



RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS NO MOSTO COM A VIABILIDADE CELULAR, VIABILIDADE DE BROTAMENTO E A TAXA DE BROTAMENTO CELULAR DA LEVEDURA ALCOÓLICA¹

Miriam Roberta Henrique¹ & Waldemar Gastoni Venturini Filho²

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação entre a concentração dos compostos fenólicos presentes no mosto com a viabilidade celular, viabilidade de brotamento e a taxa de brotamento celular de levedura alcoólica, durante a safra 2011 na Usina São Manoel, em São Manuel-SP. A pesquisa foi desenvolvida como um estudo de caso na planta industrial de fermentação contínua. Esta usina iniciou a safra com a levedura selecionada CAT-1. Durante a safra, as cepas nativas contaminaram e dominaram o processo fermentativo. As análises de concentração de compostos fenólicos presentes no mosto foram realizadas através do método Folin Ciocalteu. As análises de viabilidade celular, viabilidade de brotamento e taxa de brotamento da levedura foram feitas através de contagem em câmara de Neubauer com corante azul de metileno. Os resultados foram avaliados pelo coeficiente de correlação de Pearson e sua significância através do teste *t* ($p < 0,05$). Os compostos fenólicos do mosto tiveram relação negativa sobre a viabilidade celular e viabilidade de brotamento no período em que o processo fermentativo continha 100% de leveduras nativas (agosto, setembro e outubro). Os compostos fenólicos não apresentaram qualquer tipo de relação com a taxa de brotamento da levedura durante todo o período de estudo (abril a outubro).

PALAVRAS-CHAVE: *Saccharomyces cerevisiae*, polifenóis, fermentação contínua, usina alcooleira, CAT-1, leveduras nativas.

RELATIONSHIP OF THE MUST PHENOLIC COMPOUNDS CONCENTRATION WITH THE CELLULAR VIABILITY, BUDDING VIABILITY AND THE CELLULAR BUDDING TAX OF THE ALCOHOLIC YEAST

ABSTRACT: The aim of this project was to evaluate the relationship between the concentration of phenolic compounds present in must with the cellular viability, budding viability, alcoholic yeast cellular budding tax during the harvest 2011/2012 in São Manoel Mill, São Manuel (SP). The research was developed as a case study in the Sugar Mill of continuous fermentation. This unit began the harvest with the selected yeast CAT-1. During the harvest, the native stumps contaminated and dominated the fermentation process. The analyses of phenolic compounds concentration present in the must were made through the Folin Ciocalteu method. The analyses of cellular viability, budding viability and budding yeast rate were made through counting in Neubauer chamber using Methylene Blue dye. The results were evaluated by Pearson's correlation coefficient and its significance through the "*t*" test ($p < 0,05$). The must phenolic compounds have negative relationship about the cellular viability and budding viability in the the period in which the fermentation process contained 100% of native yeasts (August, September and October). Phenolic compounds did not show any relationship with the budding yeast rate throughout the study period (April-October).

KEYWORDS: *Saccharomyces cerevisiae*, polyphenols, continuous fermentation, sugar mill, CAT-1 stump, native stumps.

¹ e ² E-mails: miriamhenrique@gmail.com,
venturini@fca.unesp.br

1 INTRODUÇÃO

As leveduras são organismos eucarióticos e formam uma das classes mais importantes de fungos. As células de *Saccharomyces cerevisiae* apresentam-se, normalmente, na forma unicelular, com 2 a 8 µm de diâmetro. Reproduzem-se basicamente por brotamento, mas eventualmente podem se reproduzir sexuadamente (TOSETTO, 2008).

Segundo Okolo et al. (1987), citado por Ravaneli (2010), a porcentagem de células e brotos viáveis durante a fermentação é de extrema importância para a manutenção da população de leveduras, sendo seu monitoramento imprescindível, uma vez que, além de metabólitos indesejáveis na matéria-prima, compostos tóxicos às leveduras que são produzidos durante a fermentação podem acumular-se no fermento promovendo perdas de viabilidade celular e reduzindo a eficiência industrial.

Entre os compostos que atuam como inibidores das leveduras alcoólicas 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. Alguns destes compostos estão presentes no caldo da cana, dentre eles o ácido gálico, ácido salicílico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido sináptico, ácido vanílico (O'CONNOR; RUBINO, 1991; MARTIN; JONSSON, 2003).

