa. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre si submetidas ao Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Entre parênteses encontram-se os desvios padrão de cada tratamento.

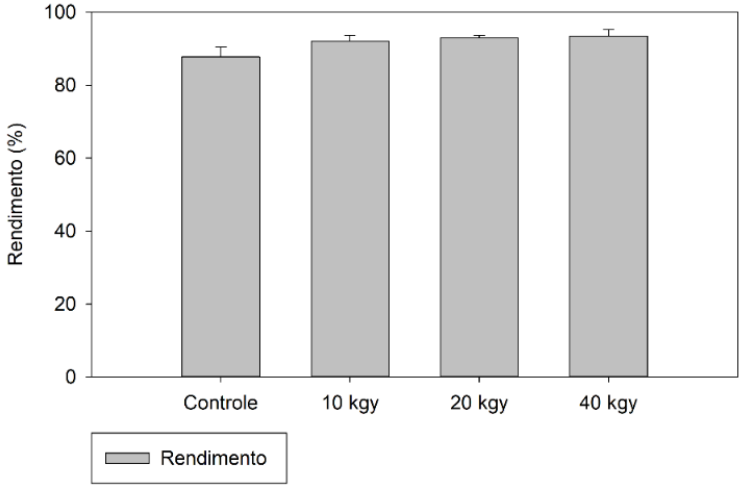

Figura 9 – Rendimentos fermentativos de mostos submetidos aos diferentes tratamentos de aplicação de radiações ionizantes.

5.3 Estudo de caso – influência do rendimento alcoólico no faturamento de uma usina produtora de etanol padrão

Este estudo de caso está baseado nos indicadores médios de produtividade observados no setor sucroenergético brasileiro, na safra 2018/2019 Para o cálculo foi utilizado uma usina padrão que processo 2.000.000 de toneladas de cana por safra ano. Também foi considerado para as estimativas que o ATR (açúcar total recuperável) médio da cana de 140,61 kg por tonelada de cana-de-

açúcar. Além disso, que 45,72% do ATR é destinado a produção de etanol de hidratado e 19,34% do ATR é destinado a produção de etanol anidro. Também foi foram utilizados como preço de comercialização do etanol pela usina de R$ 1,64 L^{-1} para etanol hidratado e R$ 1,80 L^{-1} para etanol anidro (CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA, 2019; COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2019).

Foi considerado nas análises de rendimento desse experimento e calculado o faturamento bruto do cenário da safra de 2018/2019. Considerando o cenário do tratamento T0, T1, T2 e T3 (rendimento de 88%, 92%, 93% e 93%) o valor do faturamento bruto ficaram 158,52, 165,73, 167,52 e 167,52 milhões de reais respectivamente. A simulação demonstrou aumento de faturamento a medida que se aumentou as doses de feixe de elétrons, conforme os Tratamento T1, T2 e T3, e chegando ao acréscimo de R$ 9.000.000,00/ano, considerando o tratamento com as doses de 40 e 80 kGy.

Assim este estudo de caso demonstra o crescimento expressivo de 6% no faturamento da empresa, em função do aumento do rendimento e da produção, sem necessidade de aumento da quantidade de matéria-prima primária. Com base nos resultados obtidos nesse estudo, os próximo passo seria a condução de estudo de esterilização aplicando feixe de elétrons em escala de plano de piloto.

Tabela 15 – Faturamento bruto de etanol por rendimentos alcoólicos de 1 usina sucroalcooleira

Tratamento	**Rendimento**	**Faturamento bruto**			**Aumento**	
		etanol hidratado	etanol anidro	total		
	%	Milhões R$	Milhões R$	Milhões R$	Milhões R$	%
T0 – 0 kGy	88	109,71	48,80	158,52	-	0
T1 – 10 kGy	92	114,70	51,03	165,73	7,20	5
T2 – 20 kGy	93	115,94	51,58	167,52	9,00	6
T3 – 40 kGy	93	115,94	51,58	167,52	9,00	6

6 CONCLUSÕES

O tratamento de mosto por feixe de elétrons é eficiente para a esterilização do mosto. A dose de 40 kGy é o suficiente para atingir a esterilização comercial. Contudo, para a esterilização completa do mosto há necessidade de utilizar doses de 80 kGy;

