



RELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO MOSTO E A EFICIÊNCIA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA POR SUBPRODUTOS EM PROCESSO CONTÍNUO¹

Míriam Roberta Henrique² & Waldemar Gastoni Venturini Filho³

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo avaliar a relação entre a concentração dos compostos fenólicos do mosto e a eficiência da fermentação alcoólica por subprodutos (glicerol, acidez, formação de biomassa) em processo contínuo, durante a safra 2011/2012, na Usina São Manoel, município de São Manoel-SP. Esta unidade iniciou a safra com a levedura selecionada CAT-1, sendo que durante a safra as cepas nativas contaminaram o processo fermentativo e a cepa CAT-1 foi eliminada do mesmo. A pesquisa foi desenvolvida como um estudo de caso na planta de fermentação. As análises de concentração de compostos fenólicos do mosto foram realizadas através do método Folin Ciocauteau com corante azul de metileno, enquanto a eficiência da fermentação foi calculada através de subprodutos gerados durante o processo de fermentação alcoólica. A análise estatística foi feita por meio do coeficiente de correlação de *Pearson* e sua significância através do teste *t*. Concluiu-se que os compostos fenólicos contidos no mosto não se relacionam com a eficiência da fermentação por subprodutos em processo fermentativo contínuo industrial.

PALAVRAS-CHAVE: Eficiência de fermentação, compostos fenólicos, levedura alcoólica.

RELATIONSHIP BETWEEN PHENOLIC COMPOUNDS AND ALCOHOLIC FERMENTATION EFFICIENCY OF SUGARCANE BYPRODUCTS

ABSTRACT: The objective of this work was to evaluate the relationship between phenolic compounds and alcoholic fermentation efficiency. The yield of sugarcane byproducts (glycerol, acidity, and biomass) was determined in a continuous process at SaoManoel Sugarcane Mill, (Sao Paulo, Brazil) during the 2011/2012 harvest period. The *Saccharomyces cerevisiae* strain used as inoculum was the CAT-1. During the harvest, the endogenous yeast outcompeted the selected strain, hence eliminating it from the process. This research consists of a case of study on the ethanol production facility. FolinCiocauteau and methylene blue method was used to assess phenolic compounds. The efficiency of the byproducts generated during the fermentation process was calculated. Statistics analyses were carried out using *Pearson* correlation and its significance, by the *t*-test. We concluded that the phenolic compounds within the must could not be correlated to the byproducts' fermentation efficiency calculated during a continuous fermentation process.

KEYWORDS: Fermentation efficiency, phenolic compounds, alcoholic yeast.

¹ Parte da dissertação de mestrado do 1º autor intitulada: Efeitos da concentração dos compostos fenólicos do mosto na fermentação alcoólica.

² Aluna do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Energia FCA/UNESP – Botucatu/SP – Brasil, bióloga. E-mail: miriamhenrique@gmail.com

³ Orientador e docente do Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial, FCA/UNESP – Botucatu/SP – Brasil. E-mail: venturini@fca.unesp.br

1 INTRODUÇÃO

O processo de fermentação contínua tornou-se popular no Brasil principalmente devido ao aperfeiçoamento das tecnologias de resfriamento e agitação do vinho em dornas de grande volume, com manutenção estável da temperatura. Nesse processo, as células de leveduras são recicladas e novamente utilizadas em fermentações consecutivas durante toda a safra canavieira (FERNANDES, 2001).

Nos processos contínuos de fermentação alcoólica, a eficiência pode ser calculada percentualmente com base no etanol recuperado em relação ao açúcar que entrou no processo. Este parâmetro mede com maior fidelidade o desempenho do setor industrial (FERNANDES, 2001).

A eficiência da fermentação por subprodutos é medida de acordo com os subprodutos gerados no processo fermentativo (glicerol, acidez, formação de biomassa) para aplicação em sistemas de fermentação contínua ou descontínua. Fornece a estimativa da eficiência de fermentação e depende da precisão das medidas analíticas necessárias para os cálculos (FERNANDES, 2011).

No processo de fermentação há fatores físicos, químicos e biológicos que podem interferir na eficiência fermentativa. Compostos químicos presentes no mosto, dependendo de suas concentrações, podem inibir o processo da fermentação alcoólica das leveduras (TOSETTO, 2008).

