



**Fundação Educacional do Município de Assis
Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis
Campus "José Santilli Sobrinho"**

RAFAELLA ARNEMANN

**USO DE BIORREATOR DE LABORATÓRIO PARA MEDIÇÃO DO
RENDIMENTO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

**Assis/SP
2016**



**Fundação Educacional do Município de Assis
Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis
Campus "José Santilli Sobrinho"**

RAFAELLA ARNEMANN

**USO DE BIORREATOR DE LABORATÓRIO PARA MEDIÇÃO DO
RENDIMENTO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Química Industrial do Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA e a Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA, como requisito parcial à obtenção do Certificado de Conclusão.

**Orientando(a):Rafaella Arnemann
Orientador(a):Me. Gilcelene Bruzon**

**Assis/SP
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA

ARNEMANN, Rafaella.

Uso de biorreator de laboratório para medição do rendimento da fermentação alcoólica /
Rafaella Arnemann. Fundação Educacional do Município de Assis –FEMA – Assis, 2016.

43p.

1. Fermentação. 2. Biorreator.

CDD:
Biblioteca da FEMA

USO DE BIORREATOR DE LABORATÓRIO PARA MEDIÇÃO DO RENDIMENTO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

RAFAELLA ARNEMANN

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, como requisito do Curso de Graduação, avaliado pela seguinte comissão examinadora:

Orientador: _____
Gilcelene Bruzon

Examinador: _____
Alexandre Vinicius Guedes Mazalli

Assis/SP
2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu co-orientador Marco J. Zimak que tanto me ajudou em muitos momentos sempre com muita dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder a oportunidade de fazer uma graduação.

A minha família pelo incentivo, ao meu noivo Felipe que sempre esteve ao meu lado, incentivando e apoiando em todo o tempo, colaborando sempre para execução do trabalho.

Em especial ao meu co-orientador Marco J. Zimak pela orientação e pelo constante estímulo transmitido durante o trabalho, colaborando diretamente. E a minha orientadora Gilcelene Bruzon.

RESUMO

A fermentação alcoólica é um processo bioquímico complexo que envolve diversas etapas na transformação dos açúcares da cana pela ação das leveduras. Com isso o presente trabalho teve como objetivo mostrar o uso do biorreator de laboratório, desenvolvido por Marco J. Zimak, na simulação do processo fermentativo de usinas de açúcar e álcool, podendo assim calcular a eficiência fermentativa através do princípio do cálculo estequiométrico. Foram realizados três ensaios de fermentação no biorreator que ocorreram simultaneamente com a fermentação da indústria, sob as mesmas condições de temperatura, utilizando o mesmo pé de cuba e mosto do processo industrial. Foram analisados pH, acidez sulfúrica, acidez láctica, teor alcoólico, concentração de leveduras, glicerol, viabilidade celular, ART e brix. Sendo utilizadas para o cálculo estequiométrico apenas ART e teor alcoólico, os demais parâmetros foram realizados para acompanhamento do processo. Os rendimentos obtidos nos ensaios foram de 94,02%, 86,10% e 93,05% enquanto na fermentação industrial foram de 91,09%, 93,45% e 93,49%. O biorreator se mostrou uma técnica aplicável, pois os resultados obtidos foram próximos dos resultados em escala industrial. Foi possível a partir das demais análises verificar os fatores que influenciaram para a diminuição do rendimento, fatores estes que não são mensurados nas análises realizadas durante o processo industrial. O conhecimento desses números é de extrema importância, já que as metas das unidades produtoras é maximizar a produtividade e reduzir custos, juntamente com a melhoria da qualidade da matéria-prima e dos produtos finais.

Palavras-chave: fermentação alcoólica, eficiência fermentativa.

ABSTRACT

Fermentation is a complex biochemical process involving several steps in the processing of cane sugar by the action of yeast. Thus the present study aimed to show the use of the laboratory bioreactor, developed by Marco J. Zimak, the simulation of the fermentation of sugar and alcohol, and can thus calculate the fermentative efficiency through the principle of stoichiometric calculation. three fermentation tests were carried out in the bioreactor occurring simultaneously with the fermentation industry under the same temperature conditions, using the same foot vessel and the wort industrial process. pH were analyzed, sulfuric acid, lactic acid, alcohol, yeast concentration of glycerol, cell viability, ART and brix. Being used to calculate stoichiometric only ART and alcohol, the other parameters were performed to monitor the process. The yields obtained in the tests were 94.02%, 86.10% and 93.05%, while the industrial fermentation were 91.09%, 93.45% and 93.49%. The bioreactor showed an applicable technique because the results were similar results in industrial scale. It was possible from other analyzes to identify factors that influenced to reduce income, factors that are not measured in the analyzes carried out during the manufacturing process. Knowledge of these numbers is extremely important, since the goals of the production units is to maximize productivity and reduce costs, along with improving the quality of raw materials and final products.

Keywords: alcoholic fermentation, fermentation efficiency.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Equação da transformação química da glicose em etanol e gás carbônico	16
Figura 2: Fluxograma de processo de fabricação de açúcar e álcool.	19
Figura 3: Esquema de uma destilaria	20
Figura 4: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
Figura 5: Rota bioquímica	22
Figura 6: Biorreator desenvolvido por Marco J. Zimak.....	25
Figura 7: Fluxograma da metodologia do biorreator.	29
Figura 8: Pesagem das amostras e do corpo do reator.	29
Figura 9: Biorreator sendo alimentado.....	30
Figura 10: Fim da alimentação no reator.	31
Figura 11: Coletor de etanol por CO ₂ e vinho bruto fermentado.....	32
Figura 12: Cálculo do rendimento da fermentação por estequiometria.....	37
Figura 13: Cálculo da formação de ácido láctico na fermentação.	40
Figura 14: Cálculo da formação da biomassa na fermentação.....	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. FERMENTAÇÃO	15
2.1 HISTÓRICO DA FERMENTAÇÃO	15
2.2 O PROÁLCOOL	17
2.2.1 O mercado sucroenergético	18
3. PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM USINAS DE AÇÚCAR E ÁLCOOL	19
3.1 LEVEDURAS	20
3.1.1 Obtenção do álcool pela levedura	21
4. BIORREATORES	24
4.1 BIORREATOR DESENVOLVIDO POR MARCO J. ZIMAK.....	24
5. FERMENTAÇÃO PARA O ENSINO MÉDIO	26
5.1 MATERIAIS E MÉTODOS	27
5.3 MÉTODOS	27
6. MATERIAIS E MÉTODOS	28
6.1 MATERIAIS	28
6.2 MÉTODOS.....	29
6.3 ANÁLISES	32
6.3.1 pH.....	33
6.3.2 Acidez sulfúrica	33
6.3.3 Acidez láctica	33
6.3.4 Teor alcoólico.....	33
6.3.5 Concentração de leveduras.....	34
6.3.6 Glicerol	34
6.3.7 Viabilidade celular	35
6.3.8 ART	35
6.3.9 Brix	36
7. RESULTADOS	37
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	41

9. REFERÊNCIAS	42
-----------------------------	-----------

1. INTRODUÇÃO

Os processos de fermentação já eram utilizados pelo homem a cerca de dez mil anos, muitas bebidas eram fabricadas pelos egípcios, germanos e israelitas. Embora as bebidas alcoólicas sejam diferentes em suas propriedades, como matéria prima, todas têm uma origem comum, derivam de um processo bioquímico chamado fermentação alcoólica (FERREIRA E MONTES, 1999).

