

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GESTÃO DE PRODUÇÃO INDUSTRIAL
SUCROENERGÉTICA – MTA**

**TITULO: UTILIZAÇÃO DE ÁCIDO SULFÚRICO NO TRATAMENTO DAS
LEVEDURAS NA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA**

ALESSANDRA CRISTINA MACIEL CORAÇA

Piracicaba

2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GESTÃO DE PRODUÇÃO INDUSTRIAL
SUCROENERGÉTICA – MTA**

**TÍTULO: UTILIZAÇÃO DE ÁCIDO SULFÚRICO NO TRATAMENTO DAS
LEVEDURAS NA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA**

ALESSANDRA CRISTINA MACIEL CORAÇA

Monografia apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Gestão de Produção Industrial
Sucroenergética – MTA.

Aluna: Alessandra Cristina Maciel Coraça

Orientador: Prof. Dr. Octavio Antonio Valsechi

Piracicaba

2012

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que são minha base em tudo, sempre me apoiando em todos os momentos da minha vida.

À minha irmã, que sempre esteve presente em minhas conquistas, pelo apoio e ajuda na revisão da monografia.

Ao supervisor do Laboratório Adriano Jacomini, que cedeu o espaço e seus funcionários para me ajudarem com as análises.

Aos líderes do Laboratório, Julio Cesar Montezano e Thiago Rodrigo Mortari Gomes, pela paciência e ajuda, mostrando a disponibilidade de sempre.

Aos funcionários do Laboratório da Unidade de Guariba, Cirlandy Vieira Barbosa, Aline Rafaela Calza, Tatiane de Cassia Soares, Elaine de Cassia Firmino, Andressa Miranda Machado pela imensa ajuda na parte experimental, demonstrando seriedade e disposição, mesmo com a correria do dia-a-dia e o aumento de análises extras.

À minha querida amiga Vanessa Cristina da Silva, pela amizade e alegria de sempre, por toda atenção e ajuda durante todas as etapas na parte experimental, além dos socorros na finalização da monografia.

À Ana Carolina Saad Freitas, pelo apoio e incentivo, durante a parte experimental, mesmo fora do horário de trabalho.

Ao Professor Vico, pela amizade adquirida, pelo incentivo e conhecimento adquirido.

À nossa querida monitora, Vanda Renata Reis, que sempre nos ajudou e nos agüentou nesses dois anos de curso.

Aos colegas da pós, pela oportunidade de interação e participação em mais uma etapa da minha vida profissional.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	11
3. REVISAO DA LITERATURA	12
3.1. Bioetanol no Mundo	12
3.2. Processo de Produção (Fermentação Etanólica)	14
3.2.1. Processo em Batelada Alimentada.....	18
3.2.2. Processo Contínuo.....	19
3.3. Agente da Fermentação Etanólica (Leveduras)	20
3.4. Agentes Inibidores da Fermentação	22
3.4.1. Temperatura.....	22
3.4.2. pH.....	23
3.4.3. Etanol.....	23
3.4.4. Sulfito.....	23
3.4.5. Cálcio.....	24
3.4.6. Ácidos.....	24
3.5. Agentes Contaminantes da Fermentação	25
3.5.1. Leveduras Naturais.....	25
3.5.2. Bactérias.....	26
3.6. Tipos de Contaminantes do Fermento	29
3.6.1. Tratamento com Ácido Sulfúrico.....	29
3.6.2. Tratamento com Antibióticos Sintéticos.....	30
3.6.3. Tratamento com Antibióticos Naturais.....	30
4. MATERIAL E MÉTODO	32
4.1. Material Utilizado	32
4.1.1. Creme de levedura após centrifugação.....	32
4.1.2. Água Tratada para diluição do fermento.....	32
4.1.3. Ácido Sulfúrico.....	32
4.1.4. Mosto do Processo.....	32
4.1.5. Vidrarias.....	32
4.1.6. Equipamentos.....	32
4.2. Método Utilizado	33
4.2.1. Preparo do Fermento.....	33
4.2.2. Preparo da Fermentação de bancada.....	33
4.2.3. Análises Realizadas.....	33
4.2.4. Determinação da Eficiência da Fermentação.....	34
4.2.5. Determinação do ART entrado no Mosto de alimentação.....	34
4.2.6. Determinação do Álcool produzido na fermentação.....	34
4.2.7. Cálculo da Eficiência da Fermentação.....	34
5. RESULTADOS	35
6. CONSIDERAÇÕES	37
7. CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Produtividade da Produção de Etanol.....	12
Gráfico 2 – Projeção de Produção, Consumo e Exportação do Etanol Brasileiro.....	14
Gráfico 3 – Rendimento Fermentativo.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Balanço de Energia na Produção de Etanol.....	13
Tabela 2 - Massa Inicial dos Frascos Vazios, contendo Mosto e Fermento separadamente, calculando em seguida a massa real utilizada em cada frasco.....	35
Tabela 3 - Resultados das análises de pH, ART, Brix e Acidez realizadas no Mosto e pH, Acidez, Etanol e Glicerol nos Fermentos 1 e 2.....	35
Tabela 4 - Pesagem dos frascos de hora em hora, verificando a redução da massa em cada período, até final da fermentação.....	36
Tabela 5 - Massa Final de Vinho, após final da fermentação e análises de pH, Acidez, Etanol (INPM), Glicerol e ARRT realizadas no Vinho fermentado em cada frasco.....	36
Tabela 6 - Cálculo do Rendimento Fermentativo de cada frasco.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sequência de reações enzimáticas pela fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose e maltose), conduzida por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
Figura 2 – Morfologia das células de leveduras (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	20
Figura 3 – A Diversidade das bactérias.....	27
Figura 4 – Representação esquemática da organização estrutural de uma célula bacteriana.....	27
Figura 5 – Fotomicrografia ilustrando a floculação de leveduras por bactérias.....	28

RESUMO

Cada dia que passa, o mundo se depara com problemas ambientais mais freqüentes e a busca por fontes de energia renováveis para contribuir com a redução na emissão de gases de efeito estufa, aumenta cada vez mais. Nesse cenário, o etanol aparece como uma alternativa eficaz e o Brasil lidera essa evolução. A fermentação etanólica é o processo responsável pela produção deste biocombustível e muitos são os fatores que influenciam diretamente no rendimento industrial, entre eles pH, temperatura, contaminação bacteriana e/ou por leveduras naturais, entre outros. É fundamental que se busque alternativas que melhorem o rendimento e não afetem as leveduras, que são os agentes principais no processo. Nesse trabalho, foi realizado um teste fermentativo de bancada, com dois tipos de tratamento ácido, um utilizando ácido concentrado e o outro com ácido diluído a 10%.

Palavras-chave: *fermentação, levedura, tratamento ácido*

1. INTRODUÇÃO

Dentre todas as matérias-primas mais utilizadas para a fabricação de etanol, a mais sustentável é a cana-de-açúcar. Etanol, também conhecido por álcool etílico, pertence à classe dos alcoóis e é formado por uma cadeia de dois carbonos ligados a uma hidroxila O-H, formando a estrutura $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$.

A preocupação com o aquecimento global tem aberto os olhos do mundo para a busca de alternativas sustentáveis e uma delas é a utilização de combustíveis renováveis. Segundo o relatório do *Intergovernmental Panel On Climate Change* (IPCC *apud* RIBEIRO, 2008), divulgado em 2007, o setor energético é a atividade humana que mais está ligada com o aquecimento global e o efeito estufa, devido ao uso de combustíveis fósseis.

O etanol é conhecido como o biocombustível do futuro, pois ele é um combustível ecologicamente correto, produzido através do processamento e fermentação da cana-de-açúcar. Ele representa grande vantagem competitiva ao Brasil em relação a outros países, com uma matriz energética mais limpa e renovável. Em adição a isso, ele atrai importantes recursos financeiros, gerando empregos e desenvolvendo o país, o qual o torna referência na produção e comercialização de energia sustentável (RAIZEN, 2012).

A fermentação etanólica é conduzida por leveduras do gênero *Saccharomyces*, sendo a linhagem *S. cerevisiae* a que mais tem se adaptado às condições industriais. Porém, os microorganismos do ambiente que se aderem à cana-de-açúcar, contaminam os processos industriais, causando danos e reduzindo o rendimento fermentativo.

Após o final da fermentação, o produto contido nas dornas é o vinho, uma mistura hidroalcoólica, contendo além de álcool e água, outras substâncias como a própria levedura e contaminantes. No Brasil, o fermento é reutilizado em ciclos fermentativos consecutivos. Durante a centrifugação, os microorganismos são reciclados juntamente com a levedura, agravando os problemas associados à contaminação.

A infecção pode causar danos como: consumo de açúcar, formação de goma, entupimento de tubulações, centrífugas, trocadores de calor, além de floculação do fermento, inibindo o crescimento celular, com conseqüente queda na produção de etanol.

Segundo Santos (2008), a produção de ácidos orgânicos pela própria fermentação eleva a acidez do meio, inibindo o desenvolvimento de bactérias, sem prejudicar o desenvolvimento das leveduras.

Devido à grande influência da contaminação nos processos fermentativos, é de grande importância o conhecimento de novas técnicas que permitam a redução da infecção, além das usuais, como tratamento ácido e uso de antibióticos.

2. OBJETIVOS

Esse trabalho tem como objetivo o estudo da influência do uso do ácido sulfúrico no tratamento do fermento, para redução da contaminação e da floculação, utilizando ácido concentrado e diluído, analisando o efeito dos dois tratamentos no rendimento fermentativo. Usualmente utiliza-se ácido concentrado, mas devido a questões de segurança, o uso de ácido diluído seria um ponto a ser discutido.

Foi realizada uma fermentação de bancada, em triplicata, simulando o processo industrial, com o uso de levedura *Saccharomyces cerevisae*, sendo o agente principal da fermentação etanólica, a partir de mosto proveniente de cana-de-açúcar.

Os parâmetros analisados foram: pH, acidez total, ART, ARRT, glicerol, brix e etanol (INPM). Através desses dados, foi calculado o rendimento fermentativo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Bioetanol no Mundo

A produção de bioetanol pode ser realizada utilizando vários tipos de matéria-prima, como beterraba, mandioca e milho, porém, a mais sustentável é a cana-de-açúcar.

A preocupação com o meio ambiente e o aquecimento global vem aumentando a cada dia, surgindo leis e incentivos para conscientização e redução da emissão de gases tóxicos na atmosfera. O Brasil foi o primeiro país do mundo a criar um programa visando substituir o consumo da gasolina por um combustível alternativo, fazendo com que o setor sucroalcooleiro ganhasse grande importância e representação econômica no país (NOBRE, 2005).