Em relação aos efeitos da aplicação de radiações ionizantes, geradas a partir de feixe de elétrons, sobre os açúcares do mosto, não são verificadas alterações nas concentrações desses compostos até a dose de 80 kGy;

No que tange a formação de compostos inibidores da fermentação, em função do tratamento do mosto com feixe de elétrons em dose de até 80 kGy não são observadas as formações de 5-HMF, furfural e flavonoides totais. Por outro lado, os teores de compostos fenólicos totais no mosto são afetados pela aplicação de altas doses de radiação. No entanto, não apresentando níveis prejudiciais ao rendimento e produtividade da fermentação alcoólica;

O tratamento do mosto com radiações ionizantes provenientes de feixe de elétrons, em doses que levam a esterilização, podem permitir a remoção dos processos de controle microbiológicos atualmente utilizadas nas usinas produtoras de etanol no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACOSTA, S.; LODOS, J. The action of gamma radiation on sugar cane as a new sterilization method. ***Sugar y Azucar***, v. 77, 1982.

2. AL-ASSAF, S.; COQUERET, X.; ZAMAN, K.; MOHD, H.; MURAT, D.; ULANSKI, S. P.; ALBANIA, A. ***The Radiation Chemistry of Polysaccharides*.** Vienna: International Atomic Energy Agency, 2016. Disponível em: <http://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/P1731_web.pdf> Acesso em: 15 maio 2019

3. ALCARDE, A. R. ***Efeito da radiação gama em alguns parâmetros microbiológicos e bioquímicos da fermentação alcoólica.*** 2000**.** 111 p. (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura CENA/USP. Disponível em: <http://www.teses.usp.br> Acesso em: 15 maio 2019.

4. ALTERTHUM, F.; CRUZ, M. R. M.; VAIRO, M. L. R.; GAMBASSI, D. M. Efeitos dos micro-organismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. ***STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos***, v. 3, p. 42-49, 1984.

5. AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; CAMPOS, H. **Infecção, problema sério na produção de álcool**. in: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS DO BRASIL, 2rd, Rio de Janeiro, Brasil 1981 ***Proceedings…*** Piracicaba: STAB, 1981. v.1, p.158-168.

6. AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. Infecção na fermentação: como evitá-la. ***Álcool e Açúcar***, v. 2, p. 12-18, 1982.

7. ANDRIETTA, M. DA G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. Bioetanol: Brasil, 30 anos na vanguarda. ***Revista Multiciência: Construindo a História dos produtos naturais***, p. 1-16, 2006.

8. ARROYO-LÓPEZ, F. N.; QUEROL, A.; BARRIO, E. Application of a substrate inhibition model to estimate the effect of fructose concentration on the growth of diverse Saccharomyces cerevisiae strains. ***Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology***, v. 36, n. 5, p. 663-669, 2009.

9. BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. ***Biotechnology advances***, v. 26, n. 1, p. 89-105, 2008.

10. BAYROCK, D. P.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Control of Lactobacillus contaminants in continuous fuel ethanol fermentations by constant or pulsed addition of penicillin G. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, v. 62, n. 5-6, p. 498-502, 2003.

11. BHAT, R.; KARIM ALIAS, A.; PALIYATH, G. ***Use of Electron Beams in Food Preservation. In Progress in Food Preservation***. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781119962045.ch17>

12. BORGES, P. C. S. **Otimização dinâmica da fermentação alcoólica no processo em batelada alimentada**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia UFU, Uberlândia. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/> Acesso em: 15 maio 2019.

13. BORRELY, S. I.; DEL MASTRO, N. L.; SAMPA, M. H. O. Improvement of municipal wastewaters by electron beam accelerator in Brazil. ***Radiation Physics and Chemistry***, v. 52, n. 1-6, p. 333–337, 1998.

14. BOTHNER-BY, C. T.; BALAZS, E. . Effect of ionizing radiation on glucose solutions. ***Radiation Research***, v. 6, p. 302-317, 1957.

15. BRAZZACH, M.L. AQUARONE, E. COLOMBO, A.J. Emprego de desinfetante quimico em fermentacao alcoolica de mosto de melaco de cana. ***AGRIS,*** p. 1-21, 1976.