A fermentação alcoólica tem como seu agente a levedura, *Saccharomyces cerevisiae*. Diversos fatores podem afetar a eficiência da conversão do açúcar em álcool, podendo ser fatores físicos como: temperatura e pressão osmótica; ou químicos: pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores, ou, microbiológicos: espécies, linhagem e concentração de leveduras em relação à matéria seca, além da contaminação bacteriana. Geralmente as quedas na eficiência fermentativa decorrem de uma alteração na estequiometria do processo, levando à formação de produtos secundários (glicerol e ácidos orgânicos) e de biomassa (AMORIM, 2005).

O etanol é o principal biocombustível de uso veicular no Brasil, sendo o Brasil, o maior produtor de cana-de-açúcar e o segundo em produção de etanol no mundo, atrás apenas do EUA (Ministério da Agricultura, 2015). A utilização do etanol como combustível possui diversas vantagens, dentre elas a menor dependência de combustíveis fósseis e a redução da poluição atmosférica (MUNHOZ, 2012). Segundo a União da Indústria de Cana de Açúcar a UNICA (2015) na safra 2014/2015, a produção brasileira de etanol foi de 29.394.000 m³.

As metas das unidades produtoras de açúcar e álcool é maximizar a produtividade e reduzir custos, juntamente com a melhoria da qualidade da matéria-prima e dos produtos finais.

Sendo assim para uma boa produção é necessário eficiência no processo, portanto o presente trabalho visa avaliar a eficiência da fermentação alcoólica, utilizando um biorreator de laboratório, que simula o processo fermentativo de forma bem próxima da realidade (controlando variáveis muito importantes como: temperatura, agitação, vazão, etc) e podendo mensurar sua eficiência com cálculos estequiométricos, além de

determinar os subprodutos (glicerol, ácido láctico, etc) que são muito importantes na qualidade do processo.

2. FERMENTAÇÃO

2.1 HISTÓRICO DA FERMENTAÇÃO

A fabricação do pão é uma técnica milenar, sabe-se que os povos da Mesopotâmia e Egito conheciam, há pelo menos 6.000 anos, os romanos conheciam várias técnicas para obter fermento de panificação. Cenas de panificação também foram encontradas em murais, nas ruínas de Menfis, há 3.000 anos a.C. Sabe-se que estes povos também, a cerca de 5.000 anos a.C. consumiam a cerveja, um produto decorrente da fermentação alcoólica de diversos cereais, que era de uso corrente naquela época e que perdura-se até os dias atuais. Durante a Idade Média, por exemplo, seu uso era recomendado ao lado de outras bebidas alcoólicas, em substituição à água potável contaminada (AMORIM, 2005).

O vinho já era fabricado e consumido no segundo milênio a.C. e surgiu da fermentação espontânea da uva, provavelmente de maneira acidental, a vinicultura experimentou grande período de esplendor no Egito antigo, quando as técnicas de produção foram melhoradas, com a introdução da prensagem das uvas. Os egípcios também iniciaram o comércio do produto, mas os fenícios que difundiram seu uso por toda região mediterrânea. Em 1600 – 1800 d.C. a Inglaterra dominou o comércio mundial e foi responsável pelo desenvolvimento da vinicultura europeia, seguido da França, Espanha e Portugal. Mas, na opinião de alguns autores a cerveja e o vinho não foram às as bebidas mais antigas e sim, o hidromel. O hidromel, que foi fabricado em várias épocas, era obtido pelo abandono de solução aquosa de mel silvestre, que fermentava após algum tempo. Os gregos chamavam de *melikaton*, os romanos de *acquamulsa* e os celtas de *chouchen* (CAMARGO; MAIA; RITSCHER, 2010).

Somente a partir do século XVII, começaram os primeiros avanços tecnológicos, nesta época as pessoas se tornaram mais curiosas com os fenômenos que ocorriam ao seu redor, mas pouco se sabia sobre o tema fermentação. As modificações inexplicáveis intrigavam os cientistas e filósofos, que se empenharam em descobri-las. O inglês Thomas Willis (1621 – 1675) teve primeira concepção filosófica da fermentação, onde esta representaria um caso particular de putrefação (MONDUCCI, 2010).

Segundo PELCZAR JR; REID; CHAN (1996) Antonie Van Leeuwenhoek foi o primeiro a relatar suas observações. Com suas lentes, examinou praticamente tudo, gotas de água da chuva, madeira, sementes, sangue dentre outras emulsões. Leeuwenhoek nasceu em 24 de outubro de 1632, em Delft (Holanda). Suas observações eram muito vastas. Ele observou micro-organismos, nomeando-os de “animáculos” e posteriormente descrevendo-os detalhadamente. Ao longo de sua vida construiu cerca de quinhentos microscópios, dos quais somente dez sobreviveram até os dias atuais. Então, a partir do século XVII, a observação dos minúsculos corpos vivos despertou grande polêmica: a origem desses seres vivos.

Mais ou menos na mesma época Van Helmont verificou que a fermentação alcoólica desprendia gás que Mac Bride demonstrou ser o anidrido carbônico. Sabe-se que em 1793, Lavoisier, após numerosos ensaios, demonstrou que os açúcares, através fermentação, eram desdobrados em álcool, gás carbônico e uma pequena quantidade de ácido não determinado. Em seguida Gay-Lussac, indicava que 180g de glicose geravam através da fermentação alcoólica 88 gramas de anidrido carbônico, 92 gramas de álcool. Pasteur chega a conclusão após longos experimentos que 100 partes de sacarose (equivalente a 105 de glicose), resultavam 51,10 partes de álcool etílico, 49,30 partes de anidrido carbônico, 3,40 partes de glicerina e 0,65 partes de ácido succínico, pela fermentação alcoólica, sendo então a base para o cálculo do rendimento teórico da fermentação. Surgiu assim a descrição da reação mostrada na figura 1 (Valsechi, 1960).

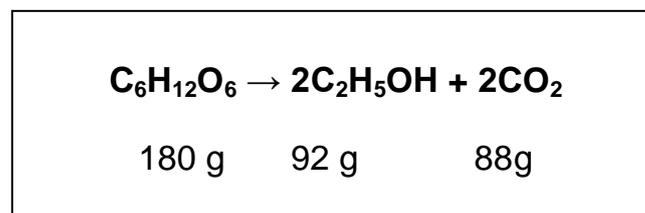


Figura 1: Equação da transformação química da glicose em etanol e gás carbônico

2.2 O PROÁLCOOL

A produção de álcool no Brasil sempre esteve atrelada a fatores climáticos, econômicos e políticos nacionais e internacionais. A partir da crise do petróleo em 1973/1974, foi criado em 1975, um programa nacional de produção de álcool, o PROÁLCOOL (RIBEIRO, 2008).

O PROÁLCOOL objetivava aumentar a produção de safras agroenergéticas e a capacidade industrial de transformação, para obtenção de álcool em substituição ao petróleo e seus derivados, em especial a gasolina, e a incrementação de seu uso no setor químico. No trecho abaixo, extraído do livro de Brandão (1985), é possível, ter uma ideia dos anseios nacionais em torno desse programa:

Com o Decreto nº 76,593, de 14 de novembro de 1975, que instituiu o Programa Nacional do Álcool (Proálcool), sob cuja égide o Brasil ingressaria na era nova do álcool motor, numa das mais audaciosas e singulares aventuras econômica-sociais já registradas no mundo e na história das civilizações ocidentais. Possivelmente, a nossa verdadeira Revolução Industrial.

Defensores do PROÁLCOOL ressaltaram a importância social, a criação de novos empregos, no campo e na cidade, estimulando o estabelecimento de novas empresas. Graças ao programa o setor sucroalcooleiro apresentou um grande desenvolvimento tecnológico, teve também os ganhos sociais e ambientais. Acredita-se que houve grande redução de gases poluentes na atmosfera, além de que, possibilitou que o Brasil fosse o primeiro no mundo a eliminar a adição do tóxico chumbo tetraetila à gasolina, com isso foi possível manter em expansão a frota automobilística (ANDRADE et al., 2009).