Segundo Andrietta (2011), os benefícios da implantação do Proálcool (Programa Nacional do Álcool, criado nos anos 70, após a primeira crise do petróleo), não se limitam a colocar o Brasil como destaque na produção e consumo de energia limpa, mas sim se tornando excelência no setor sucroalcooleiro (gráfico 1).

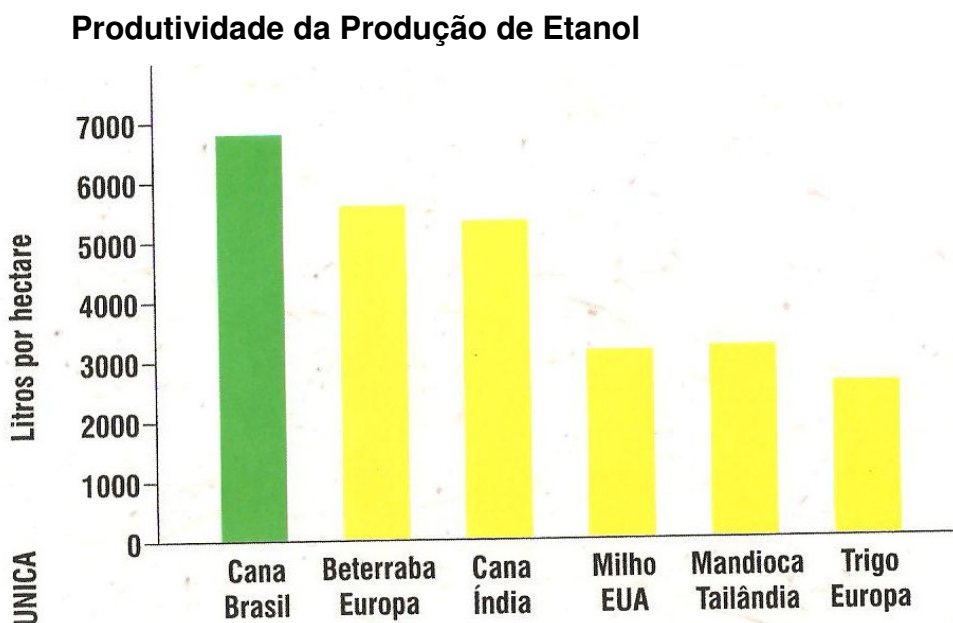


Gráfico 1: Produtividade da produção de etanol. Fonte: ÚNICA (apud CAROLO,2012)

Com a preocupação mundial quanto às mudanças climáticas, combinados com a dependência energética de combustíveis fósseis, a volatilidade dos preços mais elevados e incertezas no aumento da oferta de petróleo, têm aumentado o interesse na busca por fontes de energia renováveis, principalmente

na forma de biocombustíveis (ICONE apud UNICA, 2012). De acordo com MAPA (2005), o etanol (derivado de produtos intensivos de carboidratos ou amiláceos), o biodiesel (derivado de lipídeos) e o carvão vegetal (derivado de madeira) são as três grandes armas de biomassa que dominarão o mercado da agricultura de energia nos próximos anos.

De acordo com Carolo (2012), o balanço energético do etanol de cana, que é a proporção entre a energia fóssil usada para sua produção, é positivo, sendo nove unidades de energia renovável para cada unidade de energia fóssil utilizada na produção de etanol de cana, conforme tabela abaixo.

Tabela 1: Balanço de Energia na Produção de Etanol

Matérias-primas	Energia renovável / Energia fóssil usada
Etanol de milho (USA)	1,3
Etanol de cana (Brasil)	8,9
Etanol de beterraba (Alemanha)	2,0
Etanol de sorgo sacarino (África)	4,0
Etanol de trigo (Europa)	2,0
Etanol de mandioca	1,0

Fonte: Carolo, 2012

São inúmeras as vantagens no uso do etanol como combustível no país, como por exemplo: menor dependência na importação de combustíveis fósseis e da variação do preço; redução na emissão de poluentes (os mesmos são reabsorvidos no ciclo de crescimento da matéria-prima utilizada); geração de empregos no campo, diminuindo o êxodo rural; os subprodutos são utilizados no próprio processo produtivo, como fonte de energia através da queima do bagaço e fertilizantes da terra para o plantio (auto-suficiência energética); e geração de divisas internacionais, frente às crises enfrentadas pelo petróleo e consciência ambiental. (RODRIGUES, 2005)

Com as novas oportunidades de crescimento do setor, o Mapa (2005), realizou projeções com base no consumo interno e externo, principalmente Japão, União Européia e Estados Unidos, que mostram um aumento na produção de etanol brasileiro, alcançando os patamares de 38,6 bilhões de litros no ano de 2017, sendo um consumo interno de aproximadamente 28,4 bilhões de litros. Essa evolução pode ser observada no gráfico abaixo.

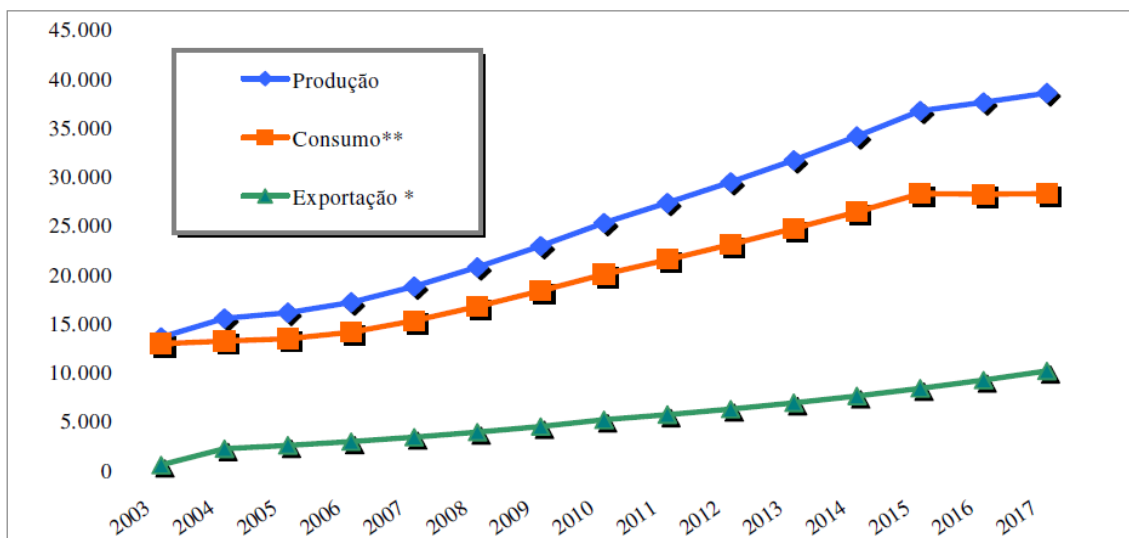


Gráfico 2: Projeção de Produção, Consumo e Exportação do Etanol Brasileiro. Fonte: MAPA apud Rodrigues (2007)

A indústria de aviação também começou a se preocupar em avaliar dois aspectos centrais relacionados aos combustíveis utilizados em aviões: o potencial de redução na emissão de gases de efeito estufa e a capacidade da conformidade da cadeia de fornecimento com as normas de sustentabilidade. Com o crescimento do setor, o uso de biocombustíveis tem sido visto como um caminho para reduzir os impactos no clima. (ICONE apud UNICA, 2012)

Com a necessidade de novas alternativas energéticas sustentáveis, é importante o conhecimento do processo de produção deste biocombustível que está interessando grandes potências, além da busca por melhorias na eficiência do seu processo. Segundo Abarca (2005), especialistas alertam que os principais fatores na competitividade do mercado mundial são os ganhos na eficiência da produção do etanol. Em Basso (2004), foram diagnosticados vários fatores que limitam a produtividade de etanol, diminuindo a eficiência fermentativa, como contaminação bacteriana, grande formação de espuma, açúcares residuais elevados, floculação, queda da viabilidade e crescimento excessivo ou reduzido da levedura, formação de glicerol em excesso, entre outros.

3.2. Processo de Produção (Fermentação etanólica)

Segundo Lima (2001), afirmam existir três diferentes meios de obtenção de etanol: por via destilatória, sintética ou fermentativa, sendo esta última a mais difundida e utilizada no Brasil.

Nos dias de hoje, entende-se por fermentação o processo metabólico anaeróbico de produção de energia no qual os microorganismos, nesse caso as leveduras, oxidam parcialmente o substrato, atuando sobre um ou mais componentes, gerando produtos modificados e obtendo características desejáveis. (SANTOS, 2008)

O primeiro a realizar um estudo quantitativo da fermentação alcoólica foi Lavoisier, em 1789; mas foi Pasteur, a partir de 1857, quem explicou como a fermentação ocorria, denominando as leveduras como agentes responsáveis. Ele mostra que 100 partes de sacarose proporcionam 105,4 partes de açúcar invertido, produzindo 51,1 partes de etanol, 49,4 partes de gás carbônico, 3,2 partes de glicerol, 0,7 parte de ácido succínico e uma parte de outras substâncias. Porém, mais tarde, em 1897, Büchner descobriu que extratos livres de células de levedura eram capazes de realizar a fermentação alcoólica. (MENEZES, 1980)

Tosetto (2008) explica que, a levedura tem capacidade de utilizar duas vias distintas de transformação de açúcar durante a fermentação devido à sua característica facultativa. Uma delas é a Glicólise, onde a sacarose é degradada até ácido pirúvico, por uma sequência ordenada de reações catalisadas por enzimas específicas. Na ausência de oxigênio, há uma tendência para atuação das enzimas piruvato-descarboxilase e álcool-desidrogenase, produzindo etanol e água a partir do ácido pirúvico (figura 1).