16. BREXÓ, R. P.; SANT'ANA, A. S. Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. ***Renewable and Sustainable Energy Reviews***, v. 73, p. 423-434, 2017.

17. BYUN, M.W. CHA, B.S. KWON, J.H. CHO, H. . The combined effect of heat treatment and irradiation on the inactivation of major lactic acid bacteria associated with Kimchi fermentation. ***Korea Agricultural Science Digital Library***, 1989.

18. METROHM. ***Práticas em Cromatografia de íons****.* 2rd ed. Herisau, Suiça, 2006

19. MORAES, M. C. F.; F ROMANELLI, M.; C SENA, H.; SILVA, G. P. DA; SAMPA, M. H.; BORRELY, S. Whole acute toxicity removal from industrial and domestic effluents treated by electron beam radiation: emphasis on anionic surfactants. ***Radiation Physics and Chemistry***, v. 71, p. 463-465, 2004

20. CAETANO, A. C. G.; MADALENO, L. L. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. ***Ciência & Tecnologia: FATEC-JB***, v. 2, n. 1, p. 27-31, 2011.

21. CECCATO-ANTONINI, S. R. Conventional and nonconventional strategies for controlling bacterial contamination in fuel ethanol fermentations. ***World Journal of Microbiology and Biotechnology***, v. 34, n. 6, p. 1-11, 2018.

22. CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. ***Etanol***. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/indicador/etanol.aspx>. Acesso em: 15 maio 2019.

23. CHATTERJEE, S.; KUMAR, V.; KHOLE, S.; SANYAL, B.; MURALI, T.S.;

VARIYAR, P. S. Radiation processing: An effective quality control tool for hygienization and extending shelf life of a herbal formulation, Amritamehari churnam. ***Journal of Radiation Research and Applied Sciences***, v. 9, n. 1, p. 86-95, jan. 2016.

24. CHERUBIN, R. A. Efeitos da Viabilidade da Levedura e da Contaminaçao Bacteriana na Femnetação Alcoolica. 2003. p. 124. Tese (Doutorado em Agronomia) Escola Superior de Agricultura Luiz da Queiroz - ESALQ/USP, Piracicaba. Disponível em: <http://www.teses.usp.br> Acesso em: 15 maio 2019.

25. CHIN, P. M.; INGLEDEW, W. M. Effect of recycled laboratory backset on fermentation of wheat mashes. ***Journal of agricultural and food chemistry****,* USA, 1993.

26. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. ***Safra Brasileira de Cana-de-açúcar***. 2019. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>. Acesso em: 15 maio 2019.

27. CONSELHO DOS PRODUTORES DE CANA-DE-AÇÚCAR. ***Manual de Instruções***. 5rd, Piracicaba, 2006.

28. COSTA, M. A. S.; CERRI, B. C.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Ethanol addition enhances acid treatment to eliminate Lactobacillus fermentum from the fermentation process for fuel ethanol production. ***Letters in Applied Microbiology***, v. 66, n. 1, p. 77-85, 2018.

29. CRISTINA, I.; FERREIRA, B.; OMIR, M. A qualidade da cana-de-açúcar como matéria-prima para produção de álcool. ***Nucleus***, p. 82–92, 2008.

30. D'AMORE, T.; PANCHAL, C. J.; RUSSEIL, I.; STEWART, G. G. Osmotic pressure effects and intracellular accumulation of ethanol in yeast during fermentation. ***Journal of Industrial Microbiology***, v. 2, n. 6, p. 365-372, jan. 1988.

31. DA SILVA, L. F.; BERNARDINO, C. D. RÉ, F. D.; FURTADO, C. H.; GALLO ***Métodos analiticos para o controle da produção de açúcar e álcool***. Fermentec, Piracicaba, 2003.

32. DE CAMARGO, A. C.;CANNIATTI-BRAZACA, S.G.; MANSI, D.N.; DOMINGUES, M. A. C.; ARTHUR, V. Gamma radiation effects at color, antioxidant capacity and fatty acid profile in peanut (Arachis hypogaea L.) | Efeitos da radiação gama na cor, capacidade antioxidante e perfil de ácidos graxos em amendoim (Arachis hypogaea L.). ***Ciencia e Tecnologia de Alimentos***, v. 31, n. 1, p. 11-15, 2011.