Mas em 1986 começa a decadência do Programa Nacional do Álcool, apesar de seu desempenho excepcional. Esta situação foi ocasionada a grave crise econômica que assolou o país, exigindo corte dos investimentos, e provocando a queda na produção nacional. O segundo motivo foi a inflação a partir de 1980, que se elevou muito, mas principalmente ao preço do petróleo no mercado internacional, vinham se declinando desde 1984. Logo, o PROÁLCOOL deixou de ser prioritário para o governo (AMORIM, 2005).

2.2.1 O mercado sucroenergético

O setor sucroenergético é um importante gerador de empregos e renda, enquanto um barril de álcool gera 3,4 empregos, um barril de petróleo emprega 0,06 pessoas. Além disso, produz energia (renovável), combustível (álcool) e eletricidade a partir do bagaço da cana, contribuindo para a não poluição do meio-ambiente (VALSECHI, 2015).

De acordo com a publicação (NEVES E TROMBIN, 2014) o faturamento estimado com a comercialização de tratores novos para o setor sucroenergético é US\$ 327,21 milhões, totalizando 5.090 unidades vendidas. A venda de caminhões pesados (categoria com peso bruto acima de 40 toneladas) novos para o setor sucroenergético foi estimada em 2.921 unidades, a um valor médio de US\$ 144.271, o que possibilitou o faturamento de US\$ 421,46 milhões no ano de 2014.

Estima-se que o setor tenha movimentado US\$ 1,34 bilhão com a aquisição de combustíveis, óleos lubrificantes e hidráulicos utilizados na produção, colheita e transporte de cana de açúcar. Segundo União da Indústria de Cana-De-Açúcar a ÚNICA (2015) a atividade canavieira no Brasil é responsável por um milhão de empregos diretos. O Estado de São Paulo reúne quatrocentos mil empregos diretos no setor.

3. PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM USINAS DE AÇÚCAR E ÁLCOOL

No Brasil há usinas produtoras de álcool, podendo haver particularidades no processo, porém todas seguem o procedimento básico, mostrado na figura 2.

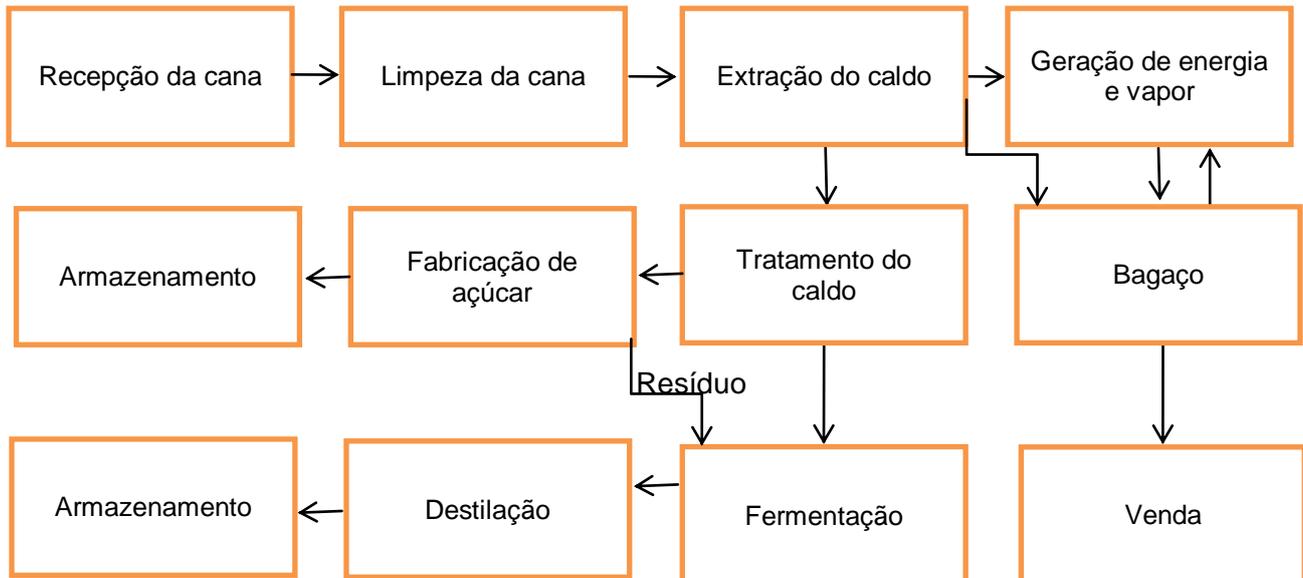


Figura 2: Fluxograma de processo de fabricação de açúcar e álcool.

O processo de produção do açúcar e do álcool se inicia com a chegada da cana na usina, onde ela é pesada, avaliado o seu teor de açúcar (ATR) em laboratório específico, seguindo assim para a descarga. A cana é descarregada em barracão ou diretamente na esteira metálica. Segue por essa esteira para o preparo da cana (picadores e desfibrador) e daí para a moenda. O caldo extraído na moenda é bombeado para o sistema de tratamento onde é sulfitado, caleado e decantado para a remoção das impurezas. Parte do caldo pode ser desviado ou não desse ponto para a composição do mosto que serve a fermentação (USHIMA et al., 1990).

O bagaço vai para as caldeiras onde serve como combustível para a geração de vapor que move as máquinas e os equipamentos e gera a energia elétrica consumida na usina e inclusive seu excedente pode ser comercializado. O caldo clarificado é enviado aos pré-evaporadores, em seguida aos evaporadores de onde se obtém o xarope que segue para o cozimento de onde sai a massa cozida (açúcar cristalizado coberto de mel). A massa

cozida vai para o cristalizador e deste para as centrífugas de onde saem o açúcar úmido e os méis. O açúcar é conduzido ao secador e posteriormente para o ensaque ou transporte a granel (MUNHOZ, 2012).

O mel final resultante da produção do açúcar é enviado à fermentação, onde diluído com água e ou caldo, forma o mosto que em contato com as leveduras na fermentação, resulta em vinho fermentado que contém o etanol e liberando gás carbônico (PAYNE, 1989).

O vinho segue para a centrifugação onde são separadas as leveduras do vinho, que por sua vez sofrem tratamento e retornam ao processo. O vinho delevurado, vai para a destilaria (figura 3) onde se extrai o etanol, que pode ser anidro, hidratado ou especial, sendo armazenado em reservatórios metálicos. A vinhaça, resíduo da fabricação do álcool é enviado à lavoura servindo como fertilizante (PAYNE, 1989).