Entre os compostos que merecem especial destaque, como inibidores das leveduras nos processos de fermentação alcoólica, estão os ácidos orgânicos e os compostos fenólicos. Na literatura há vários trabalhos que descrevem os efeitos danosos de compostos fenólicos sobre uma população microbiana, estando incluídas no grupo suscetível as células de levedura (BORZANI; FALCONE, 1960; O'CONNOR; RUBINO, 1991; MARTIN; JONSSON, 2003). Alguns destes compostos estão presentes no caldo da cana como descrito por LEITE (2000). Dentre os compostos citados estão o ácido gálico, salicílico, cafeico, ferúlico, sináptico, vanílico, entre outros.

Garcia et al (2010) ao avaliar o açúcar redutor residual total (ARRT) em vinho, observaram que os compostos fenólicos exerceram um efeito negativo sobre as leveduras, prejudicando sua capacidade de usar os açúcares disponíveis no ambiente, causando uma menor eficiência da fermentação. Observaram também que o caldo da cana-de-açúcar com danos causados por pragas, apresentou níveis mais elevados de contaminantes e de compostos fenólicos que prejudicam o processo de fermentação.

Os compostos fenólicos consistem basicamente de um anel de benzeno, ao qual se ligam grupos hidroxila, carboxila e metoxila. Uma grande variedade de

compostos fenólicos, como as cumarinas, taninos, ligninas e flavonoides são considerados fenóis vegetais (BOVI, 1997).

Vários são os trabalhos realizados que visam determinar a forma de ação dos compostos fenólicos sobre os microrganismos, principalmente em produtos desinfetantes (O'CONNOR; RUBINO, 1991).

Palakovic; Handriková; Kosik, (1992) constataram que os compostos fenólicos (fenol, guaiacol e ácido vanílico) são inibidores do processo de fermentação alcoólica, atuando sobre a enzima invertase da levedura.

Amorim, Basso, Alves (1996) relataram que o estresse nas leveduras durante os ciclos de fermentação pode ser causado pela presença de biomoléculas que inibem o processo fermentativo, como os compostos fenólicos e ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação. A presença destes inibidores no meio de fermentação é indesejável e podem se acumular nas células de leveduras durante os ciclos, causando redução na sua viabilidade e diminuindo eficiência industrial. Este trabalho teve como objetivo avaliar a relação entre a concentração dos compostos fenólicos do mosto e a eficiência da fermentação alcoólica por subproduto em processo contínuo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Descrição Do Processo Industrial De Fermentação

O processo de produção de etanol na Usina São Manoel é contínuo, sendo que o volume útil total dos reatores soma 2.800 m³. A capacidade de produção diária é de 1.200 m³ de etanol hidratado e 500 m³ etanol anidro. A planta de fermentação é composta por três linhas de quatro fermentadores (total de 12) e uma única dorna final. Após o término da fermentação, o vinho passa por centrífugas da marca Alfa Laval, modelo FESX 512-S-34-60 com rotação de eixo de 1.700 a 1800 rpm para separação do creme de levedura. O vinho delevedurado (sem as leveduras) segue para a destilação e o creme de levedura para tratamento do fermento. Na safra 2011/2012, a Usina São Manoel adotou o processo de recentrifugação, em que o creme de levedura obtido da centrifugação é diluído com água acidulada (o pH do creme é de aproximadamente 3,0) e novamente centrifugado, para obter um novo creme que será tratado (água e ácido sulfúrico) mantendo um pH entre 2,1 a 2,3 e recirculado no processo fermentativo. Durante a centrifugação ocorre a sangria de fermento, que segue para a fábrica de levedura seca (Figura 1).

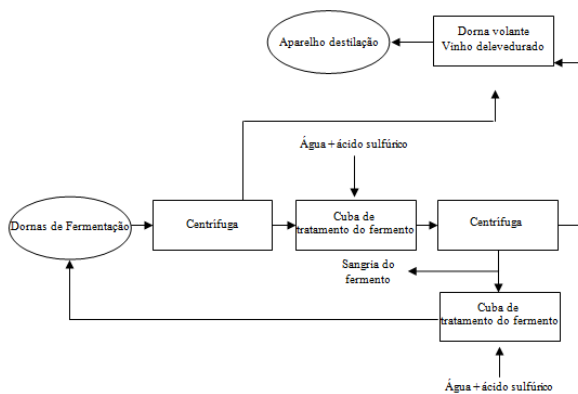


Figura 1 - Fluxograma do processo de recirculação do fermento na Usina São Manoel.