33. DICKSON, J. S. ***Radiation inactivation of microorganisms****.* 2001.

34. DIEZMANN, S.; DIETRICH, F. S. Saccharomyces cerevisiae: Population divergence and resistance to oxidative stress in clinical, domesticated and wild

isolates. ***PLoS ONE***, v. 4, n. 4, 2009.

35. EGGLESTON, G. BASSO, L. C.; DE AMORIM, H. V.; DE PAULILLO, S. C. L.; BASSO, T. O. Mannitol as a sensitive indicator of sugarcane deterioration and bacterial contamination in fuel alcohol production. ***Zuckerindustrie***, v. 132, n. 1, p. 33–39, 2007.

36. EGGLESTON, G.; AMORIM, H. Reasons for the chemical destruction of sugars during the processing of sugarcane for raw sugar and fuel alcohol production. ***International Sugar Journal***, p. 271-282, 2006.

37. EGGLESTON, G.; LEGENDRE, B.; TEW, T. Indicators of freeze-damaged sugarcane varieties which can predict processing problems. ***Food Chemistry***, v. 87, n. 1, p. 119-133, 1 ago. 2004.

38. EUCHI, S. Y.; YOKOYA, F.; CANHOS, V. P.; GALLO, C. R. ***Pontos críticos microbiológicos em usinas de açúcar e álcool***. Campinas: Fundação Tropical de pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, p. 78, 1989.

39. FELLOWS, P. J. ***Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípios e Prática***. 4rd, Artmed Editora, 2018.

40. FERRARI, F. C. DOS S. ***Fatores operacionais e cinética do processo fermentativo para otimização da produção de etanol em escala industrial***. 2013, 74 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV/UNESP, Jaboticabal. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/> Acesso em: 15 maio 2019.

41. FGV. ***Bio Combustíveis***. 2019

42. FREDERICK, M. K. B. ***Estudo genetico, fisiologico e molecular de Lactobacillus fermentum envolvidos na floculação de leveduras***. 1994, 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, FEA/UNICAMP, Campinas. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/ > Acesso em: 15 maio 2019.

43. HERZBERG, P. A. ***How SAS works: a comprehensive introduction to the SAS system***. Springer-Verlag, 1990.

44. IIZUKA, H.; SHIBABE, S.; ITO, H. Effect of Gamma Irradiation on Fermentation Medium Consisting Mainly of Cane Molasses. ***Food Irradiation***, japão, v. 3, n. 1, p. 116-122, 1968.

45. INAI, T. et al. Rim15p-mediated regulation of sucrose utilization during molasses fermentation using Saccharomyces cerevisiae strain PE-2. ***Journal of Bioscience and Bioengineering***, v. 116, n. 5, p. 591-594, 2013.

46. JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. S. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. ***Food Chemistry***, v. 101, n. 1, p. 410-418, 2006.

47. JONES, R. P.; GADD, G. M. Ionic nutrition of yeast—physiological mechanisms involved and implications for biotechnology. **Enzyme and *Microbial Technology***, v. 12, n. 6, p. 402–418, 1 jun. 1990.

48. JOSEPHSON, E. S.; PETERSON, M. S. ***Preservation of Food by Ionizing Radiation***, v. 1**,** CRC Press, Inc, 1983a.

49. JOSEPHSON, E. S.; PETERSON, M. S. ***Preservation of Food by Ionizing Radiation***, v. 2, CRC Press, Inc, 1983b.

50. JULKUNEN-TIITTO, R. Phenolic Constituents in the Leaves of Northern Willows: Methods for the Analysis of Certain Phenolics. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 33, n. 2, p. 213-217, 1985.

51. JUNG, K. W.; LIM, S.; BAHN, Y. S. Microbial radiation-resistance mechanisms. ***Journal of Microbiology***, v. 55, n. 7, p. 499-507, 2017.

52. KHAN, A. R.; HOQ, M. M. Lactic acid bacteria as contaminants in alcohol fermentation. ***Bangladesh Journal of Microbiology***, v. 7, n. 2, p. 119-121, 1990.