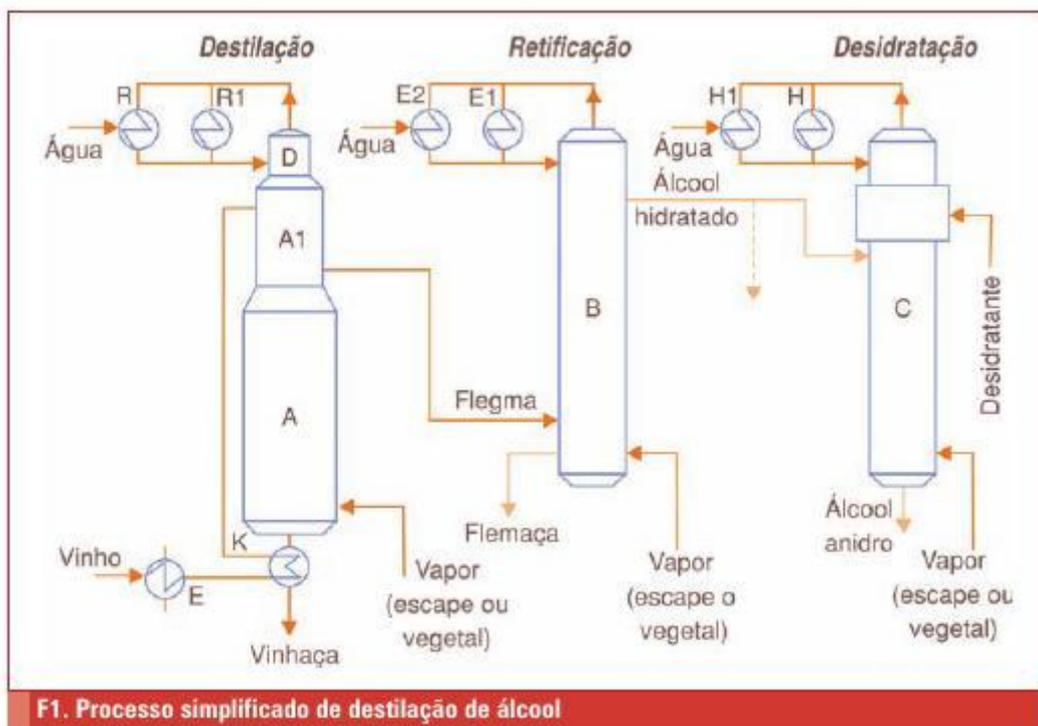


Figura 3: Esquema de uma destilaria (In: www.mecatronicaatual.com.br)

3.1 LEVEDURAS

As leveduras são seres unicelulares, biologicamente classificadas como fungos. Em geral são maiores que as bactérias, onde cada espécie tem sua forma característica e, por

serem células simples, seu crescimento é rápido formando colônias cremosas ou membranosas (rugosas), sua reprodução pode ser por esporulação, gemulação ou por fissão. São células sem clorofila e nutrem-se por absorção. Existem aproximadamente 350 espécies diferentes de leveduras, separadas cerca de 39 gêneros, mas a sistemática e taxonomia desses micro-organismos estão em constante alteração (PELCZAR JR; REID; CHAN, 1996).

A levedura (figura 4) é um organismo vivo, responsável pelo processo de fermentação alcoólica, ela utiliza o açúcar para obter a energia destinada a suas funções vitais e não para produzir etanol (AMORIM, 2005).



Figura 4: *Saccharomyces cerevisiae* (FERMENTEC, 2016)

3.1.1 Obtenção do álcool pela levedura

Segundo Lima (2001) o álcool pode ser fabricado por via química ou bioquímica (fermentativa). Por via química, no Brasil é efetuado a partir de hidrocarbonetos não saturados (eteno e etino), de gases de petróleo e de hulha. A via fermentativa, no entanto, é a mais usada no Brasil para obtenção do álcool etílico.

Sabe-se que a fermentação alcoólica se dá através de enzimas, contidas nos micro-organismos denominados fermentos ou leveduras alcoólicas, classificados como *Saccharomyces cerevisiae*. O prof. Ahmed M. El-Tabey Shehata da Universidade de Alexandria do Egito e o Dr. Rodolpho de Camargo do Instituto Zimotécnico da

Universidade de São Paulo, apresentaram em seu trabalho que pelo menos na região de Piracicaba o *S. cerevisiae* não é o agente exclusivo da fermentação. Graças ao desenvolvimento da Bioquímica, sabe-se que realmente, o que se pode observar, é um conjunto de diversos fermentos, podendo alguns aparecerem com mais ou menos frequência, exemplo: *Sacch. carlsbergensis*, *Torulopsisstellata*, etc.(Valsechi,1960).

De acordo com TORTORA; FUNKE; CASE (2012):

A fermentação alcoólica começa também com a glicólise de uma molécula de glicose para produzir duas moléculas de ácido pirúvico e duas moléculas de ATP. Na reação seguinte, as duas moléculas de ácido pirúvico são convertidas em duas moléculas de acetaldeído e duas moléculas de CO_2 . As duas moléculas de acetaldeído são reduzidas por duas moléculas de NADH para formar duas moléculas de etanol. Outra vez, a fermentação alcoólica é um processo de baixo rendimento energético porque a maioria da energia contida na molécula inicial de glicólise permanece no etanol, produto final. Como podemos ver na figura 5.

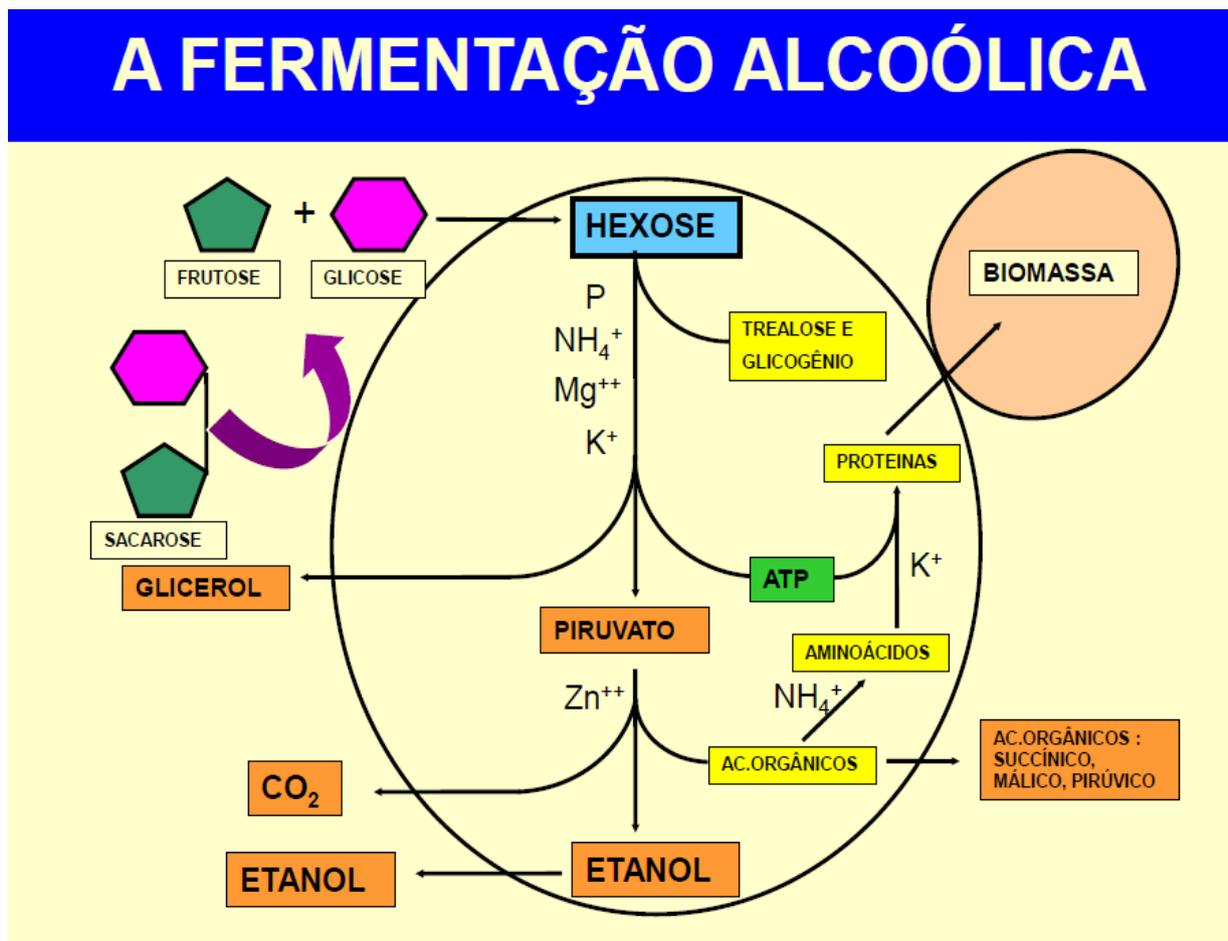


Figura 5: Rota bioquímica (IN: FERMENTEC, 2005)

3.1.2 Fatores que influenciam o rendimento fermentativo

Segundo ALCARDE (2000), o rendimento da fermentação é expresso em quantidade de produto formado (etanol) por unidade de açúcar consumido, sendo assim, todo açúcar que não é convertido em álcool e sim em outros produtos, faz com que ocorra uma diminuição deste rendimento. O caldo de cana-de-açúcar e os méis resultantes da fabricação do açúcar, contém quantidades variáveis de nutrientes orgânicos e inorgânicos, alta quantidade de água, pH e temperatura favoráveis que proporcionam o crescimento de uma grande flora microbiana. A ação contaminante das bactérias já era conhecida desde o tempo de Pasteur, mas não se conseguia medi-las. Tais micro-organismos provocam a floculação, consomem a sacarose e outros nutrientes destinados às leveduras e podem levar à perda do fermento.