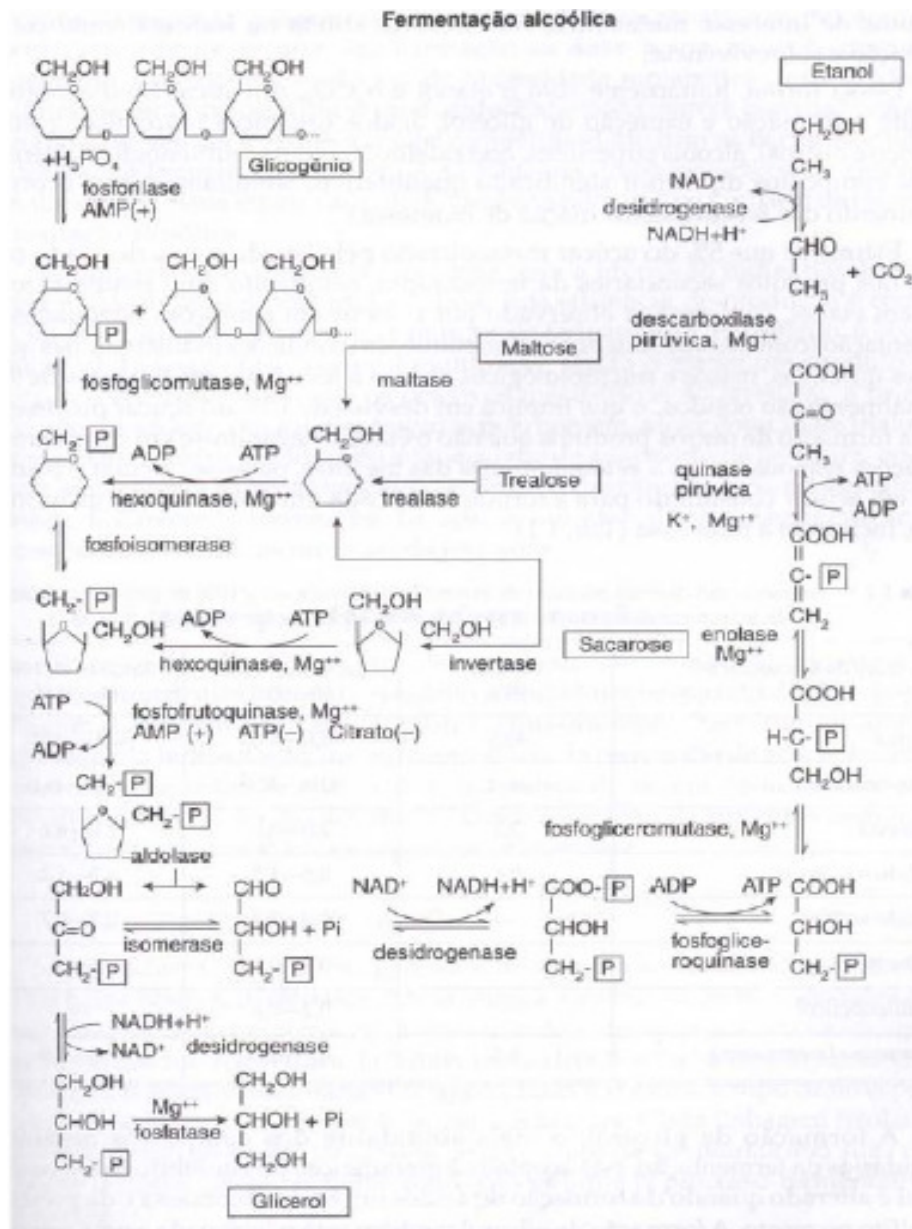


Figura 1: Sequência de reações enzimáticas pela fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose e maltose), conduzida por *Saccharomyces cerevisiae* (LIMA et al., 2001)

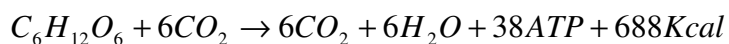
Em aerobiose, a levedura tem a capacidade de transformar parte do açúcar em dióxido de carbono, biomassa e água. Esta reação ocorre devido ao deslocamento reacional de parte do ácido pirúvico para o Ciclo de Krebs, onde será oxidado por meio de enzimas. (TOSETTO, 2008)

As reações ocorridas nos dois ciclos podem ser resumidas pelas equações abaixo:

Equação de Gay-Lussac:



Ciclo de Krebs:



Na sequência de reações enzimáticas aparecem rotas metabólicas alternativas para a formação de outras substâncias necessárias para o desenvolvimento de produtos secundários, relacionados direta ou indiretamente com a adaptação e sobrevivência das leveduras (RIBEIRO, 2008). Assim, a equação de Gay-Lussac, mediante as condições industriais anaeróbicas, pode ser reescrita da seguinte forma:



As destilarias no Brasil utilizam o processo de fermentação com reciclo de leveduras, realizando uma centrifugação do vinho, separando o fermento (leite de levedura), que passará por um tratamento de lavagem com água e adição de ácido sulfúrico, com agitação, variando de uma a três horas, atingindo um pH próximo a 2,5, para evitar contaminação bacteriana, retornando em seguida para a dorna de fermentação. (COPERSUCAR apud ZAR, 2010)

A operação com recuperação de células permite operar com grandes concentrações de massas celulares, fazendo com que a fermentação seja rápida e permitindo a competição entre bactérias contaminantes e leveduras, sendo favorável para as células de leveduras. Velocidade de conversão elevada de açúcares em etanol, embora desejável, causa alguns problemas, como grande quantidade de calor gerado por unidade de tempo. Esse calor deve ser removido, se não ele pode elevar a temperatura a níveis que são fisiologicamente nocivos à levedura. (ANDRIETTA et al., 2011)

Os processos industriais em grande escala se identificam por processos em Batelada e Contínuos, sendo que, na prática, a Batelada se refere à Batelada Alimentada. (SCHIMIDELL; FACCIOTTI, 2001)

Na indústria, os biorreatores são conhecidos como dornas, que são reatores de aço do tipo tanque com recirculação, normalmente fechadas e mantidas em operação entre 33 e 35°C, com concentração de etanol de 7 a 12º GL. Quando utilizado dornas fechadas, é necessária a presença de lavagem do gás de saída para recuperação do etanol evaporado, que correspondem em até 1,5% de todo etanol gerado. (DUARTE et al., 2006)

3.2.1. Processo em Batelada Alimentada

No processo de batelada alimentada, o fermento é transferido das cubas de tratamento para as dornas de fermentação, através de bombeamento. Depois de concluída a transferência, inicia-se a alimentação com substrato até atingir o volume útil da dorna. Após todo açúcar ser consumido e convertido em álcool e outros produtos, o vinho é enviado às centrífugas, para separação das células de levedura, retornando o creme para as cubas de tratamento, onde serão diluídas e acidificadas para recomeçar um novo ciclo. (ANDRIETTA et al., 2011)

Esses processos são eficientes e versáteis na maior parte dos processos fermentativos, inclusive nas fermentações alcoólicas. Nesses casos, principalmente os com altas densidades celulares, a produtividade é alta devido ao grande número de células vivas no meio fermentativo. Esse processo permite o controle da concentração de açúcares no meio, minimizando os efeitos de inibição pelo substrato e proporcionando sua adição em momentos necessários durante a fermentação. (McNeil; HARVEY, 1990)

De acordo com CARVALHO e SATO (2001), os processos de alimentação batelada, também conhecidos como “Melle-Boinot”, permitem uma vazão de alimentação constante ou variável com o tempo e a adição de mosto de forma contínua ou intermitente. Com essa flexibilidade de alimentação, é possível controlar a concentração de substrato no fermentador, deslocando para uma via metabólica distinta. Outra possibilidade é aumentar a concentração de açúcar no meio, obtendo-se um aumento na produção de etanol, com diminuição do volume de dorna utilizada e menor produção de vinhaça (IMPE VAN et al., 1994; QUEINNEC e DAHHOU, 1994).

Por outro lado, o aumento na velocidade de fermentação leva a uma maior produção de dióxido de carbono, aumentando a formação de espuma e, conseqüentemente, aumento no consumo de anti-espumante e na geração de calor, o qual deve ser removido utilizando trocadores de calor com maior área térmica. Isto faz com que o tempo de alimentação das dornas fique em torno de 75% do tempo de fermentação total, permitindo uma melhor distribuição do calor produzido durante a fermentação (ANDRIETTA et al., 2011).

No Brasil, cerca de 70% das destilarias instaladas operam no sistema do tipo batelada alimentada, ocorrendo lentamente migração para as fermentações contínuas (ANDRIETTA et al., 2006a). Na fermentação batelada alimentada, a

limpeza da dorna é mais fácil, pois esta é completamente esvaziada no final de cada ciclo, o que garante que a limpeza do equipamento seja mais eficiente (ANDRIETTA et al., 2011).

3.2.2. Processo Contínuo

Evoluindo ao processo de batelada alimentada, temos a fermentação contínua, a qual normalmente é concebida com quatro ou cinco dornas ligadas em série, em que um meio de cultura e as células tratadas são adicionados simultaneamente, mas de maneira controlada no primeiro fermentador do sistema. Essa configuração é utilizada para diminuir o efeito de inibição pelo produto (etanol) na velocidade de conversão dos açúcares em etanol pela quantidade de ART (Açúcares Redutores Totais) alimentado na primeira dorna, sendo diretamente proporcional à quantidade de células, mantendo uma taxa de 3,5 g de ART / g de células (peso seco). Este controle é importante para manter a taxa de conversão de cada dorna, obtendo um tempo total de fermentação de 7 a 8 horas, dependendo da linhagem e da matéria-prima utilizadas (ANDRIETTA et al., 2011).

O processo contínuo pode ser mais vantajoso que o de batelada alimentada, pois inclui otimização das condições de processo para uma maior produtividade, longo período de produção contínua, maior produtividade volumétrica e uniformidade do produto, redução dos custos laboratoriais quando atingido o estado desejado, redução do tempo de limpeza e assepsia das dornas e maior facilidade de controle automático. A maior desvantagem desse processo é que, como são expostas por longos períodos, é mais suscetível à contaminação bacteriana (CYSEWSKI; WILKIE, 1978; FACCIOTTI, 2001).

Esse tipo de processo requer maior conhecimento do comportamento dos microorganismos em relação ao meio em que ele atua. Fatores como pH, temperatura, concentração de sacarose e álcool, concentração de biomassa, viabilidade celular, dentre outros, influenciam diretamente na produtividade do sistema, exigindo maior controle do processo. Inúmeras indústrias montaram fermentações contínuas com custos iniciais e de operação mais altos, exigindo sistemas de controle sofisticados, porém operados adequadamente levaram a uma maior eficiência fermentativa. (ATALA et al., 2000)

Apenas 15% da levedura do processo está recebendo tratamento, retornando para a dorna, que nunca é esvaziada. Este fato contribui para o

crescimento da contaminação bacteriana no processo contínuo. No entanto, com o sistema de assepsia de novas linhas, dornas, cubas e trocadores de calor, é possível manter esta contaminação sob controle, não observando diferença significativa nos valores de rendimento fermentativo entre os dois processos, quando operados adequadamente. (ANDRIETTA et al., 2011)

3.3. Agente da Fermentação Etanólica (Leveduras)

Segundo Ceccato-Antonini (2004), leveduras são microorganismos com crescimento dominante na forma unicelular. O mecanismo de reprodução é assexuado, por brotamento multilateral e polar ou por fissão, e sexuado por meio de ascósporos. Morfologicamente, as características determinadas por microscopia identificam formas esférica e ovóide, pêra, cilíndrica e até mesmo alongadas em pseudomicélio. (figura 2). Esses microorganismos variam consideravelmente quanto ao tamanho, variando desde 1 a 5 μ de largura e 5 a 30 μ de comprimento. Elas não possuem flagelos ou outros órgãos de locomoção.