53. LIMA, R. B. **Processo de clarificação de caldo de cana-de-açúcar aplicando elétrons acelerados**. 2012. 108 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: <http://www.teses.usp.br> Acesso em: 15 maio 2019.

54. LIMBO, S.; KHANEGHAH, A. M. ***Electron Beam Pasteurization and Complementary Food Processing Technologies***. p. 195-217, 2015.

55. LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. DE L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; DE AMORIM NETO, H. B.; DE AMORIM, H. V. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. ***Brazilian Journal of Microbiology***, v. 47, p. 64-76, 2016.

56. LUCIA, N.; MASTRO, D.; VIEIRA, F. F.; MASTRO, N. L. D. Comparison of γ - radiation and electron beam irradiation effects on gelatin effects on gelatin. ***Radiation physics and chemistry***, v. 63, n. November, p. 61-63, 2015.

57. LUNG, H.-M.; CHENG, Y.-C.; CHANG, Y.-H.; HUANG, H.-W.; YANG, B. B.; WANG, C.-Y. Microbial decontamination of food by electron beam irradiation. ***Trends in Food Science & Technology***, v. 44, n. 1, p. 66-78, jul. 2015.

58. MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. ***The Systematic Identification of Flavonoids***. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1970.

59. MELO, H. F. DE. ***Resposta ao estresse ácido em leveduras da***

fermentação alcoólica industrial. 2006. 118 p. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/> Acesso em: 15 maio 2019.

60. NASIR, N. M.; MING, T. T.; AHMADUN, F.-R.; SOBRI, S. Decomposition and biodegradability enhancement of textile wastewater using a combination of electron beam irradiation and activated sludge process. ***Water Science and Technology***, v. 62, n. 1, p. 42-47, 2010.

61. MOLINS, R. A. ***Food Irradiation: Principles and Applications***. p. 488, 2001.

62. NAWAR, W. W. Volatiles from food irradiation. ***Food Reviews International****,* v. 2, n. 1, p. 45-78, 1986.

63. NOBRE, T. DE P.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Viabilidade celular de Saccharomyces cerevisiae cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. ***Ciência e Tecnologia de Alimentos***, v. 27, n. 1, p. 20-25, 2007.

64. NOLASCO JUNIOR, J. ***Desenvolvimento de processo termico otimizado para mosto de caldo de cana na fermentação alcoolica****.* 2005, 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, FEA/UNICAMP, Campinas. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/ > Acesso em: 15 maio 2019.

65. NOVELLO, A. P. ***Seleção de leveduras para fermentação com alta pressão osmótica usando processo de fermentação extrativa***. 2015. p. 117. Tese (Doutorado em Agronomia) Escola Superior de Agricultura Luiz da Queiroz - ESALQ/USP, Piracicaba. Disponível em: <http://www.teses.usp.br> Acesso em: 15 maio 2019.

66. OH, S. H.; LEE, Y. S.; KIM, J. H.; KIM, J. H.; LEE, J. W.; MEE, R. K.; YOOK, H. S.; BYUN, M. W. Effect of pH on non-enzymatic browning reaction during γ-irradiation processing using sugar and sugar-glycine solutions. ***Food Chemistry***, v. 94, n. 3, p. 420-427, 1 fev. 2006.

67. OLIVA-NETO, P.; YOKAYA, F. Effects of nutritional factors on growth of Lactobacillus fermentum mixed with Saccharomyces cerevisiae in alcoholic fermentation. ***Revista de Microbiologia****,* v. 25, n. 1, p. 25-31, 1997.

68. OLIVEIRA, A. J.; GALLO, C. R.; ALCARDE, V. E.; GODOY, A.; AMORIM, H. V. ***Metodos para o controle microbiologico na producao de alcool e acucar***. 1rd Piracicaba, 1996.

69. OLIVEIRA, K. S. DE; PEREIRA, V. L. M.; FONSECA, A. M. A. DA; FROES, J. A. V.; FREITAS, M. R. L. DA S. DE; FIGUEIREDO, N. F. DE; ALVAREZ-LEITE, M. E. Avaliação da eficácia do método de esterilização pelo calor seco e calor úmido em sugadores endodônticos reutilizáveis. ***Arquivo Brasileiro de Odontologia***, v. 4, n. 1, p. 11-18, 2008.