Conforme Alves et al. (1994 apud ALCARDE et al., 2000) a produção de biomassa e de ácidos orgânicos pela levedura causa uma alteração no equilíbrio redox celular. O restabelecimento deste equilíbrio está acoplado à formação de glicerol, o composto secundário mais abundantemente excretado pela levedura, ele é tipicamente produzido pela levedura correlacionando inversamente com a eficiência fermentativa. O ácido láctico produzido nos processos fermentativos, embora podendo ser produto do metabolismo das leveduras, indica atividade dos contaminantes bacterianos, o mesmo ocorre com o ácido acético.

Pesquisas realizadas pelo Centro de Tecnologia Copersucar, na tentativa de mensurar o rendimento da fermentação, consideraram o seguinte fato: a levedura vive para se multiplicar, pois ela é um organismo vivo, que fabrica álcool para atender suas necessidades fisiológicas, ou seja, para sua sobrevivência. Portanto, o rendimento da fermentação nunca poderá chegar a 100 % (AMORIM, 2015).

4. BIORREATORES

Denominam-se “biorreatores”, os reatores químicos, bioquímicos ou biológicos nos quais ocorrem uma série de reações químicas catalisadas por “biocatalisadores” que podem ser enzimas ou células vivas (LIMA et al., 2001).

Segundo TORTORA; FUNKE; CASE (2012) biorreatores são recipientes para a fermentação industrial, que são projetados especialmente para que se tenha, controle de temperatura, de aeração e pH, etc., sendo que existem vários tipos e os mais utilizados são os de agitação contínua.

4.1 BIORREATOR DESENVOLVIDO POR MARCO J. ZIMAK

Marco J. Zimak, Supervisor de Laboratório e Produção de Etanol e Subprodutos na Usina São Luiz S/A em Ourinhos-SP, desenvolveu no ano de 2013 um biorreator de laboratório de baixo custo (figura 6), para simular o processo fermentativo e através dele, medir a eficiência da fermentação aplicando o princípio do cálculo estequiométrico.

O biorreator é construído sobre um chassi de aço inoxidável ANSI 304 que comporta todos os instrumentos e componentes eletromecânicos. No biorreator estão instalados dois controladores/indicadores de temperatura programáveis DLG mod. IM – 111, sendo que um deles tem a função de controlar a temperatura do banho e o outro, apenas indicar a temperatura interna do reator, um reator em vidro com tampa e orifícios para os acessórios, dois sensores de temperatura tipo PT-100, sendo um para o reator e outro para o banho, uma resistência de 500 W / 220 V, um agitador magnético para manter em suspensão o material em reação, uma bomba centrífuga com a finalidade de alimentar a trompa de vácuo e ao mesmo tempo, manter homogênea a água do banho, uma trompa de vácuo, uma proveta de vidro de 100 ml e uma bomba peristáltica de duplo canal.

O equipamento é dotado de interruptores elétricos (ON/OFF), sendo um para chave geral, um para a resistência e um para a bomba. O equipamento opera em 127 V.



Figura 6: Biorreator desenvolvido por Marco J. Zimak.

Assim como no processo industrial, o pé de cuba aplicado ao reator é uma suspensão de leveduras que contém uma determinada quantidade de etanol. No mosto que alimenta o biorreator, estão contidos os açúcares fermentescíveis que serão metabolizados pela levedura e resultarão numa massa de etanol no vinho formado ao final da fermentação. Através de técnicas analíticas, determina-se a massa de etanol que entra no sistema, a massa final de etanol no vinho fermentado e a quantidade de ART fornecido ao sistema. Pela estequiometria açúcar x etanol, podemos calcular o rendimento percentual teórico e prático da fermentação.

$$RFp = \frac{\text{Massa de etanol total no biorreator} - \text{massa de etanol inserido via pé}}{\text{Massa de etanol teórico em função do ART}}$$

RFp = Rendimento prático

5. FERMENTAÇÃO PARA O ENSINO MÉDIO

Nas escolas brasileiras ainda predomina um ensino tradicional, que tem como característica a abordagem do assunto transmitido pelo professor e juntamente com outras variáveis, como condições de trabalho, formação do docente etc., que colaboram para os baixos índices de aprendizagem. Algumas pesquisas sobre a educação básica brasileira revelam que esse modelo não atende as demandas necessárias para a formação do aluno. A associação dos conteúdos do cotidiano e conceitos desenvolvidos em sala de aula é um dos desafios no ensino de química. É necessário identificar situações da vivência dos alunos para cativar seu interesse e assimilação do assunto (FERREIRA E MONTES, 1999). Partindo daí o professor pode propor temáticas associados à vivência dos alunos fora da sala de aula. Sendo assim o tema fermentação pode ser um assunto discutido pelo professor em sala de aula, pois este tema faz parte do cotidiano (fabricação de pães, etc) de seus alunos.

O pão é um alimento muito antigo, povos da idade da pedra já faziam o pão cozinhando sobre uma pedra quente, os egípcios usavam o forno de barro para fazer o pão, no século XVII os franceses modernizaram a fabricação do pão, que virou uma mania mundial, o famoso pão francês, hoje existem diversos tipos de pães, baguete, ciro, pão de forma, pão de queijo etc. Todos os pães tem uma coisa em comum, são feitos de farinha, podendo ser de trigo, arroz, milho, cevada ou centeio, misturada com água, sal, gordura e fermento (CAMARGO et al., 2010). O fermento é um ingrediente fundamental, é formado por leveduras – fungos unicelulares da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, essa levedura é responsável por deixar a massa do pão e de outros produtos mais leve e macia, graças à liberação de gás carbônico gerado pela fermentação alcoólica. Na fermentação alcoólica ocorre a transformação da glicose e a produção de gás carbônico, sendo que é o gás carbônico retido na massa, faz com que ela se expanda, deixando-a mais volumosa (FERREIRA E MONTES, 1999).

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2 MATERIAIS

Microscópio

Béquer de 50 ml

Béquer de 100 ml

Câmara de Neubauer

Solução de Azul de Metileno 0,025 % + Citrato de Sódio 2%

Pipeta de 1 ml

Pipeta automática de 0 – 10 uL

5,0 gramas de fermento de padaria

5.3 MÉTODOS

Proposta de aula prática: observar a célula de levedura no microscópio.

Diluir 5 gramas de fermento de padaria em aproximadamente 100 ml de água em béquer de 100 ml. Pipetado 1 ml da amostra diluída em béquer de 50 ml, adicionar 1 ml da solução Citrato de Sódio (corante), transferido 10 uL para câmara de Neubauer. Levado ao microscópio e com a objetiva de 40 x e ocular de 10 x (aumentando 400 vezes) focalizado até a nítida visualização das células.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 MATERIAIS

Biorreator de laboratório (Marco J. Zimak).