Planejamento Experimental E Análise Estatística

O trabalho foi desenvolvido como um estudo de caso, realizado na Usina São Manoel, município de São Manoel, estado de São Paulo, durante a safra 2011/2012. Os resultados das análises da concentração de compostos fenólicos do mosto foram confrontados com a eficiência da fermentação no mesmo período.

As amostragens de mosto, vinho e fermento foram feitas quando a usina estava em plena operação. Quando das paradas da indústria por conta das chuvas, as amostragens foram interrompidas e reiniciadas após três dias do reinício da moagem.

A relação entre as variáveis estudadas foi avaliada pelo coeficiente de correlação de *Pearson* e sua significância através do teste *t* ao nível de 5% de probabilidade (VIEIRA, 2006).

Análises Químicas E Cálculo Da Eficiência Fermentativa Por Subprodutos

2.3.1 Compostos fenólicos

Amostras de mosto foram coletadas de forma pontual a cada 4 horas (6/dia), misturadas e congeladas à temperatura de -3°C. Para a análise de compostos fenólicos, a amostra composta foi descongelada, em banho de água corrente (temperatura ambiente) e submetida à análise pelo método de Folin-Ciocalteu. A amostra foi diluída convenientemente, adicionada do reagente de Folin-Ciocalteu e neutralizado com solução de hidróxido de sódio. Após tempo definido, fez-se a medida espectrofotométrica da amostra (absorbância à 650 nm em célula de 10 mm). O espectrofotômetro utilizado foi da Marca Hach, modelo DR 5000. Para a quantificação dos compostos fenólicos, fez-se uso de curva padrão com o ácido cafeico (CLARKE; BLANCO; GODSHALL, 1985).

2.3.2 Cálculo da eficiência da fermentação por subprodutos (FERNANDES, 2011)

A eficiência da fermentação por subproduto foi calculada por meio da equação 1 e pelas equações auxiliares de 2-5.

$$\frac{100}{1 + (1,19 \cdot K_1) + (0,5 \cdot K_g) + (0,51 \cdot K_{ac}) + (0,51 \cdot K_{arrt})} \quad (1)$$

$$K_1 = \frac{LevDV \cdot 0,33}{GrauVVC \cdot 0,7893} \quad (2)$$

$$K_{arrt} = \frac{ARRT}{GrauVVC \cdot 0,7893} \quad (3)$$

$$K_g = \frac{Glicerol}{GrauVVC \cdot 0,7893} \quad (4)$$

$$K_{ac} = \frac{AcVDF - AcFT \left(\frac{LevVC}{LevFT} \right) - AcM \left(1 - \frac{LevVC}{LevFT} \right)}{1,837 \cdot 789,3 \left(\frac{GrauVVC}{100} \right) - \left(\frac{LevVC}{LevFT} \right) \left(\frac{GrauVFT}{100} \right)} \quad (5)$$

Aonde:

K_1 - perdas percentuais devido ao fermento produzido:

K_{arrt} - Perdas devidas aos açúcares redutores residuais totais

K_g - Teor de glicerol no vinho delevedurado

K_{ac} - Acidez produzida

LevDV - Porcentagem de fermento vinho delevedurado.

GrauVVC - Teor alcoólico vinho delevedurado (% v/v).

Glicerol - Teor de Glicerol vinho delevedurado (%).

AcVDF - Acidez sulfúrica vinho dorna final (g/L).

AcFT - Acidez sulfúrica fermento tratado (g/L).

LevVC - Porcentagem de fermento vinho delevedurado (%).

LevFT - Porcentagem de fermento tratado (%).

AcM - Acidez sulfúrica do mosto (g/L).

GrauVFT - Teor alcoólico fermento tratado (% v/v).

ARRT - Açúcares redutores residuais totais (%).

2.4 Análises Dos Subprodutos Para Cálculo Da Eficiência Da Fermentação

2.4.1 Porcentagem de fermento do vinho delevedurado e do creme de levedura

As amostras de vinho delevedurado e creme de levedura foram coletadas de forma pontual a cada 4 e 8 horas, respectivamente.

A porcentagem de fermento nas amostras foi medida através da centrifugação de 10 mL da amostra em um tubo graduado de 10 mL com fundo côncavo em uma centrífuga de bancada (Metroterm, modelo MTD - Plus) com rotação de 3.500 rpm por 3 min. Ao final do tempo, observou-se o volume do precipitado no tubo graduado e

multiplicou-se por 10. O resultado foi expresso em % (CTC, 2011).