70. OSHA ANALYTICAL LABORATORY. ***Organic Methods Evaluation Branch***. Salt Lake City, Utah, United States, 1988. Disponível em: <https://www.osha.gov/dts/sltc/methods/organic/org072/org072.html>. Acesso em: 28 mar. 2019

71. CALVO, WILSON P.; DUARTE, C.; MACHADO, L. D. B.; PINO, E. S.; POLI, D. C. R.; MANZOLI, J. E.; TOBIAS, C. C. B.; MATHOR, M. B.; SOMESSARI, E. S. R.; SILVEIRA, C. G.; SOMESSARI, S.; OMI, N.; RELA, P. P. Needs and Emerging Opportunities of Electron Beam Accelerators on Radiation Processing Technology for Industrial and Environmental Applications in South. ***Radiation Physics and Chemistry***, v. 81, n. 8, p. 1276-1281, 2012.

72. PEREIRA, F. B.; GOMES, D. G.; GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentations using the industrial Saccharomyces cerevisiae strain PE-2. ***Biotechnology Letters***, v. 34, n. 1, p. 45-53, 6 jan. 2012.

73. PHILLIPS, G. O. Radiation chemistry of carbohydrates. ***Advances in Carbohydrate Chemistry*****,** v. 12, p. 13-58, 1962.

74. PHILLIPS, G. O. Effects of ionizing radiation on carbohydrate systems. ***Radiation Research Reviews***, v. 3, n. 335-351, 1972.

75. PIERCE, J. S. Institute of brewing: analysis committee measurement of yeast viability. ***Journal of the Institute of Brewing***, v. 76, n. 5, p. 442-443, 1970.

76. PINTO, S. M.; MOREIRA, I. DOS S. Formas de uso da radiação para conservação dos alimentos: uma abordagem bibliográfica. ***Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management***, v. 14, n. 2, p. 62-72, 2018.

77. PODADERA, P. **Estudo das propriedades do açúcar líquido invertido processado com radiação gama e feixe de elétrons**. 2007. 108 p. (Doutorado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: <http://www.teses.usp.br > Acesso em: 15 abr. 2019

78. POLLAND, E. C. ***Phenemology of radiation effects on micro-organisms, in Encyclopedia of Medical Radiology***. ed. Springer, New York, 1966.

79. PONCE, G. H. S. F.; MOREIRA NETO, J.; JESUS, S. S. DE; MIRANDA, J. C. DE C.; MACIEL FILHO, R.; ANDRADE, R. R. DE; MACIEL, M. R. W. Sugarcane molasses fermentation with in situ gas stripping using low and moderate sugar concentrations for ethanol production: Experimental data and modeling. ***Biochemical Engineering Journal***, v. 110, p. 152-161, 2016.

80. POWER, R. ***The Alcohol Textbook***. 4rd Nottingham, 2003

81. RASMUSSEN, M. L.; KOZIEL, J. A.; JANE, J. L.; POMETTO, A. L.; Reducing bacterial contamination in fuel ethanol fermentations by ozone treatment of

uncooked corn mash. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 63, n. 21, p. 5239-5248, 2015.

82. RELA, P. R. **Desenvolvimento de dispositivo de irradiação para tratamento de efluentes industriais com feixe de elétrons**. 2003. 149 p. (Doutorado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: <http://www.teses.usp.br> Acesso em: 15 abr. 2019

83. SAMUTA, T.; ARAMAKI, I.; HASHIZUME, K. Production of sake from rice material exposed to γ-radiation and technical development for its production Characterization of low-dose exposed rice and small-scale brewing with it. ***Kokuritsu Kikan Genshiryoku Shiken Kenkyu Seika Hokoku-Sho***, n. 36, p. 24/1-24/6, 1997.

84. SCHERZ, H. Formation of deoxycompounds and malondialdehyde in irradiated aqueous solutions of carbohydrates and related compounds. ***Radiation research***, v. 43, n. 1, p. 12–24, jul. 1970.