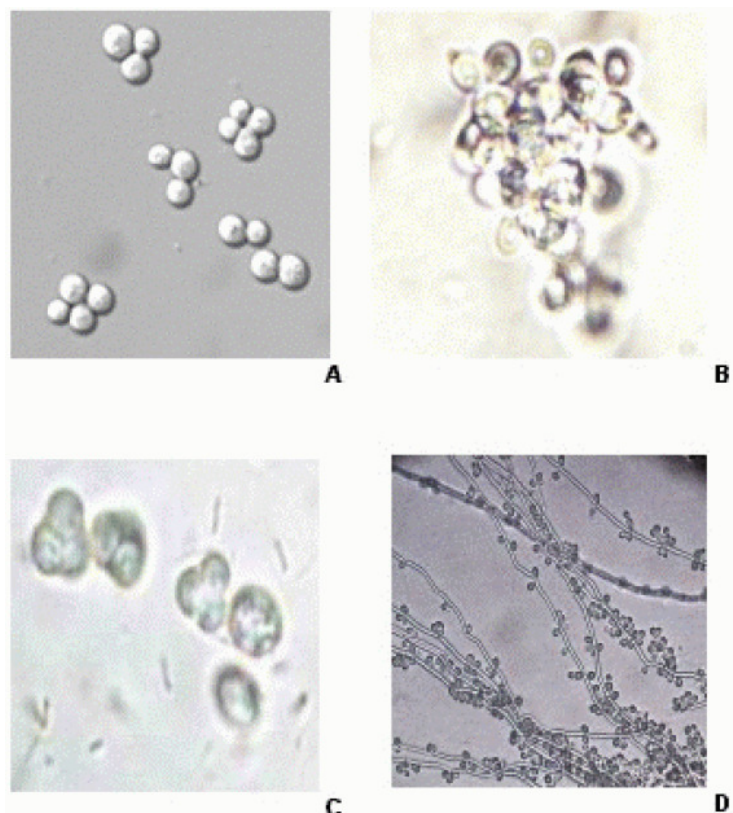


Figura 2: Morfologia das células de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*). **A**, células brotantes; **B**, células dispostas em cachos; **C**, asco e ascósporos (esporos) característicos; **D**, pseudomicélio. Todas as fotos foram tiradas ao microscópio em aumento de 400X (As fotos C e D forma fornecidas por C. D. Tosta) – CECATTO-ANTONINI, 2004

Não importa a época e nem o método de fermentação utilizado, a levedura pertencente ao gênero *Saccharomyces* será sempre responsável pela condução do processo fermentativo, realizando a transformação do açúcar presente no caldo de cana-de-açúcar ou no melaço. Os fatores que possibilitam esse fungo ser o mais indicado para esse fim é o fato de reunir todas as características desejáveis no uso industrial, como capacidade de transformar rapidamente açúcares em etanol, alta tolerância ao produto formado, osmotolerância, flexibilidade a grandes variações de temperatura e atividades em ambientes ácidos (ANDRIETTA et al., 2006b).

Segundo Lima (2001), a célula de levedura possui enzimas em seu citoplasma celular que realizam a transformação do açúcar (glicose) em etanol e dióxido de carbono, envolvendo doze reações em sequência ordenada, sendo cada uma catalisada por uma enzima específica.

A escolha de linhagens selecionadas dessa levedura é fundamental para o sucesso da fermentação, já que estas são os agentes biológicos responsáveis pela condução do processo. (MENEZES, 1980). Desse modo, para se ter uma fermentação eficiente, elas devem apresentar alguns requisitos essenciais, como:

- velocidade de fermentação: alta relação entre consumo de açúcar e formação de etanol, por unidade de tempo e massa de levedura;
- resistência ao produto formado: tolerância a grandes concentrações de álcool, permitindo fermentar com concentrações elevadas de açúcar no mosto, produzindo vinhos com maior teor alcoólico, minimizando os custos com a destilação;
- eficiência de conversão: capacidade de converter açúcar em álcool;
- resistência ao pH e antissépticos: um dos recursos utilizados para diminuir a contaminação de mosto e vinho é o tratamento com ácido e/ou antissépticos; e
- estabilidade genética: as características mencionadas anteriormente devem se manter nas gerações subseqüentes, não alterando as propriedades fermentativas desejáveis (LIMA et al., 2001).

Durante o processo de fermentação alcoólica, as células de leveduras possuem necessidades de vários nutrientes, e estes influenciam diretamente na multiplicação e crescimento celular, além da eficiência na transformação de açúcar

em álcool (AMORIM, 2005). Entre eles estão nitrogênio, fósforo, magnésio, zinco, manganês, ferro entre outros.

Segundo Basso (2004), é de grande importância verificar as condições fisiológicas impostas pelo processo industrial sobre os microorganismos presentes no ambiente da fermentação, identificando agentes físicos, químicos e microbiológicos que estejam causando efeitos estressantes ou estimulantes a esses microorganismos, tanto nas leveduras como nas bactérias.

3.4. Agentes Inibidores da Fermentação

São inúmeros fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração da levedura, contaminação bacteriana) que interferem diretamente no rendimento fermentativo e na eficiência de conversão do açúcar em etanol (LIMA et al., 2001).

3.4.1. Temperatura

Um dos fatores com maior influência no crescimento e no metabolismo das leveduras é a temperatura. A temperatura ótima de crescimento e sua termotolerância variam de acordo com cada espécie, podendo ser até maior que 40°C para algumas (ESTRUCH, 2000).

De acordo com Lima et. al (2001), a temperatura de trabalho recomendada está entre 26 e 35°C. Temperaturas abaixo desse limite retardam a fermentação e superiores ocasionam evaporação do etanol, favorecendo o aparecimento de contaminações. O aumento da temperatura é diretamente proporcional ao aumento da infecção, aumentando a sensibilidade da levedura à toxidez do álcool.

Segundo Torija et al. (2003), em temperaturas mais baixas (15 a 20°C), o rendimento fermentativo é mais alto, porém o tempo para atingir produção máxima é elevado. Em temperaturas mais elevadas (acima de 35°C), há um decréscimo da viabilidade celular.

A maioria dos componentes das células, como proteínas e membrana plasmática, são drasticamente afetadas quando são expostas a altas temperaturas (BENEY; GERVAIS, 2001). Estudos de LEE e CHAPMAN (1987) mostram que os danos à membrana plasmática parecem ser o principal fator de morte celular.

3.4.2. pH

As fermentações que são realizadas em meios mais ácidos atingem rendimentos mais altos em etanol, pois inibem o crescimento do fermento, diminuindo a produção de glicerol e a contaminação bacteriana (LIMA et al., 2001).

Segundo Monaco (2007), a utilização de leveduras *S. cerevisiae* resistentes ao estresse ácido é uma característica muito importante para a indústria sucroalcooleira. Valores muito baixos de pH provocam a perda de nutrientes como nitrogênio e potássio, aumentam a sensibilidade ao etanol, aos ácidos orgânicos e ao sulfito (GOMES, 1988).

A ação prejudicial do sulfito, em pH de 4,5 é minimizada, pois este se apresenta em sua forma menos tóxica (CARTWRIGHT et al., 1989).

3.4.3. Etanol

O acúmulo de etanol na fermentação é um dos problemas encontrados no processo, representando um forte estresse químico às suas células. Sendo assim, a adição de compostos que possibilitem uma maior capacidade de resposta da levedura ao estresse tóxico do etanol tem grande utilidade para a indústria alcooleira (MONACO, 2007).

O álcool produzido na fermentação pode inibir a multiplicação e reduzir a viabilidade celular. O mecanismo de inibição é complexo, entre eles temos a desnaturação e inibição de enzimas, e danos na membrana plasmática alterando sua permeabilidade (D'AMORE; STEWART, 1987).

De acordo com Brosnan et al. (2000), o etanol exerce um efeito estressante na levedura, sendo esse efeito mais relevante quando unido a um choque térmico.

3.4.4. Sulfito

Um dos componentes do melão que pode afetar a fermentação é o sulfito. Ele é normalmente utilizado no processo de clarificação do caldo enviado à fabricação de açúcar, estando presente em grandes concentrações no melão da cana-de-açúcar, interferindo na queda do rendimento fermentativo e da viabilidade celular das leveduras (DORTA, 2006).

Estudos de Basso (1991), identificaram que a presença do sulfito em baixas concentrações (em até 100 ppm), traz mais benefícios do que efeitos tóxicos à levedura, como redução da contaminação bacteriana.

Acima do nível ideal, o enxofre, na forma de sulfito, aumenta a produção de glicerol e inibe o desenvolvimento das leveduras, que com o passar do tempo, se adaptam a essa situação (AMORIM, 2005).

3.4.5. Cálcio

A indústria sucroalcooleira utiliza hidróxido de cálcio para clarificação e purificação do caldo de cana-de-açúcar que será enviado para a produção de açúcar. O mel, subproduto do processo, é enviado para a fermentação, no preparo do mosto, podendo assim apresentar uma grande concentração de íons cálcio em seu meio.

O cálcio, se encontrado em excesso, inibe muitas das funções essenciais das leveduras dependentes do magnésio (WALKER, 1994). A diferença entre esses dois componentes são tão acentuadas, que apesar de estarem no mesmo grupo da tabela periódica, possuem funções antagônicas e competem pelo mesmo sítio de ligações em ATPs ou complexos biológicos (KAIM; SCHWEDERSKI, 1994; GRUBBS; MAGUIRE, 1987).

Com um aumento de magnésio em relação ao cálcio no meio fermentativo, com presença de leveduras do gênero *S. cerevisiae*, Rees e Stewart (1997) observaram um melhor rendimento fermentativo, tanto com aumento na produção de etanol, quanto na viabilidade e massa celular.

3.4.6. Ácidos

Pesquisa realizada com a adição de 1,2 mmol/L de ácido benzóico em três unidades industriais produtoras de etanol a partir de caldo de cana e melaço, observou um aumento na produção de etanol, com redução de glicerol e ácido succínico, mas com elevação na contaminação bacteriana. O aumento da infecção inviabilizou o uso industrial do ácido, já que o aumento no rendimento fermentativo foi inferior ao aumento dos gastos com antibiótico para redução da contaminação (BASSO et al., 1997).

Seguindo esse raciocínio, Basso et al., (1997) também estudaram o efeito de 600 mg/L de ácido succínico sobre 11 espécies de bactérias Gram-

positivas contaminantes e avaliaram a ação inibidora sobre elas. Os autores justificam que a ação inibidora da fermentação foi exercida não apenas pela acidificação do meio, devido ao ácido orgânico liberado, mas pelo ânion succinato e seu efeito sinérgico com o etanol. A rápida utilização dos nutrientes do meio pelas leveduras pode constatar outra ação antibacteriana realizada pelo tratamento. Assim, o próprio vinho exerce ação bactericida, pois são liberados etanol e ácido succínico durante a fermentação.