Bomba peristáltica: Master Pump C/L, mod. 77120-42

Agitador magnético: Tecnal , mod. TE 080

Balança de precisão: Mettler – Toledo, mod. PB-4002

pHmetro: Digimed, mod. DM-22

Lactímetro: Roche, mod. Accutrend Plus

Refratômetro: Atago, mod. Smart-1

Redutec: Tecnal, mod. TE 0861

Densímetro digital: Anton Paar, mod. DM 4500 M

Microdestilador: Tecnal mod. TE 012

Microscópio: Nikon, mod. Eclipse E 200

Centrífuga de bancada: Químis, mod. Q 222 / TM2

Resistência elétrica: ResisWal, 220 V / 500 W

Provetas plásticas 500 ml ou 250 ml

Proveta em vidro com tampa 100 ml

Frascos para amostras 1.000 ml

6.2 MÉTODOS

A figura 7 nos mostra resumidamente a metodologia utilizada no biorreator, simulando as condições reais do processo industrial.

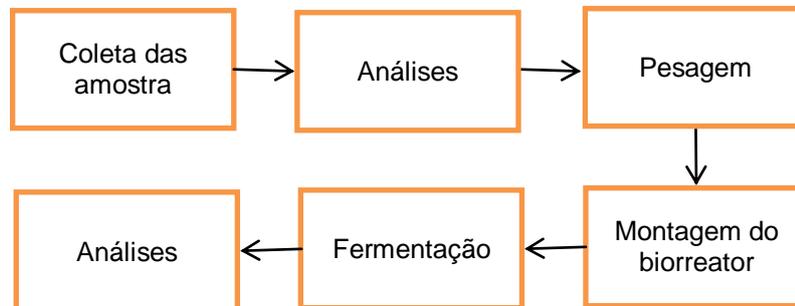


Figura 7: Fluxograma da metodologia do biorreator.

A operação do biorreator, as amostras utilizadas (pé de cuba e mosto), e as análises, foram realizadas no laboratório da Usina São Luiz em Ourinhos – SP.

A operação do biorreator começou com a coleta das amostras de pé de cuba e mosto do processo industrial, onde foram levadas ao laboratório e separadas alíquotas para as análises previstas.

Definiu-se a vazão, pesou-se o corpo do reator já com o agitador magnético e anotou-se o peso, em seguida foram pesados e anotados o peso e o volume das amostras (pé de cuba e mosto) em provetas graduadas (figura 8).



Figura 8: Pesagem das amostras e do corpo do reator.

Colocou-se a tampa no reator e levando-o ao banho-maria, onde ficou imerso o termômetro (para acompanhar a temperatura do banho-maria), bomba de circulação, tubo do selo hidráulico da bomba e uma resistência com ação controlada eletronicamente para aquecer o sistema.

No reator estava inserido o termômetro (para acompanhar a temperatura dentro do reator), a mangueira de CO₂ e as mangueiras de alimentação provenientes da bomba peristáltica em cuja outra extremidade, o tubo de sucção deveria esgotar as provetas com o pé de cuba e mosto. Inserido o tubo de captação de CO₂ em uma proveta de 100 ml contendo 90 ml de água destilada.

Ligou-se o agitador magnético (baixa velocidade), a bomba de circulação de água, a resistência e a bomba peristáltica (duplo canal), de forma que a transferência do pé de cuba e mosto ocorresse em aproximadamente 60 minutos. Verificaram-se todas as conexões para não haver perdas do CO₂ gerado na fermentação (figura 9).



Figura 9: Biorreator sendo alimentado.

Terminada a alimentação, retirou-se as mangueiras de alimentação e colocou uma rolha para vedar o orifício na tampa. No reator, foi deixado fermentar até a oitava hora com a temperatura programada. Após a oitava hora, desligou-se todo o equipamento e deixou para encerrar o ensaio no outro dia pela manhã (figura 10).



Figura 10: Fim da alimentação no reator.

No dia seguinte, retirou-se o corpo do equipamento, enxugou-se a parte externa, agitando com movimentos de rotação suavemente de forma que a amostra ficasse bem homogênea. Com cuidado inclinou-se o corpo, para que o condensado aderido à parede fosse integrado na amostra. Então foi pesado o corpo e anotou-se a massa medida em balança eletrônica. Transferiu-se a amostra de vinho para uma proveta graduada para medir o volume final. Completou-se também a proveta de captação do CO_2 com água destilada ao volume final de 100 ml (figura 11). Por fim, foram separadas as alíquotas para análises previstas.



Figura 11: Coletor de etanol por CO₂ e vinho bruto fermentado.

6.3 ANÁLISES

As análises que fazem parte do cálculo estequiométrico são: ART e teor de etanol e suas respectivas massas.

As análises de: pH, glicerol, viabilidade celular, ácido láctico, acidez sulfúrica e concentração de leveduras são análises complementares, para o acompanhamento do processo.

As análises que são realizadas no pé de cuba são: teor alcoólico, acidez sulfúrica, concentração de leveduras, pH, ácido láctico, viabilidade celular e glicerol.

As análises que são realizadas no mosto são: brix, ART, acidez sulfúrica, ácido láctico e pH.

As análises que são realizadas no vinho são: teor alcoólico, acidez sulfúrica, pH, glicerol, concentração de leveduras e ácido láctico.

Todas as análises realizadas foram realizadas segundo as metodologias do POP da Usina São Luiz, certificadas pelo laboratório Centro de Tecnologia Canavieira – CTC.

6.3.1 pH

O pH varia com a temperatura, com a presença de substância dissolvidas e com a solução. Imergido o eletrodo na amostra até que cobrisse o bulbo, tomando cuidado de manter o nível da amostra acima do nível do eletrólito contido no eletrodo. Então, foi realizado a leitura do pH.

6.3.2 Acidez sulfúrica

Titulou-se 50 ml da amostra em béquer, com eletrodo do pHmetro imergido na amostra, titulando com solução de hidróxido de sódio 0,2 N gota a gota e sob agitação até pH 8,7.

Cálculo:

$$\text{Acidez sulfúrica (gH}_2\text{SO}_4\text{/l)} = (V * 0,2) * 0,98 * F$$

Onde:

V = volume gasto de hidróxido de sódio 0,2 N(ml)

F = fator de correção do hidróxido de sódio 0,2N

0,98 = constante em função da normalidade do hidróxido de sódio

6.3.3 Acidez láctica

Foi realizado com o aparelho Lactímetro Roche, com resultados em mmol.

6.3.4 Teor alcoólico

Mediu-se 25 ml da amostra em balão volumétrico de 50 ml e destilado em microdestilador Kjeldahl, completando com água destilada, foi injetada a amostra destilada no densímetro digital eletrônico Anton Paar mod. DMA 4500. Anotando-se a leitura da densidade a 20°C.

Os resultados da massa específica e teor alcoólico a 20°C são fornecidos diretamente pelo equipamento (Kg/m^3) e o teor alcoólico em % m/m (°INPM) e % v/v (°GL).

6.3.5 Concentração de leveduras

Com a amostra homogeneizada, transferiu-se 10 ml em tubo cônico e centrifugou-se por 3 minutos a 3500 rpm (rotação por minuto). Faz-se leitura do volume de sólidos decantados no fundo do tubo.

Cálculos:

$$\text{Teor de levedura (\%)} = V * 10$$

Onde:

V= volume decantado

6.3.6 Glicerol

Foi realizado com *kit* enzimático de análises clínica marca Bio-Liquid, que contém um reagente de Trabalho e um padrão de glicerol.