2.4.2 Teor alcoólico do vinho delevedurado e do creme de levedura

As amostras de vinho delevedurado e as de creme de levedura foram coletados de forma pontual sendo a primeira a cada 4 horas e a segunda a cada 8 horas. Em seguida foram destiladas em microdestilador de álcool (Tecnal modelo TE-012) e a leitura do teor alcoólico do destilado feita em densímetro digital (Anton Paar – modelo DMA 4500), sendo o resultado expresso em % (v/v) (CTC, 2011).

2.4.3 ARRT do vinho delevedurado

O teor de ARRT no vinho delevedurado foi mensurado pelo método de Lane & Eynon e titulação com solução de Fehling A e B. O resultado foi expresso em porcentagem (CTC, 2011). Os açúcares redutores residuais totais (ARRT) ou açúcares redutores totais (ART) reduzem os sais de cobre II, em meio alcalino a um precipitado vermelho de óxido de cobre I. No método de Lane & Eynon, um volume de 10 mL da solução de Fehling é titulada com a solução açucarada até reduzir todo o cobre, tendo como indicador do ponto final o azul de metileno.

2.4.4 Glicerol do vinho delevedurado

A concentração de glicerol foi determinada pelo método químico, empregando espectrofotometria, cuja absorbância é medida a 410 nm. Resultado foi expresso em % (CTC, 2011).

2.4.5 Acidez sulfúrica do mosto, do vinho levedurado e do fermento tratado

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra a sucessão de cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* no mosto em fermentação, durante a safra 2011/2012, na Usina São Manoel. Observa-se que nos dois primeiros meses de safra (abril e maio), a cepa CAT-1 representou 100% da população, não havendo contaminação por leveduras nativas. Nos meses de junho e julho, a cepa CAT-1 (60%) foi contaminada por quatro leveduras nativas (40%), iniciando o processo de sua eliminação. Nos três últimos meses de safra (agosto, setembro e outubro), a cepa CAT-1 foi eliminada dos fermentadores, restando apenas às leveduras nativas. Andrietta et al. (2011) também observaram substituição da população de leveduras no processo fermentativo ao monitorarem a safra de uma usina sucroalcooleira através de cariotipagem.

A biodiversidade de leveduras encontradas em ambientes de destilaria poderia ser uma importante fonte de

tensões. Isto porque durante a reciclagem de células de levedura, a pressão seletiva (evolução adaptativa) é aplicada sobre as células, conduzindo a cepa com maior tolerância para as condições de estresse de fermentação industrial a predominar (BASSO et al. 2008).

Tabela 1 - Sucessão de população de levedura alcoólica durante processo fermentativo, safra 2011/2012, na Usina São Manoel.

Cepas	Data amostragem do vinho dorna final						
	Resultados em %						
	14	09	15	07	09	09	24
	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out
CAT1 sem perfil flocculação	100	100	65	61	-	-	-
Nativa (Biotipo A) fortemente flocculante	-	-	13	-	-	-	-
Nativa (Biotipo B) fortemente flocculante	-	-	13	-	-	-	-
Nativa (Biotipo C) levemente flocculante	-	-	9	2	93	55	8
Nativa (Biotipo D) levemente flocculante	-	-	-	37	-	-	-
Nativa (Biotipo E) levemente flocculante	-	-	-	-	7	-	-
Nativa (Biotipo F) flocculação pesada	-	-	-	-	-	45	-
Nativa (Biotipo G) sem perfil flocculação	-	-	-	-	-	-	75
Nativa (Biotipo H) sem perfil flocculação	-	-	-	-	-	-	17

Durante a safra, os compostos fenólicos variaram de 623 a 1.749 mg/L (média de 1.106 mg/L). Essa variação ocorreu em função da concentração dos compostos fenólicos contidos no caldo e/ou melaço usado no preparo do mosto (caldo/mel ou caldo/mel/água ou mel/água em diferentes proporções).

Durante o período de processamento, a eficiência da fermentação por subprodutos variou de 78,4 a 95,72% (média de 91,5%). Essa variação ocorreu por diversos motivos, dentre eles: a presença de leveduras nativas durante o processo fermentativo (Tabela 1), matéria-prima de má qualidade em função de fenômenos climáticos (chuva, geada, vento), praga (broca), doenças, etc. Os fatores relativos à matéria-prima interferem na concentração de compostos fenólicos no caldo, melaço e conseqüentemente nos mostos.