Diversos autores verificaram a influência dos ácidos acético e láctico na inibição do crescimento celular e queda da viabilidade de *S. cerevisiae*, quando em culturas mistas com bactérias contaminantes. Com contaminações a níveis de 10^6 ou 10^7 células/mL de mosto, podem ocorrer quedas significativas no rendimento fermentativo (ALCARDE et al., 2007).

3.5. Agentes Contaminantes da Fermentação

O problema da contaminação nos processos de fermentação etanólica muitas vezes começa no campo e vão até a etapa de fermentação nas dornas. Os agentes contaminantes podem ser trazidos aderidos às raízes, colmos e folhas da cana, pois provêm do solo e da matéria orgânica em decomposição, como fungos filamentosos, leveduras, bactérias lácticas e esporuladas (AMORIM; OLIVEIRA, 1982). Outro meio pode ser pela água utilizada em alguns processos industriais, como lavagem de cana, diluição do fermento na cuba e na limpeza dos equipamentos (BOVI; MARQUES, 1983).

O caldo de cana, principal substrato da fermentação alcoólica, é visto como um ótimo meio de cultura para os microorganismos contaminantes, devido à sua composição nutricional (RODINI, 1985; GALLO, 1989). O pH correto para inibição da maioria das bactérias está entre 4,0 e 5,0. Nos mostos industriais, os valores normalmente estão entre 4,5 e 5,5 (MENEZES, 1980).

Segue alguns dos principais agentes contaminantes na indústria sucroenergética:

3.5.1. Leveduras Naturais

Segundo Cabrini e Gallo (1999), levedura contaminante é toda aquela que se encontra no processo, mas não foi selecionada para a condução da

produção de etanol, prejudicando o processo fermentativo, causando problemas operacionais e aumento do tempo de fermentação.

Leveduras naturais são indesejáveis no meio fermentativo, podendo ser da mesma espécie ou não, de acordo com as leveduras presentes no processo. São provindas de contaminação e causam queda na eficiência fermentativa, bem como na qualidade do produto final (CTC, 2005). A presença de algumas leveduras naturais floculantes podem ser responsáveis pela floculação do meio fermentativo (figura 5) (YOKOYA, 1989).

Os gêneros de leveduras naturais mais frequentes além da *Saccharomyces* são: *Cândida*, *Hansenula*, *Bretanomyces*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Torula* entre outras. Elas são divididas em leveduras *Saccharomyces* e não *Saccharomyces* (a maior parte) (SUNAO, 1992).

Pela experiência adquirida no setor, as leveduras naturais não são mais consideradas como indesejáveis, pois muitas vezes elas podem apresentar rendimentos iguais ou até mesmo superiores que as leveduras selecionadas para início de safra. Elas são conhecidas como nativas, pois se desenvolveram no próprio sistema. Segundo Cabrini e Gallo (1999), algumas leveduras contaminantes podem apresentar bons rendimentos, podendo ser selecionadas para atuarem como leveduras do processo numa safra posterior.

3.5.2. Bactérias

Dentre as milhares de espécies bacterianas existentes, a maioria isolada apresentou basicamente uma das três formas: elipsoidal ou esférica, cilíndrica ou em bastonete e espiralada ou helicoidal (figura 3). O tamanho delas está entre 0,5 a 1,0 por 2,0 a 5,0 μ (CECCATO-ANTONINI, 2004).

Na figura 4, pode-se perceber que a célula bacteriana mostra certas estruturas definidas, dentro e fora da parede celular. Os constituintes externos à parede celular representam os flagelos, os pelos (fimbrias) e a cápsula. A parede celular apresenta grande rigidez, podendo ser percebida quando as bactérias são submetidas a condições externas extremas, como pressão osmótica muito elevada, temperaturas muito baixas ou muito elevadas seguidas, e mesmo assim as células manterão sua forma original (CECCATO-ANTONINI, 2004).

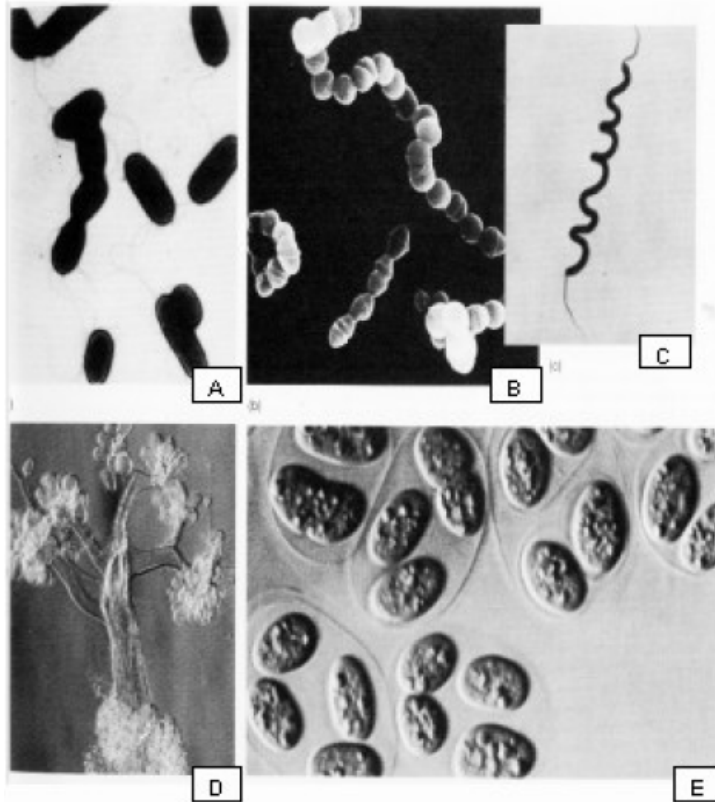


Figura 3: A diversidade de bactérias. **A**, *Pseudomonas aeruginosa*, um bastonete flagelado; **B**, *Streptococcus*, células esféricas dispostas em cadeias; **C**, *Spirillum volutans*, célula espiralada; **D**, *Chondromyces crocatus*, as células em forma de bastonete movem-se juntas, formando uma estrutura que carrega esporos; **E**, *Chroococcus*, uma cianobactéria na qual os indivíduos ficam aderidos numa cápsula gelatinosa (RAVEN; JOHNSON – apud CECCATO-ANTONINI, 2004)

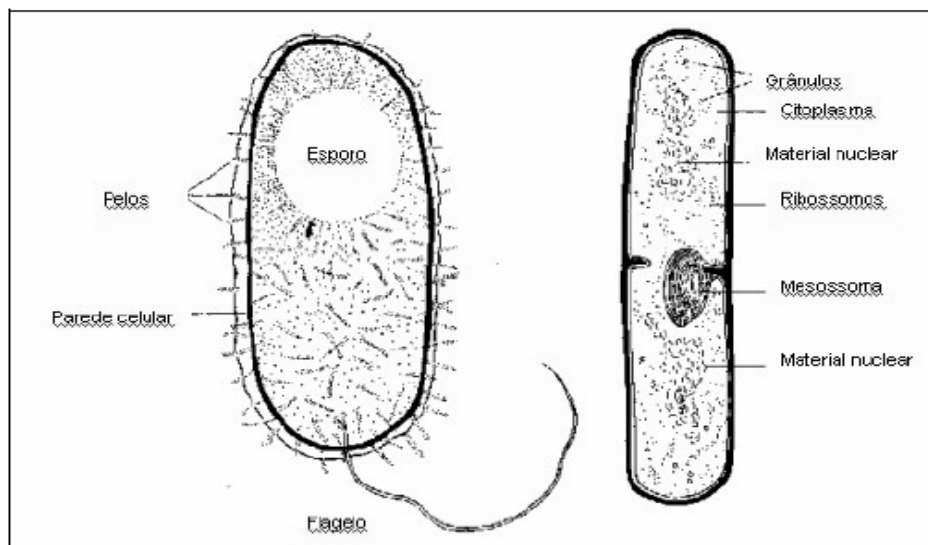


Figura 4: Representação esquemática da organização estrutural de uma célula bacteriana (PELCZAR et al. – apud CECCATO-ANTONINI, 2004)

As principais contaminantes da fermentação etanólica são as bactérias dos gêneros *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus* (AMORIM; OLIVEIRA, 1982). Segundo Rodini (1985), em um mosto fermentado foi encontrado contaminação de 10^7 bactérias por mL, onde as bactérias Gram-positivas abrangeram 65% do total, sendo 62% pertencentes ao gênero *Bacillus*.

Os maiores prejuízos causados pela contaminação bacteriana são a degradação de sacarose e a formação de ácidos orgânicos que provocam perda de açúcar e intoxicação das leveduras (OLIVA-NETO; YOKOYA, 1997).

A formação de gomas, que aumenta a viscosidade do caldo e pode causar entupimentos nas tubulações, centrífugas, peneiras e trocadores de calor; a floculação do fermento, que diminui a velocidade de fermentação, provoca perda de células de levedura pelo fundo da dorna e dificulta a operação das centrífugas também são causados pela contaminação bacteriana e responsáveis pela queda no rendimento fermentativo (AMORIM; OLIVEIRA, 1982; OLIVA-NETO; YOKOYA, 1997).

As bactérias também podem interferir no processo utilizando o álcool como fonte de carbono, desdobrando-o em ácido acético. Desse modo, além de consumirem a sacarose que poderá ser fermentado, afetam o processo liberando substâncias tóxicas que matam a levedura ou outras substâncias que fazem com que as leveduras floculem (figura 5) (CTC, 2005).

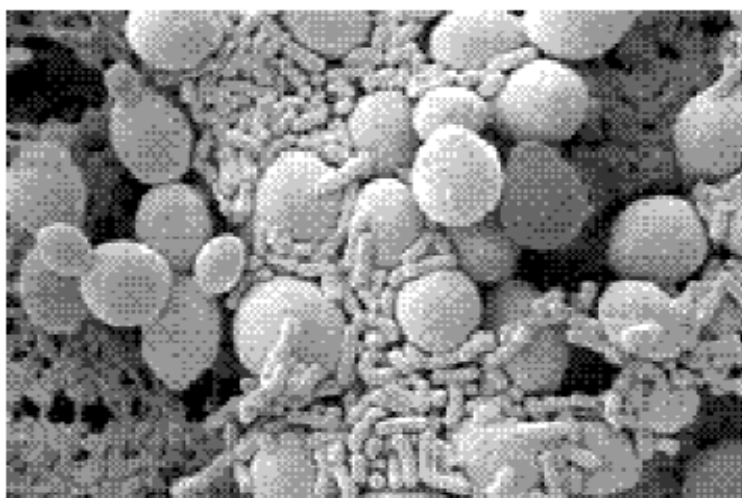


Figura 5: Fotomicrografia ilustrando a floculação de leveduras por bactérias. (Fonte: ALCOOLBRAS, 2008)

3.6. Tipos de Descontaminantes do Fermento

Para um controle do processo de fermentação alcoólica é necessário o monitoramento da contaminação de todas as etapas do processo, envolvendo o caldo e o fermento, buscando alternativas capazes de reduzir ou eliminar a infecção e, conseqüentemente, melhorando o rendimento (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009).