85. SHURYAK, I. Review of microbial resistance to chronic ionizing radiation exposure under environmental conditions. ***Journal of Environmental Radioactivity***, v. 196, p. 50-63, 2019.

86. SKOWRON, K. J. et al. Radiation hygienization of cattle and swine slurry with high energy electron beam. ***Radiation Physics and Chemistry***, v. 87, p. 88-96, 2013.

87. STUPIELLO, J. P.; HORII, J. Considerações sobre tratamentos de caldo de cana para fermentação alcoólica. ***Álcool e Açúcar***, v. 3, n. 1, p. 40-16, 1981.

88. TONOLI, F. C. **Adaptação de leveduras para fermentação com alto teor alcoólico**. 2017. p. 78. Dissetação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Escola Superior de Agricultura Luiz da Queiroz - ESALQ/USP, Piracicaba. Disponível em: <http://www.teses.usp.br> Acesso em: 15 maio 2019.

89. UNICA. ***Balanço de atividades 2012/2013 a 2018/2019***, 2019. Disponível em: <http://www.unica.com.br/download.php?idSecao=17&id=24653688>

90. VARAKUMAR, S.; REDDY, O. V. S.; NARESH, K.; SHARMA, A.; VARIYAR, P. S. Enhancing antioxidant activity, microbial and sensory quality of mango (Mangifera indica L.) juice by γ-irradiation and its in vitro radioprotective potential. ***Journal of Food Science and Technology***, v. 52, n. 7, p. 4054–4065, 2014.

91. VASCONCELOS, M. A. DA S.; MELO FILHO, A. B. DE. ***Técnico em Alimentos Conservação de Alimentos***. 2010.

92. VIDOTTI, M.; CERRI, C. D.; CARVALHAL, R. F.; DIAS, J. C.; MENDES, R. K.; TORRESI, S. I. C. DE; KUBOTA, L. T. Nickel hydroxide electrodes as amperometric detectors for carbohydrates in flow injection analysis and liquid

chromatography. ***Journal of Electroanalytical Chemistry***, v. 636, n. 1–2, p. 18–23, nov. 2009.

93. VILLAVICENCIO, A. L. C. H. ***Avaliação dos efeitos da radiação ionizante de 60Co em propriedades físicas, químicas e nutricionais dos feijões Phaseolus vulgaris L. e Vigna ungiculata (L.) Walp***. 1998. Tese (Doutorado em Farmacia) Faculdade de Ciências Farmacêuticas FCF/USP, São Paulo.

94. WAISIKIEWICZ, J. M.; YOSHII, F.; NAGASAWA, N.; WACH, R. A.; MITOMO, H. Degradation of chitosan and sodium alginate by gamma radiation, sonochemical and ultraviolet methods. ***Radiation Physics and Chemistry***, v. 73, n. 5, p. 287–295, 2005.

95. WALTER, A; GALDOS, M. V.; SCARPARE, F. V.; VERDE LEAL, M. R. L.; SEABRA, J. E. A.; CUNHA, M. P. DA; PICOLI, M. C. A.; OLIVEIRA, C. O. F. de. Brazilian Sugarcane Ethanol: Developments so far and Challenges for the Future, ***Advances in Bioenergy***. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. p. 373-394.

96. WOLFF, S. P.; DEAN, R. J.; URBAIN, W. M. Food irradiation. ***Biochemical Journal***, v. 234, p. 399, 1986.

97. YOKOYA, F. Problemas com contaminantes na fermentação alcoólica. ***STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos***, v. 9, n. 6, p. 38–39, 1991.

98. ZAGO, C.; RELA, P. R. Technical feasibility for electron beam application on maize seeds disinfection for maize cultivation in Brazil. INAC (International nuclear atlantic conference Nuclear energy and energetic). ***Proceedings...*** Brazil: 2007, Disponível em: <http://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:38111753>

99. ZELLER, A. L. V; OLIVEIRA, A. J.; ZAGO, E. A. Conservação de xarope de cana-de-açúcar pelo emprego da radiação gama. ***STAB-Açúcar, Álcool e Subprodutos***, v. 2, p. 29–36, 1984.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
http://www.ipen.br

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.