Os dados da Tabela 2 mostram que as concentrações de compostos fenólicos encontradas no mosto durante a safra 2011/2012 não apresentaram correlação com a eficiência de fermentação por subprodutos (teste t não significativo ao nível de 5% de probabilidade). Este fato indica que o coeficiente angular das retas mostradas na Figura 2 é igual a zero, ou seja, as retas são paralelas ao eixo X.

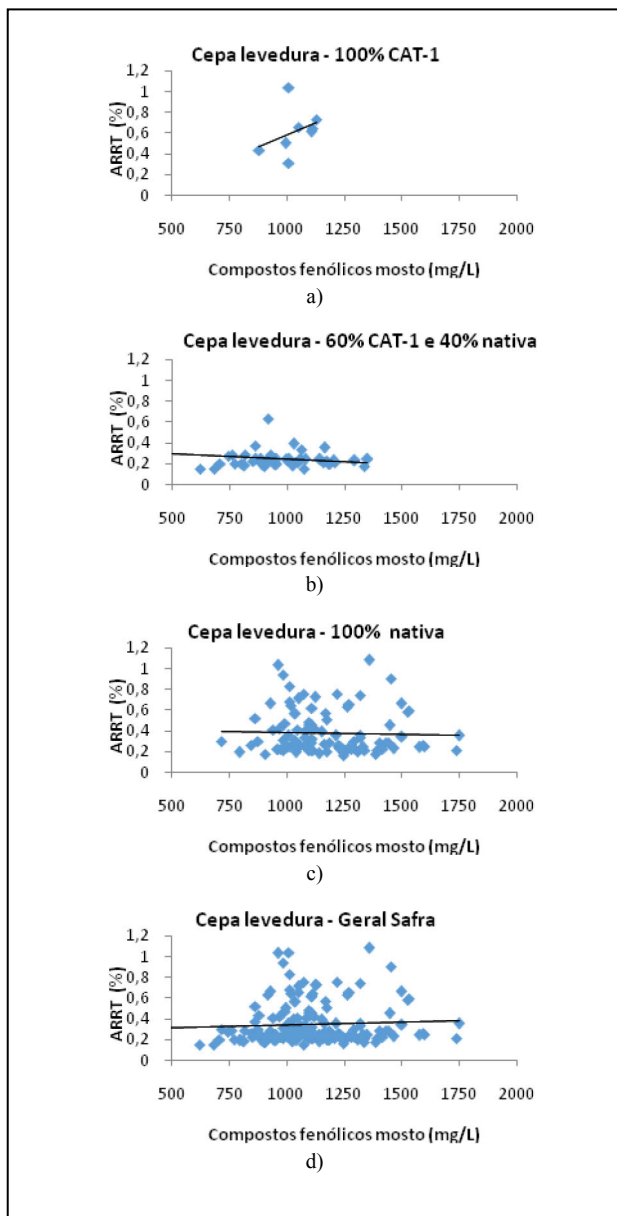
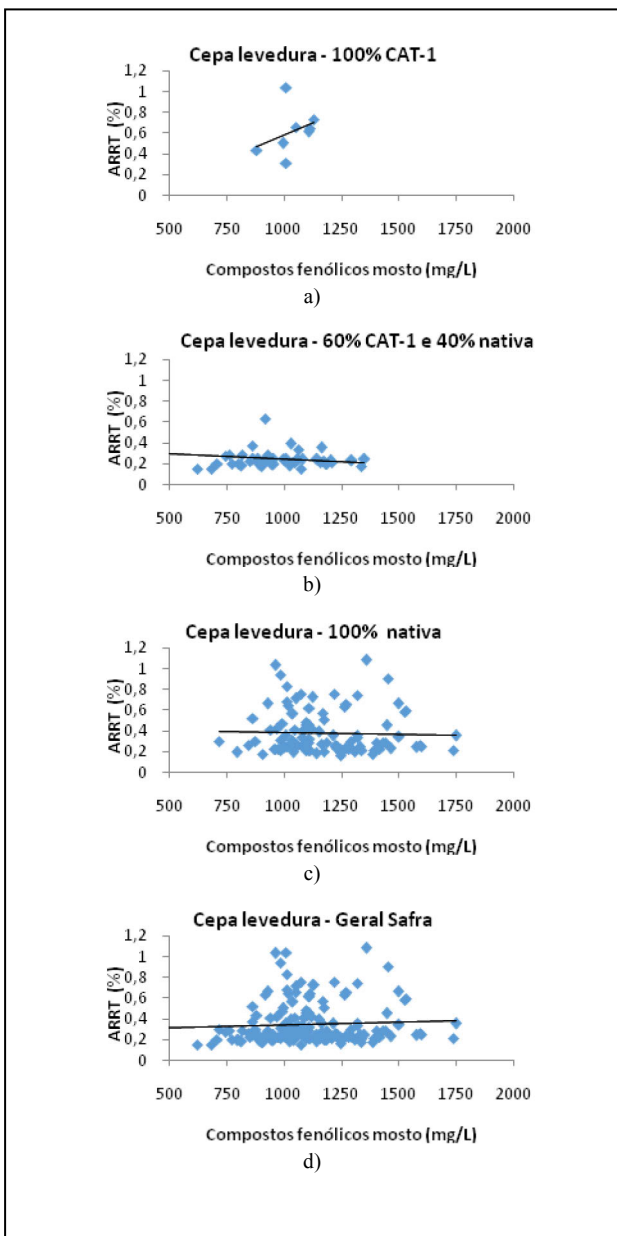