Há trinta anos, Silva (1975) realizou um estudo preliminar de controle da infecção de moendas através da aplicação de bactericidas, já percebendo essa necessidade de controle da contaminação.

Para uma melhor eficiência fermentativa, o processo busca alternativas para controlar e reduzir a contaminação da fermentação. Dentre os tratamentos para esse fim, temos a dosagem de ácido sulfúrico, aplicação de antibióticos sintéticos e naturais.

3.6.1. Tratamento com Ácido Sulfúrico

De acordo com Souza e Mutton (2004), o tratamento ácido é prática comum para o controle da infecção contida no fermento. Observa-se redução de 44,3% da contaminação microbiana em função do tempo e do vigor desse tratamento. Porém, quando a levedura está floculada por indução bacteriana, esse tratamento apenas induz a separação do fermento e das bactérias, mas não elimina totalmente.

Para Dorta (2006), o tratamento com ácido sulfúrico é realizado após cada ciclo fermentativo para evitar o aumento da contaminação bacteriana e diminuir a floculação. Em contrapartida, esse procedimento pode interferir negativamente no metabolismo e fisiologia da levedura.

Este meio acidificado torna-se também um fator de seleção da população de levedura no processo. Apenas as cepas que melhor se desenvolvem em meios com valores de pH dentro desta gama são capazes de dominar o processo (ANDRIETTA et al., 2011).

Após a centrifugação, o creme de levedura é enviado para as cubas, onde será diluído e tratado severamente, com adição de ácido sulfúrico, antes de retornar para o processo. O pH do meio é acidificado em torno de 2,5 ou menos, dependendo do nível da contaminação bacteriana. Esta suspensão de fermento diluído e acidificado é conhecida na prática como pé-de-cuba, permanecendo em

agitação de uma a três horas, esperando o retorno para a dorna de fermentação (FURTADO; SCANDIFFIO, 2006).

O intenso reciclo de células de levedura e a constante exposição a meios ácidos, tanto no mosto como na cuba, provoca um estresse ácido, levando à queda na viabilidade celular no processo, além do aumento de leveduras naturais e contaminação bacteriana (MELO, 2006).

3.6.2. Tratamento com Antibióticos Sintéticos

De acordo com LIMA (2001), além do uso do ácido sulfúrico concentrado, há a possibilidade de tratamentos com antibióticos, como: penicilina, tetraciclina, cloranfenicol e clorotetraciclina, Kamoran e virginiamicina, atuando como bons inibidores de contaminações.

Uma dificuldade é o custo dos antibióticos, além de serem caros, requerem constante aplicação, restringindo ao fato do custo-benefício (BEVAN; BOND, 1971). Outro problema é a possibilidade de deixarem resíduos nos destilados (BREGAGNOLI, 2006).

Além disso, tem muitos produtos que deixam resíduos que são proibidos para consumo animal, ou que contenham coadjuvantes inertes prejudiciais à levedura. Recentemente, esse tipo de insumo tem sido monitorado e regulamentado em levedura seca por parte de autoridades regulatórias de países compradores desse material, devido ao residual de antibióticos acima do esperado encontrado em lotes exportados (VENTURA, [s.d.] – apud CAETANO; MADALENO, 2011).

3.6.3. Tratamento com Antibióticos Naturais

Com essa nova regulamentação e o problema da resistência microbiana crescente, novas alternativas devem ser estudadas, principalmente por não se saber qual o futuro quanto ao uso dessas drogas. Um antimicrobiano de origem natural se torna uma alternativa eficaz e econômica (VARGAS et al., 2004).

Biocidas naturais são produtos utilizados na desinfecção de mosto, tanques e equipamentos utilizados na fermentação. Muitos desses produtos atendem às exigências de agências alimentícias internacionais, apesar de não atingirem padrões sanitários mínimos para uso em alimentos (VENTURA, [s.d.] – apud CAETANO; MADALENO, 2011).

Dentre esses antimicrobianos naturais, os derivados de lúpulo estão sendo disseminados no setor. Essa substância possui antioxidantes naturais potentes, apresentando também alguns componentes com efeito bactericida (NOGUEIRA, 2004). Os β -ácidos, presentes no lúpulo, possuem ação bactericida, agindo em bactérias Gram-positivas sobre a membrana plasmática das células, inibindo fortemente o seu crescimento (SILVA; FARIA, 2008).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no laboratório industrial de uma usina de açúcar e álcool, situada no interior de São Paulo. Foi realizada uma fermentação de bancada, baseada no procedimento descrito por Silvio Andrietta, no site da empresa de consultoria Biocontal (2012).

4.1. Material utilizado

Para realização do teste foram utilizando os seguintes materiais:

4.1.1. Creme de levedura após centrifugação

O fermento utilizado neste teste foi o creme concentrado, após centrifugação, que estava em processo nas dornas.

4.1.2. Água tratada para diluição do fermento

Foi utilizada água tratada e clorada na diluição do fermento concentrado, após saída da centrífuga, diluindo o fermento a 30% de concentração.

4.1.3. Ácido Sulfúrico

Para o tratamento do fermento centrifugado e diluído, foi utilizado ácido sulfúrico concentrado e ácido sulfúrico diluído a 10% de concentração.

4.1.4. Mosto do Processo

A matéria-prima utilizada como alimentação do fermento teste foi o mosto de alimentação das dornas, provenientes de mel final do processo, diluído com caldo clarificado de cana-de-açúcar e água condensada.

4.1.5. Vidrarias

Para realização do teste, foram separados seis frascos de 500 mL, numerando-os de 1 a 6, para preparo da fermentação de bancada. Foram preparadas 6 rolhas de borracha com respiro, constituído de um vidro em L, para vedação dos frascos.

4.1.6. Equipamentos

Os equipamentos utilizados durante o teste foram: uma Balança Analítica, com duas casas decimais; uma Estufa Spencer com controle de temperatura; um Potenciômetro Digital, com correção de leitura; um Refratômetro Digital, com correção de leitura; uma manta aquecedora com balão de fundo chato de boca esmerilhada; um Microdestilador e Destilador por arraste em vapor; Densímetro Digital e Cromatógrafo Iônico Dionex para leitura por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

4.2. Método Utilizado

Foi reproduzida uma fermentação industrial em escala, com cálculo do rendimento por balanço de massa. Dessa forma, consegue-se eliminar as variações de processo, que acontecem sempre com a variação do mosto de alimentação, caso fosse realizado o teste numa planta industrial.

O teste foi realizado em triplicata, permitindo avaliar o nível de confiança dos dados obtidos. A metodologia foi retirada do site da Consultoria Biocontal (2012).

4.2.1. Preparo do Fermento

O fermento centrifugado foi diluído com água da ETA, tratada e clorada, até concentração de 30%. Em seguida, foram separados em dois frascos, aproximadamente 600 mL cada, para sofrer o tratamento ácido.

O primeiro fermento foi tratado com adição de 8,5 mL de ácido sulfúrico diluído a 10%, com agitação constante e acompanhamento até atingir pH de 2,5. Foi mantido em tratamento por 30 min. O segundo fermento foi tratado com adição de 0,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, seguindo o mesmo procedimento do primeiro.

4.2.2. Preparo da Fermentação de bancada

Após tratamento, as fermentações foram montadas nos frascos separados anteriormente. Foi transferido 140 mL de mosto industrial para cada um dos 6 frascos e anotado o peso dos frascos com o mosto. Em seguida, foram adicionados 60 mL de fermento tratado. Nos frascos 1 a 3, foi adicionado o fermento 1 (tratado com ácido diluído) e nos frascos 4 a 6, foi adicionado o fermento 2 (tratado com ácido concentrado). Os frascos foram pesados e anotados.

Com todos os frascos pesados, foram levados para estufa a 34°C. A cada 1 hora, retirá-los da estufa, agitá-los lentamente para total eliminação do CO₂ dissolvido e pesá-los.

4.2.3. Análises realizadas

Foram realizadas no Mosto análises de pH, ART, Brix e Acidez. Em ambos os fermentos tratados (1 e 2), foram analisados pH, Acidez, Etanol (INPM) e Glicerol. No vinho fermentado (frascos 1 a 6), foram analisados pH,

Acidez, Etanol (INPM), Glicerol e ARRT. A metodologia de análises foi retirada de Fermentec (2011).

4.2.4. Determinação da Eficiência da Fermentação

Com as análises realizadas no Vinho fermentado (Tabela 6), pode-se calcular o rendimento fermentativo de cada frasco, através do cálculo por balanço de massa. Esse cálculo é baseado na relação direta entre o produto (Etanol produzido) e o reagente utilizado (ART – Açúcares Redutores Totais, da alimentação) (BIOCONTAL, 2012).

4.2.5. Determinação do ART entrado no Mosto de alimentação

$$\text{ART entrado} = (\text{Massa Mosto} \times \text{ART Mosto}) / (\text{densidade} \times 100);$$

onde: densidade = $0,00431 \times \text{Brix Mosto} + 0,99367$

4.2.6. Determinação do Álcool produzido na fermentação

$$\text{Álcool produzido} = (\text{Álcool Vinho}) - (\text{Álcool Fermento})$$

$$\text{Álcool produzido} = (\text{Massa Vinho} \times \text{Etanol Vinho})/100 - (\text{Massa Fermento} \times \text{Etanol Fermento})/100$$

4.2.7. Cálculo da Eficiência da Fermentação

$$\text{Eficiência Fermentação} = \text{Álcool produzido} \times 100 / (0,511 \times \text{ART entrado})$$

5. RESULTADOS

Inicialmente, foram pesados os frascos vazios, contendo suas respectivas rolhas de borracha. Em seguida, após adição do mosto nos frascos vazios, foi pesado novamente os frascos para obter os valores de mosto inicialmente utilizado no teste. Após a pesagem, foi adicionado o fermento tratado e pesado novamente.