Foi colocado 1 ml do reagente de trabalho em cada tubo de ensaio sendo, um tubo para o branco, um para o padrão e um para a amostra. Em seguida 10 μL do padrão no tubo do padrão, 10 μL da amostra no tubo da amostra, em seguida ficou em banho-maria por 5 minutos. Realizado a leitura em espectrofotômetro, 500 λ .

Cálculo:

$$(\text{g}/100 \text{ ml}): \text{Absorbância da amostra} / \text{Absorbância do padrão} * 0,0208$$

Onde:

0,0208 = constante do fabricante

6.3.7 Viabilidade celular

Pipetou-se 1 ml da amostra diluída em béquer de 50 ml, adicionou-se 1 ml da solução, transferindo-se 10 uL para câmara de Neubauer. Levado ao microscópio e com a objetiva de 40x e ocular de 10 x (aumentando 400 vezes) foi focalizado até a nítida visualização das células. Realizada a contagem da amostra em 5 dos 20 campos existentes na câmara.

Cálculo:

$$\text{Células vivas (\%)} = \text{CV/TC} * 100$$

Onde:

CV: células vivas

TC: total de células

6.3.8 ART

Pesado 50 gramas do mosto em balão de 200 ml e completado com água destilada, depois transferido 10 ml para balão de 200 ml. Levar em banho-maria até atingir 65 °C.

Adicionado 10 ml de ácido clorídrico 6,34 N, deixado em repouso por 30 minutos, depois foi neutralizado com hidróxido de sódio 20 %, 3 gotas do indicador fenolftaleína em seguida 4 ml de EDTA 4 % e completado com água destilada. Enchido a bureta, adicionado no *redutec* 10 ml de licor de Felling. Depois de ter entrado em ebulição, foi adicionado 3 gotas de azul de metileno, titulando novamente até que voltasse a cor vermelho tijolo. Anotado volume gasto.

$$\text{Cálculo: } (397,15 / \text{volume gasto} * \text{fator do Felling}) + 0,484$$

Onde:

0,484 = constante em relação a equação da reta

397,15 = fator de correção da equivalência açúcar/cobre

6.3.9 Brix

Realizado através do refratômetro eletrônico marca Atago com resolução de 0,1 °Brix

7. RESULTADOS E DISCUÇÃO

Foram realizados três ensaios. O ensaio 1 no mês de maio, o ensaio 2 no mês de junho e o ensaio 3 no mês de julho. O rendimento da fermentação foi obtido a partir equação apresentada na figura 12.

$$\text{Red. Fer. \%} = \frac{[(\text{Etanol do Vinho} * \text{massa (g)/100}) + (\text{Etanol Recup. CO}_2) - (\text{Etanol pé} * \text{massa (g)/100})]}{[(\text{ART Mosto} * 0,5111 * \text{massa Mosto})/100]} * 100$$

Figura 12: Cálculo do rendimento da fermentação por estequiometria.

Onde: 0,5111 representa uma constante.

Na tabela 1 estão indicados os resultados obtidos nas análises das variáveis que fazem parte do cálculo estequiométrico e os resultados do rendimento da fermentação realizada no biorreator. Na última linha da tabela está indicado o rendimento da fermentação industrial, obtido através do software que a usina utiliza diariamente para verificar o rendimento da fermentação.

Amostra	Análises	Unid.	Mai	Junho	Julho
Pé de cuba	Massa	g	254,3	254	254,4
	Teor alcoólico	% p/p	2,82	1,86	3,22
Mosto	Massa	g	274,9	277,1	277,5
	ART	p/p	19,15	20,29	21,71
Vinho	Massa	g	499,5	503,4	497,3
	Teor alcoólico	% p/p	6,22	5,68	7,04
Etanol Recuperado CO₂	Teor alcoólico	% p/p	1,4	0,88	1,83
	Rendimento Via biorretor	% p/p	94,02	86,1	93,05
	Rendimento Via software	% p/p	91,09	93,45	93,49

Tabela 1: Variáveis do rendimento fermentativo para o cálculo estequiométrico

A partir destes dados, observa-se que os valores obtidos no processo realizado em biorreator foram bem próximos dos valores obtidos pelo software que é utilizado no processo industrial. Pode-se então comprovar que ambos podem ser utilizados para verificar o rendimento do processo. Além disto, o uso de biorreator pode colaborar para testes quando houver mudança na cepa do micro-organismo e variação dos meios que compõe o pé de cuba.

No dia a dia do processo, o software indica a porcentagem de rendimento mesmo quando não há produção, não mostrando a realidade do processo.

A diferença dos valores do rendimento obtido para o mês de junho deve-se provavelmente ao aumento dos subprodutos gerados. Na fermentação via biorreator foram realizadas análises para verificar os subprodutos gerados (tabela 2).

Segundo STEINLE (2013) O rendimento teórico de etanol por grama de glicose consumida é 0,511 gramas, sendo que este valor considerado 100% quando o substrato for glicose. Como na condição de fermentação industrial brasileira, o rendimento é em média 91%, isto corresponde a 0,465 gramas de etanol por grama de “Açúcar Redutor Total” (ART) consumido.

Amostra	Análise	Unid.	Maió	Junho	Julho
Pé de Cuba	pH	-	2,32	2,78	2,28
	Glicerol	% p/p	0,09	0,09	0,12
	Concentração de leveduras	%	32	36	32
	Viabilidade celular	%	67	80	75
	Acidez láctica	ppm	108	297	639
Mosto	Brix	°Brix	24,1	25	27,1
	Acidez sulfúrica	g/l	1,27	1,37	2,06
	pH	-	6,14	6,1	6,06
	Acidez láctica	ppm	441	630	378
Vinho	Acidez sulfúrica	g/l	4,02	3,33	4,12
	pH	-	4,51	4,8	4,67
	Glicerol	% p/p	0,39	0,49	0,37
	Concentração de leveduras	%	19	22	18
	Viabilidade celular	%	86	72	81
	Acidez láctica	ppm	423	594	1278

Tabela 2: Análises complementares.

Foi observado na tabela 1 que no mês de junho o rendimento obtido via biorreator foi menor que nos demais meses. Nota-se, na tabela 2, que neste mesmo mês houve um aumento na produção de glicerol.

Segundo PASCHOALINI E ALCARDE (2009) alguns parâmetros contribuem para uma maior eficiência (rendimento) do processo da fermentação alcoólica, como o °Brix, temperatura, pH, contaminação bacteriana, açúcares residuais. A avaliação do rendimento fermentativo pode ser calculada por rendimento convencional (balanço de massa).

Na indústria, foram constatados diversos fatores que afetam a levedura: 8% a 15% do açúcar processado são desviados para a formação de glicerol, ácidos e biomassa (crescimento das leveduras), além do álcool e gás carbônico (AMORIM, 2005).

Conforme MONTEIRO E CARVALHO (2012), no processo fermentativo o pH do meio afeta a formação do produto, o pH pode ser usado para selecionar preferencialmente as leveduras sobre as bactérias e diminuir a suscetibilidade à contaminação bacteriana. No pH próximo de 3,0, a fermentação é bem menos sujeita à contaminação bacteriana. Podemos observar que o pH do pé de cuba trabalhado no biorreator estava próximo de 3,0 nos ensaios, sendo esta faixa adequada para a fermentação.

Para STEINLE (2013) a contaminação bacteriana associa-se a formação de ácido láctico, considera-se que na indústria esta é, a principal contaminação presente na fermentação alcoólica.

Na tabela 3 estão apresentados os valores de ácido láctico obtido e biomassa produzida. Para o cálculo de biomassa foram considerados os valores contidos no pé de cuba, no mosto e a formada no vinho.

Ensaio	Biomassa produzida (%)	Ácido láctico produzido (ppm)
Maio	1,17	63
Junho	1,21	49
Julho	1,10	373

Tabela 3 : Biomassa e ácido láctico produzido na fermentação.