Figura 2 - Correlação entre a concentração dos compostos fenólicos do mosto e a eficiência de fermentação por subprodutos. a) população composta por 100% da cepa CAT-1 (período 18/04/11 a 09/05/11); b) população composta por 60% da cepa CAT-1 e 40% de cepas nativas (período 10/05/11 a 07/07/11); c) população composta por 100% de cepas nativas (período 08/07/11 a 09/10/11); d) população de leveduras durante todo o período de safra (período 18/04 a 09/10/11).

Figura 3 - Correlação entre a concentração de compostos fenólicos do mosto e o ARRT do vinho. a) população composta por 100% da cepa CAT-1 (período 18/04/11 a 09/05/11); b) população composta por 60% da cepa CAT-1 e 40% de cepas nativas (período 10/05/11 a 07/07/11); c) população composta por 100% de cepas nativas (período 08/07/11 a 09/10/11); d) população de leveduras durante todo o período de safra (período 18/04 a 09/10/11).

Polakovic; Handriková; Kosik (1992) constataram que os compostos fenólicos como o fenol, o guaiacol e o ácido vanílico são inibidores do processo de fermentação alcoólica, atuando sobre a enzima invertase da levedura.

A Tabela 3 mostra que as concentrações de compostos fenólicos dos mostos durante a safra 2011/2012 não estavam correlacionadas com as concentrações de ARRT dos respectivos vinhos (teste t não significativo ao nível de 5% de probabilidade, indicando que as retas apresentadas na Figura 3 são paralelas ao eixo X, ou seja, apresentam coeficiente angular igual a zero.

Tabela 2 - Coeficiente de correlação (r) e respectivos valores do teste t : compostos fenólicos x rendimento de fermentação por subprodutos. a) população composta por 100% da cepa CAT-1 (período 18/04/11 a 09/05/11); b) população composta por 60% da cepa CAT-1 e 40% de cepas nativas (período 10/05/11 a 07/07/11); c) população composta por 100% de cepas nativas (período 08/07/11 a 09/10/11); d) população de leveduras durante todo o período de safra (período 18/04/11 a 09/10/11).

Compostos fenólicos no mosto x Eficiência da Fermentação	r	$t(r)$
a) Levedura - 100% CAT-1	-0,35	0,93
b) Levedura - 60% CAT-1 e 40% nativa	0,08	0,56
c) Levedura - 100% nativa	0,11	1,06
d) Levedura–GeralSafra	0,05	0,68

Tabela 3 - Coeficiente de correlação (r) e respectivos valores do teste t : compostos fenólicos x ARRT do vinho. a) população composta por 100% da cepa CAT-1 (período 18/04/11 a 09/05/11); b) população composta por 60% da cepa CAT-1 e 40% de cepas nativas (período 10/05/11 a 07/07/11); c) população composta por 100% de cepas nativas (período 08/07/11 a 09/10/11); d) população de leveduras durante todo o período de safra (período 18/04/11 a 09/10/11).