Tabela 2: Massa Inicial dos Frascos Vazios, contendo Mosto e Fermento separadamente, calculando em seguida a massa real utilizada em cada frasco

Início do Teste	Ácido Diluído com agitação			Ácido Concentrado com agitação		
	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 4	Frasco 5	Frasco 6
Massa Frasco Vazio	176,48	196,35	169,48	166,22	226,60	213,44
Massa Frasco + Mosto	327,15	347,99	322,33	317,91	376,92	363,67
Massa Frasco + Mosto + Fermento	392,16	409,80	381,61	380,60	438,20	423,85
Massa inicial Mosto	150,67	151,64	152,85	151,69	150,32	150,23
Massa inicial Fermento	65,08	61,87	59,31	62,74	61,29	60,18

Na tabela 3, tem-se os resultados das análises realizadas no mosto de pH, ART, Brix e Acidez, e as análises realizadas nos fermentos tratados (1 e 2), pH, Acidez, Etanol e Glicerol.

Tabela 3: Resultados das análises de pH, ART, Brix e Acidez realizadas no Mosto e pH, Acidez, Etanol e Glicerol nos Fermentos 1 e 2

Análises realizadas	Mosto	Fermento 1	Fermento 2
pH	6,00	2,58	2,56
ART	20,96	-	-
Brix	24,06	-	-
Acidez	1,44	2,94	3,29
Etanol (INPM)	-	3,82	3,88
Glicerol	-	0,216	0,222

Foi realizada a pesagem dos frascos, de hora em hora, para acompanhamento da fermentação, objetivando verificar o rendimento fermentativo por método de redução de escala (tabela 4). No tempo de 8 horas, foi verificada variação menor de 1 grama, anotando como tempo final da fermentação.

Tabela 4: Pesagem dos frascos de hora em hora, verificando a redução da massa em cada período, até final da fermentação

Tempo (horas)	Ácido Diluído com agitação			Ácido Concentrado com agitação		
	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 4	Frasco 5	Frasco 6
0	392,16	409,80	381,61	380,60	438,20	423,85
1	390,87	408,45	380,42	379,52	436,70	422,57
2	388,96	406,83	378,94	378,07	435,01	420,96
3	386,57	405,03	376,97	376,13	432,87	418,85
4	384,74	403,54	375,61	374,42	431,16	417,09
5	382,56	402,01	373,90	372,90	429,36	415,23
6	380,45	399,54	371,71	370,32	426,67	412,62
7	379,54	398,45	370,43	369,38	425,47	411,50
8	379,10	397,77	369,62	368,59	424,66	410,86

Pelos dados obtidos com as pesagens dos frascos durante a fermentação e pelo cálculo das massas de mosto e fermento utilizados no início, calculou-se a massa final de vinho. Foi realizado as análises de pH, Acidez, Etanol, Glicerol e ARRT (tabela 5).

Tabela 5: Massa Final de Vinho, após final da fermentação e análises de pH, Acidez, Etanol (INPM), Glicerol e ARRT realizadas no Vinho fermentado em cada frasco

Análises realizadas no Vinho	Ácido Diluído com agitação			Ácido Concentrado com agitação		
	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 4	Frasco 5	Frasco 6
Massa Final Vinho	202,62	201,42	200,14	202,37	198,06	197,42
pH	4,71	4,66	4,66	4,61	4,63	4,66
Acidez	3,82	4,32	3,83	3,72	3,36	3,02
Etanol (INPM)	7,370	7,650	7,710	7,720	7,470	7,780
Glicerol	0,619	0,700	0,668	0,605	0,590	0,662
ARRT	0,059	0,838	1,134	0,717	0,352	0,099

Com base nas análises realizadas no Vinho fermentado (tabela 5), foi calculado o rendimento fermentativo de cada frasco (tabela 6 e gráfico 3).

Tabela 6: Cálculo do Rendimento Fermentativo de cada frasco

Cálculo da Eficiência da Fermentação	Ácido Diluído com agitação			Ácido Concentrado com agitação		
	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 4	Frasco 5	Frasco 6
ART entrado	28,7783	28,9636	29,1947	28,9731	28,7115	28,6943
Álcool Vinho	14,9383	15,4132	15,4331	15,6268	14,7958	15,3593
Álcool Fermento	2,4861	2,3634	2,2656	2,4343	2,3781	2,3350
Álcool produzido	12,452	13,050	13,167	13,193	12,418	13,024
Rendimento Fermentação	84,66	88,16	88,25	89,09	84,64	88,83

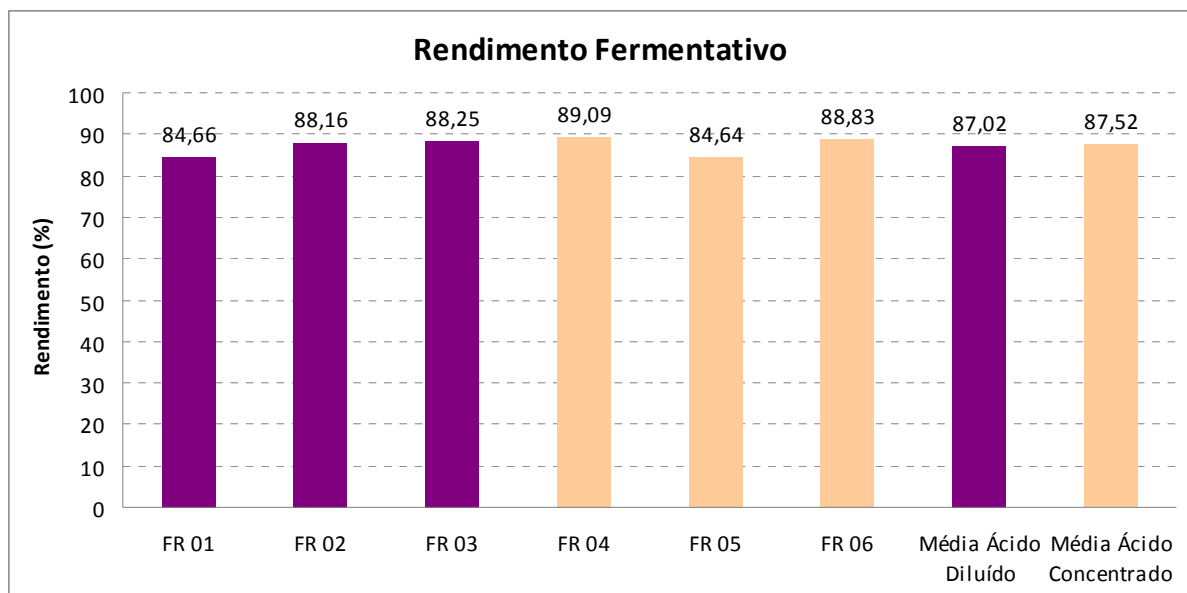


Gráfico 3: Rendimento Fermentativo

6. CONSIDERAÇÕES

Aparentemente não houve variação entre os resultados encontrados nos dois tipos de tratamento, tanto utilizando ácido sulfúrico diluído a 10%, como ácido concentrado.

7. CONCLUSÃO

Em todas as análises foram obtidos resultados semelhantes aos obtidos nos meios industriais, provavelmente por ter sido simulado uma fermentação batelada em bancada, próximo da real.

Se considerarmos o maior resultado como 100% (no caso o tratamento com ácido sulfúrico concentrado), ao utilizarmos tratamento com ácido sulfúrico diluído, o rendimento estaria apenas 0,56% abaixo do anterior (99,44%).

Dessa forma, analisando os resultados fermentativos, verifica-se que a média dos rendimentos foi muito próxima, não encontrando tanta diferença em se utilizar ácido diluído ou ácido concentrado para tratamento do pé-de-cuba.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, C.D.G. **Inovações tecnológicas na agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil**. COPPE/Universidade Federal do Rio de Janeiro, DEPRO/Universidade Federal de Ouro Preto, 2005.
- ALCARDE, A.R.; HORII, J.; NOBREI, T.P. **Viabilidade Celular de Saccharomyces cerevisiae cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica**. Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Campinas, 2007.
- ALCOOLBRAS, Fermentando altos rendimentos. **Revista Alcoolbras**, Edição 117, 2008. Disponível em: <http://www.revistaalcoolbras.com.br/edicoes/ed_117/mc_2.html>. Acesso em 15.out.2012.
- AMORIM, H.V. **Fermentação alcoólica: Ciência e Tecnologia**. Piracicaba-SP, Fermentec, 448p, 2005.
- AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J. Infecção na fermentação: como evitá-la. **Revista Álcool e Açúcar**, v.2, n.5, p.12-18, 1982.
- ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E.N.A. Bioethanol - Brazil, 30 years of Proálcool. **International Sugar Journal**, v.109, p.195-200, 2006b.
- ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C.. Bioetanol - Brasil, 30 anos na vanguarda. **MultiCiência**. Universidade de Campinas, 2006a.
- ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STUPIELLO, E.N.A. Bioethanol - What Has Brazil Learned about Yeasts Inhabiting the Ethanol Production Processes from Sugar Cane? **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**. Ed: Bernardes, M.A.S., 596f., Intech, Set. 2011.
- ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STUPIELLO, E.N.A. Uma Nova Visão da Microbiota de Leveduras Habitantes do Processo de Produção do Bioetanol Brasileiro. **Revista STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**. v.30, n.2, nov-dez, 2011.
- ATALA, D.I.P.; COSTA, A.C.; MACIEL FILHO, R.; MAUGERI FILHO, F. Fermentação Alcoólica com alta densidade celular: Modelagem cinética e convalidação de parâmetros. **Livro de Resumos do XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2000.
- BASSO, L.C.; Fisiologia e ecologia da fermentação alcoólica. **I Workshop Tecnológico sobre Produção de Etanol**. Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz'. Universidade de São Paulo, 2004.
- BASSO, L.C.1991; In: ALVES, D.M.G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica**. Dissertação

(Doutorado). Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz'. Universidade de São Paulo. p.199.1994.

BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G; AMORIN, H.V. The antibacterial action of succinic acid produced by yeast during fermentation. **Revista de Microbiologia**, v.28, supl.1, p.77-82, 1997.

BENEY, L.; GERVAIS, P. **Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses**. Applied Microbiology and Biotechnology. Berlin, Oct. 2001.

BEVAN, D.; BOND, J. Microorganism in field and mill - a preliminary survey. In: Conference of the Queensland Society of Sugar Cane Technologists, 38, Cairns, 1971. **Proceedings**. Brisbane: Watson Ferguson, p.137-143, 1971.

BIOCONTAL, Empresa de Consultoria. **Cálculo de Rendimento Fermentativo por balanço de massa**. Disponível em: <www.biocontal.com.br>. Acesso em 15.out.2012

BOVI, R.; MARQUES, M.O. O tratamento ácido da fermentação alcoólica. **Revista Álcool e Açúcar**, v.3; n.9, p.10-13, 1983.