As figuras 13 e 14 mostram o cálculo utilizado para obtenção dos valores de ácido láctico e biomassa produzidos na fermentação do biorreator.

$$\text{Delta } \acute{\text{A}}\text{c. L\acute{a}}\text{tico (ppm)} = \frac{[(\acute{\text{A}}\text{c.L.Vinho} * \text{M.Vinho})] - [(\acute{\text{A}}\text{c.L.P\acute{e}} * \text{M.P\acute{e}}) + (\acute{\text{A}}\text{c.L.Mosto} * \text{M.Mosto})]}{1000}$$

Figura 13: C\acute{a}lculo da forma\c{c}\~{o} de \acute{a}cido l\acute{a}tico na fermenta\c{c}\~{o}.

Onde: \acute{A}c.L = \acute{A}cido l\acute{a}tico e M. = Massa (g)

$$\text{C\acute{a}lculo da Biomassa gerada (\%)} = \frac{[(\text{Concentra\c{c}\~{o} de leveduras no vinho (\%)} * \text{Massa (g) do vinho} * 0,3 / 100) - (\text{Concentra\c{c}\~{o} de leveduras no P\acute{e} (\%)} * \text{Massa (g) do P\acute{e}} * 0,3 / 100)]}{100}$$

Figura 14: C\acute{a}lculo da forma\c{c}\~{o} da biomassa na fermenta\c{c}\~{o}.

Onde: 0,3 representa uma constante.

Para STEINLE (2013) os a\c{c}\u00f7\c{u}ares redutores totais (ART) representam todos os a\c{c}\u00f7\c{u}ares fermentesc\i{v}eis da cana na forma de redutores ou a\c{c}\u00f7\c{u}ar invertido. O teor de ART pode ser determinado analiticamente por oxirredutometria, colorimetria ou cromatografia, ap\o{s} a invers\~{a}o da sacarose. O conhecimento do teor de ART \u00e9 importante para a avalia\c{c}\~{a}o da qualidade da mat\acute{e}ria-prima, principalmente \u00e0 destinada a produ\c{c}\~{a}o de etanol.

Conforme RIBEIRO E REIS (2009), as temperaturas \u00f3timas para a produ\c{c}\~{a}o industrial de etanol situam-se na faixa de 26 a 35°C. No biorreator tamb\~{e}m foi poss\i{v}el controlar a temperatura da fermenta\c{c}\~{a}o atrav\~{e}s de term\~{o}metros e controladores de temperatura.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos estudos realizados, foi possível concluir que o processo de fermentação alcoólica, mesmo sendo muito complexo, pode ser simulado com o uso de biorreator. A fermentação é um processo bioquímico que para se ter sucesso na obtenção do produto desejado precisa-se de qualidade no processo, estando esta qualidade relacionada ao controle da concentração de açúcar, temperatura e pH que são altamente impactantes, pois podem causar um ambiente estressante para as leveduras, influenciando negativamente o rendimento fermentativo. Níveis elevados de contaminação bacteriana e ácidos produzidos pelas bactérias também afetam a conversão do açúcar em etanol.

Na tentativa de se obter o rendimento fermentativo o biorreator se mostrou uma técnica aplicável, pois os resultados foram próximos dos obtidos pelo software fornecido pela usina. Foi possível também verificar os subprodutos que estão sendo formados na fermentação.

REFERÊNCIAS

ALCARDE, André Ricardo. **Efeito da radiação gama em alguns parâmetros microbiológicos e bioquímicos da fermentação alcoólica.** Tese de Doutorado. USP – Campus em Piracicaba, São Paulo, 2000.

AMORIM, Henrique Vianna de. **Fermentação Alcoólica Ciência e Tecnologia.** Fermentec, 2005.

ANDRADE, Ednilton Tavares de; CARVALHO, Sergio Roberto Garcia de; SOUZA, Lucas Fernandes de. Programa do Proálcool e o etanol no Brasil. **Engrevista.** V11, n.2, dezembro, 2009, p. 127 – 136.

BRANDÃO, A. **Cana-de-açúcar: álcool e açúcar na história e no desenvolvimento social do Brasil.** Brasília: Horizonte – INL, 1985.

CAMARGO, Umberto Almeida; MAIA, João Dimas Garcia; RITSCHER, Patrícia. **Embrapa Uva e Vinho – novas cultivares brasileiras.** Embrapa, 2010.

FERREIRA, Edilene Cristina; MONTES, Ronaldo. A química da produção de bebidas alcoólicas. **Química Nova na Escola.** n.10, novembro, 1999.

LIMA, Urgel de Almeida; AQUARRONE, Eugênio; BORZANI, Walter; SCHMIDELL, Willisaldo; coordenadores. **BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL**, volume III, 1ª ed. Editora Edgard Blucher LTDA, 2001.

Ministério da Agricultura. **Sapcana - Sistema de Acompanhamento de Produção Canaveira.** Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso em: 26 jul. 2015.

MONDUCCI, David Vieira. **Thomas Willis e o De Anima Brutorum: uma análise da concepção de alma humana e animal.** 2010. 105p. Dissertação (mestrado) – Universidade São Judas Tadeu, São Paulo, 2010.

MONTEIRO, Gleidson; CARVALHO, Romilda. A influência do teor de acidez e da contaminação bacteriana no rendimento fermentativo industrial para a produção de etanol. **Fazu em Revista.** n.8. 2012.

MUNHOZ, Vanessa Vieira. **Processo industrial de uma usina sucro-alcooleira.** 2012. 50p. Relatório de estágio – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 2012.

NEVES, Marcos Fara; TROMBIN, Vinicius Gustavo. **A dimensão do setor sucroenergético – Mapeamento e Quantificação da safra 2013/2014.** ed.1. Ribeirão Preto. 2014.

PACHECO, Thályta Fraga. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente.** 2010.107p. Dissertação de Pós-Graduação – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2010.

PASCHOLINI, Glauce; ALCARDE, Valmir. Estudo do processo fermentativo de usina sucroalcooleira e proposta para sua otimização. **Revista Ciência & Tecnologia.** v.16, n.32, 2009, p. 59 – 68.

PAYNE, John Howard. **Operações unitárias na produção de açúcar de cana.** Tradução: Florenal Zarpelon. São Paulo: Editora Nobel.1989.

PELCZAR JR, Michael Joseph; CHAN, E. C. S.; KRIEG, Noel R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**, volume I, 2ª ed. Tradução de Sueli Fumie Yamada, Tania Ueda Nakamura, Benedito Prado Dias Filho, São Paulo: Editora Makron books, 1996.

PELCZAR Michael Joseph; REID, Roger; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**, volume II, Tradução de Manuel Adolpho May Pereira, Editora MCGRAW-HILL DO BRASIL, 1981.

RIBEIRO, Eloizio; Reis, Hávala. Influencia conjunta do pH, temperatura e concentração de sulfito em fermentação alcoólica de mosto de sacarose. **IX Encontro interno & XIII Seminário de Iniciação Científica**. 2009.

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, 2008. p. 48-57.

STEINLE, Luis Antonio. **Fatores que interferem na fermentação alcoólica**. Pós-graduação. Universidade Federal de São Carlos. 2013.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L.. **Microbiologia**, 10. ed. Tradução de Aristóbolo Mendes da Silva. Porto Alegre. Editora Artmed, 2012.

União da Indústria de Cana. **Mapa da Produção**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/mapa-da-producao>>. Acesso em: 26 jul. 2015.

VALSECHI, Octávio Antonio. Microbiologia no setor sucroenergético. In: Curso de monitoramento teórico e pratico da fermentação etanólica, 10, 2015. Araras, Brasil. **Resumos**. Araras, 2015.

VALSECHI, Octávio. **Aguardente de cana de açúcar**. Piracicaba. 1960.