Compostos fenólicos no mosto x ARRT vinho	r	$t(r)$
a) Levedura - 100% CAT-1	0,34	0,88
b) Levedura - 60% CAT-1 e 40% nativa	-0,22	1,57
c) Levedura - 100% nativa	-0,04	0,37
d) Levedura–GeralSafra	0,06	0,81

Garcia et al (2010) constataram que durante 10 ciclos de fermentação os compostos fenólicos exerceram um efeito negativo sobre as leveduras, prejudicando sua capacidade de usar os açúcares disponíveis, resultando em baixa eficiência da fermentação.

Ao contrário do que foi observado pelos autores citados na literatura, no presente trabalho não foi possível relacionar os danos dos compostos fenólicos do mosto sobre as leveduras, com consequente redução da eficiência da fermentação. É provável que as condições industriais de amostragem e análises não permitiram que as equações de regressão fossem estatisticamente significativas.

Durante o processo de fermentação industrial, o controle operacional possibilita manobras de condução de processo para garantir a sanidade das células e melhor rendimento industrial, tais como o preparo do mosto (caldo/mel ou caldo/mel/água ou mel/água em diferentes proporções), composição química do mosto (nutrientes presentes no mosto como nitrogênio amoniacal), centrifugação e recentrifugação do creme, controle de contaminação bacteriana e sangria. Esses controles operacionais podem ter colaborado para que os compostos fenólicos não interferissem no rendimento fermentativo por subprodutos.

4 CONCLUSÃO

Dentro das condições de trabalho em que os testes foram realizados, concluiu-se que as concentrações de compostos fenólicos do mosto durante a safra 2011/2012, na Usina São Manoel, não apresentaram correlação com as eficiências de fermentação por subprodutos.

5 REFERÊNCIAS

- AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G. **Processo de produção de álcool**: controle e monitoramento. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, 1996.
- 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? In: BERNARDES, M. A. (Ed.). **Biofuel production-recent developments and prospects**. [S.I.]: INTECH, 2011. p. 67-84.
- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 8, p. 1155-1163, 2008.
- BORZANI, W.; FALCONE, M. **Curso de Bioquímica industrial**: fundamentos. Cidade: Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 1960.v.1.

BOVI, R. **Avaliação do efeito de diferentes fontes de impurezas fibrosas da cana-de-açúcar sobre as características do caldo**. 1997. 81 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

CLARKE, M. A. R. S.; BLANCO, M. A.; GODSHALL, T.B.T. Color components in sugar refinery processes. In: ANNUAL MEETING OF SUGAR INDUSTRY TECHNOLOGISTS, 44th, 1985, California. **Proceedings**...California: SIT, 1985. p. 53-87. (Paper, 522).

CTC - CENTRO DE TECNOLOGIA
CANAVIEIRA. **Manual de métodos analíticos controle químico da fermentação**. Piracicaba, 2011.

FERNANDES, A. C. **Cálculos na agroindústria da cana-de-açúcar**. 3. ed. Piracicaba: STAB, 2011. 416 p.

GARCIA, D. B.; RAVANELI, G. C.; MADALENO, L. L.; MUTTON, M. A.; MUTTON, M. J. R. Damages of spittlebug on sugarcane quality and fermentation process. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, n. 5, p. 555-561, Sept./Oct. 2010.

LEITE, R. A. **Compostos fenólicos do colmo, bainha, folha e palmito da cana-de-açúcar**. 2000. 142 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

MARTIN, C.; JONSSON, L. J. Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* lignocelluloses derived fermentation inhibitors. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, p. 386-395, 2003.

O'CONNOR, D. O.; RUBINO, J. R. Phenolic compounds. In: BLOCK, S. S. **Disinfection, sterilization, and preservation**. 4. ed. Philadelphia: Lea &Febiger, 1991. cap.12, p.204-224.

POLAKOVIC, M.; HANDRIKOVÁ, G.; KOSIK, M. Inhibitory effects of some phenolic compounds on enzymatic hydrolysis of sucrose. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v.3, n. 5, p.369-371, 1992.

TOSSETTO, M. G. **Comportamento de linhagens industriais de *Saccharomyces* frente a compostos inibidores no melão de cana-de-açúcar na produção de bioetanol**. 2008. 257 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

VIEIRA, S. **Análise de variância: (ANOVA)**. São Paulo: Atlas, 2006. 204 p.