BREGAGNOLI, F.C.R. **Comportamento fisiológico de microorganismos submetidos a biocidas convencional e natural na produção de cachaça orgânica**. 2006. 80f. Tese (Doutorado - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias). Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. Jaboticabal, 2006.

BROSNAN, M.P.; DONNELLY, D.; JAMES, T.C.; BOND, U. Stress response is repressed during fermentation in brewery strains of yeast. **Journal of Applied Microbiology**. V.88, n.5, p.746-755, May 2000.

CABRINI, K.T.; GALLO, C.R. Identificação de leveduras contaminantes no processo de fermentação alcoólica na Usina Santa Elisa. **Revista STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**. v.17, n.6, p.48-50, 1999.

CAROLO, A. Etanol de cana é superior ao de milho e beterraba. **Revista Cana Mix**, v.5, p.38-39, Mai 2012.

CARTWRIGHT, C.P.; ROSE, A.H.; CALDERBANK, J.; KEENAN, M.H.J. Solute Transport. In: **The Yeasts**. Ed. ROSE, A.H. Academic Press, London, v.3, p.5-56, 1989.

CARVALHO, J.C.M; SATO, S. Fermentação descontínua alimentada. In: SCHMIDELL, W. et al., Biotecnologia **Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo. Edgar Blucher, p.205-222. (Biotecnologia Industrial) v.2, 2001.

CEBALLOS-SCHIAVONE,C.H.M. **Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacterianos: Lactobacillus na produção de etanol e eficiência do tratamento do fermento por etanol**. 2009.

177f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia do Alimento) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

CECCATO-ANTONINI, S.R. **Métodos de análise e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. Apostila, São Carlos: UFSCAR, 33f. Fev. 2004

COPERSUCAR, **Cooperativa dos Produtores de Cana-de-Açúcar, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo**. Disponível em: <<http://www.copersucar.com.br/institucional/por/academia/alcool.asp>>. Acesso em 24.jun.2010; In: ZAR, L.S. **Efeito da contaminação bacteriana na viabilidade da Levedura *Saccharomyces cerevisiae***. 2010. 38f. Dissertação (Graduação em Tecnologia em Biocombustíveis). Faculdade de Tecnologia de Araçatuba. Araçatuba, 2010.

CTC, Centro de Tecnologia Canavieira. **Manual de métodos analíticos e controle químico da fermentação**. Centro de tecnologia canavieira - laboratório de análises. Piracicaba, 2005.

CYSEWSKI, G.R.; WILKIE, C.W. Process design and economic studies of fermentation methods for the production of ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**. v.20, p.1421-1430, 1978.

D'AMORE, T.; STEWART, G. Ethanol tolerance of yeast. **Enzyme and Microbial Technology Research and Reviews**, v.9, n.6, p.322-330, 1987.

DORTA, C. **Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26)**. 144f. Dissertação (Doutorado). Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, SP, 2006.

DUARTE, J.C.; LOURENÇO, V.; RIVEIRO, B. **Continuous culture of flocculent yeast for ethanol production**. Biotechnology Department, Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação. Portugal, 2006.

ESTRUCH, F. **Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast**. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews. Amsterdam, 2000.

FACCIOTTI, M.C.R. Fermentação Contínua. In: SCHMIDELL et al. (Coord.) **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgar Blucher, p.223-246, 2001.

FERMENTEC, **Controle das Perdas Industriais e Fermentação**. Treinamento Analítico (Laboratorial), Área de Controle Químico. Editora Fermentec, 31f. Piracicaba, 2011.

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

GALLO, C.R. Contaminantes bacterianos em mosto e dornas de fermentação alcoólica. In: EGUCHI, S.Y. et al., **Pontos Críticos Microbiológicos em Usina de Açúcar e Alcool**. Campinas, Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia 'André Tosello', p.1-8, 1989.

GOMES, E. **Efeito do tratamento ácido da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação alcoólica**. 206f. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz'. Universidade de São Paulo, 1988.

GRUBBS, R.D.; MAGUIRE, M.E. **Magnesium as a regulatory cation: criteria and evaluation magnesium**. Magnesium. New York, 1987.

ICONE, Instituto de Estudos do Comércio e Negociações Internacionais. Benchmark of cane-derived renewable jet fuel against major sustainability standards. **Report**. Disponível em: <www.unica.com.br>. Acesso em 15.out.2012

IMPE VAN, J.F.; NICOLAY, B.M.; VANROLLEGHM, P.A.; SPRIET, J.A.; MOOR, B.D.; VANDEWALLE, J. Optimal control of the penicillin g. fed-batch fermentation: an analysis of the model of Heijnen et al. **Optimal Control Appl. & Methods**. 15, p.13-34, 1994.

KAIM, W.; SCHEDERSKI, B. **Catalysis and regulation of bioenergetic process by the alkaline earth metal ions Mg^{2+} and Ca^{2+}** . Bioinorganic Chemistry: inorganic elements in the chemistry of life. Chichester: Wiley, 1994.

LEE, C.D; CHAPMAN, D. The effects of temperature on biological membranes and their models. **Symposia of the Society for Experimental Biology. Anais...** Cambridge, 1987.

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. In: LIMA, U.A.; (Coord.) **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgar Blucher, p.1-43. (Biotecnologia Industrial, v.3), 2001

MAPA, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA , PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Brazilian Agroenergy Plan 2006-2011**. Embrapa. Brasília, DF, 2005.

McNEIL, B.; HARVEY, L.M. **Fermentation - a practical approach**. 1st ed. IRL PRESS at Oxford University Press, 1990.

MELO, H.F. **Resposta ao estresse ácido em leveduras da fermentação industrial**. 2006. 73f. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2006.

MENEZES, T.J.B. **Etanol, o combustível do Brasil**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, p.141-178, 1980.

MONACO, M.A.S.L. **Efeito protetor do magnésio no choque térmico e estresse pelo etanol em leveduras *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Mestrado).

Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2007.

NOBRE, T.P. **Viabilidade celular de Saccharomyces cerevisiae em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica**. 2005. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2005

NOGUEIRA, M. O que é lúpulo. **Revista Superinteressante**. n.197, fev 2004.

OLIVA-NETO, P; YOKOYA, F. Effects of nutritional factors on growth of Lactobacillus fermentum mixed with Saccharomyces cerevisiae in alcoholic fermentation. **Revista de Microbiologia**, v.28, p. 25-31, 1997.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill, 566f.v.1, 1980. In: CECCATO-ANTONINI, S.R. **Métodos de análise e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. Apostila, São Carlos: UFSCAR, 33f. Fev. 2004

QUEINNEC, I.; DAHOU, B. Optimization and control of a fedbatch fermentation process. **Optimal Control Appl. & Methods**. 15 3, p. 175-1991, 1994

RAIZEN, Indústria de Açúcar, Álcool e Energia. **Produção de Etanol**. Disponível em:<<http://pt.raizen.com.br/segmentos-de-atuacao/producao-de-etanol>>. Acesso em 15.out.2012.

RAVEN, P.H.; JOHNSON, G.B. **Biology**. Dubuque: WCB, 1310f, 1990. In: CECCATO-ANTONINI, S.R. **Métodos de análise e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. Apostila, São Carlos: UFSCAR, 33f. Fev. 2004

REES, E.M.R.; STEWART, G.G. The effects of increased magnesium and calcium concentration on yeast fermentation performance in high gravity worts. **Journal of the Institute of Brewing**. London, v.103, p. 287-291, 1997.

RIBEIRO, E.J. **Fermentação Alcoólica**. Uberaba, 2010. Apostila do Módulo II. Processamento na Indústria Sucroalcooleira. FAZU. RIBEIRO, F.A.M. Álcool e Açúcar: uma via de mão dupla. In: ROSSAFA, L.A. (Coord.) Álcool Combustível - série indústria em perspectiva. Brasília: Instituto Evaldo Lodi. p.48-57, 2008.

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

RODRIGUES, C.A. **Petroquímica: Perspectivas de Reestruturação**. 2005. Disponível em:<http://www.soeconomia.com.br/index.php?option=com_content&task=view&id=118&Itemid=113>. Acesso em 15.out.2012

RODRIGUES, R. Perspectivas para o agronegócio brasileiro e o setor sucroalcooleiro. **Global Initiative on commodities**. Brasília, DF. Maio, 2007.

SANTOS, A.M. **Estudo das influências da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada**. 2008. 77f. Tese (Doutorado em química e biotecnologia). Universidade Federal de Alagoas. Maceió, 2008.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M.C.R. **Biorreatores e Processos Fermentativos**. In: SCHMIDELL, W. et al., (Coord.) *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgar Blucher, p.179-192.(*Biotecnologia Industrial*, v.2), 2001

SILVA, E. da. Estudo preliminar de controle da infecção de moendas através de bactericidas. **Seminário Copersucar da Agroindústria Açucareira**, 3, Águas de Lindóia, 1975. **Anais...** Piracicaba: Copersucar, p. 473-483, 1975.

SILVA, P.H.A.; FARIA, F.C. **Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais**. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, Campinas, 2001.

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

SUNAO, S. **Contribuição ao estudo de fermentação alcoólica com o aproveitamento de sacarídeos obtidos a partir de cana-de-açúcar**. 1992, 138f. Dissertação (Mestrado Bioquímica Farmacêutica). Universidade de São Paulo. São Paulo, 1992.

TORIJA, M.J.; ROZES, N.; POBLET, M.; GUILLAMON, J.M.; MAS, A. Effects of Fermentation Temperature on the Strain Population of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**. 80,p. 47-53, 2003.

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

UNICA União da Indústria de Cana-de-açúcar. In: CAROLO, A. Etanol de cana é superior ao de milho e beterraba. **Revista Cana Mix**, v.5, p.39, Mai 2012.

VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, N.M.; COSTA, M.M.; SILVA, M.S.; VIANA, L.R. **Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcoólico de própolis**. *Ciência Rural*. Santa Maria, 2004.

VENTURA, R. **Potenciais contaminantes em levedura extraída de fermentação alcoólica**. [s.d.]. Disponível em: <http://www.quimicareal.com.br/upload/palestra_ventura.pdf>, Acesso em: 25.out,

2009; In: CAETANO, A.C.G.; MADALENO, L.L. **Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica, com aplicação de biocidas naturais**. Ciência e Tecnologia, FATEC-JB, Jaboticabal, 2011.

WALKER, G.M. The roles of magnesium in biotechnology. **Critical Reviews in Biotechnology**. Boca Raton, v.14, n.4, p. 311-354, 1994.

YOKOYA, F. Microbiologia de Processo. In: EGUCHI, S.Y. et al., **Pontos Críticos Microbiológicos em Usina de Açúcar e Álcool**. Campinas, Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia 'André Tosello', p.1-22, 1989.