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução. Também são formados em condições de estresse, como infecções, fermentos, radiações UV, dentre outros (ANGELO; JORGE, 2007). Basicamente, são substâncias formadas pelo anel benzênico com grupos hidroxilas associadas diretamente à estrutura cíclica. Esses compostos são sintetizados a partir de duas rotas metabólicas principais: a via do ácido chiquímico e a via do ácido mevalônico (KYOTO, 2015).

Os compostos fenólicos que estão presentes nas plantas da cana-de-açúcar são carregados pelo caldo durante o processo de extração e acabam se acumulando nos méis que posteriormente serão fermentados (TOSETTO, 2008).

Durante o processo de fermentação, a presença de compostos fenólicos podem inibir a reprodução da levedura, o que resulta em menor viabilidade celular, comprometendo o reaproveitamento de células (RAVANELI et al., 2006).

Ravaneli (2010) pesquisou os efeitos dos compostos fenólicos na viabilidade celular de leveduras alcoólicas. A autora observou que a viabilidade celular é maior nos primeiros ciclos fermentativos e decresce com o passar

dos ciclos. Provavelmente, a presença das biomoléculas inibidoras do processo fermentativo, tais como compostos fenólicos e ácidos são responsáveis pela redução da viabilidade celular das leveduras.

Hirshfield e colaboradores (2003) relatam que os ácidos orgânicos fracos agem como conservantes químicos pois inibem o crescimento de fungos e bactérias. Porém, em soluções com pH ácido, passam para a forma não dissociada e conseguem penetrar na membrana celular. No interior das células de levedura, estes ácidos encontram pH básico e irão se dissociar, causando redução do pH intracelular e promovendo alterações nas funções da membrana. A elevada concentração de ânions (devido à dissociação) no interior das células resulta em uma maior osmolaridade e, conseqüentemente, provoca alterações no metabolismo da levedura.

Tosetto (2008) avaliou os efeitos dos compostos fenólicos encontrados em melaço (ácido cafeico - 10,75ppm; vanílico - 59,70ppm; gálico - 1,49ppm; siringico - 72,18ppm) sobre a viabilidade celular de duas cepas isoladas de leveduras alcoólicas (Y904 e SA1). O autor concluiu que o ácido gálico afetou a cepa SA1, com decréscimo de 6,87% a cada ciclo fermentativo em relação ao valor inicial de viabilidade. Para a cepa Y904, nenhum composto fenólico afetou significativamente a viabilidade celular.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos compostos fenólicos contidos no mosto sobre a viabilidade celular, viabilidade de brotamento e taxa de brotamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* durante o processo de fermentação contínua, na safra de 2011 da Usina São Manoel, município de São Manuel, SP.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Descrição do processo industrial de fermentação

O processo fermentativo na Usina São Manoel é contínuo. A planta da fábrica de etanol conta com três linhas, sendo que cada linha é composta de quatro fermentadores (12 fermentadores) e uma única dorna final (dorna pulmão), com volume total útil de 2.800 m³. Capacidade de produção diária é 1.200 m³ de etanol hidratado e 500 m³ etanol anidro. Durante o período de safra a composição do mel é composta de acordo com a disponibilidade da matéria prima, podendo ser caldo/mel ou água/mel ou caldo/mel/água. O vinho fermentado passa por centrífugas (marca Alfa Laval, modelo FESX 512-S-34-60) com rotação de eixo de 1700 a 1800 rpm para separação do creme de levedura do vinho delevedurado (sem levedura). Após a centrifugação o vinho delevedurado segue para destilação e o creme de levedura para o tratamento, que posteriormente retorna aos reatores. Durante a safra 2011, a Usina São Manoel trabalhou com o processo de recentrifugação do creme de fermento tratado. O processo consiste em centrifugar 2 vezes o creme de levedura, onde o creme de levedura (pH \cong 3,0) é diluído com água acidulada e novamente

centrifugado. Em seguida, o creme foi tratado, mediante adição de água e ácido sulfúrico, mantendo o pH entre 2,1 a 2,3 e recirculado no processo fermentativo. A Usina São Manoel tem uma planta para secar o excedente de levedura, sendo esta destinada ao consumo animal. Esse procedimento de separar o excedente de

levedura é denominado sangria e ocorre durante a centrifugação auxiliando a manter a porcentagem de massa de levedura ideal para reator.

A propagação do fermento para o início da safra foi com 270 kg de levedura selecionada CAT-1, em cubas de fermentação

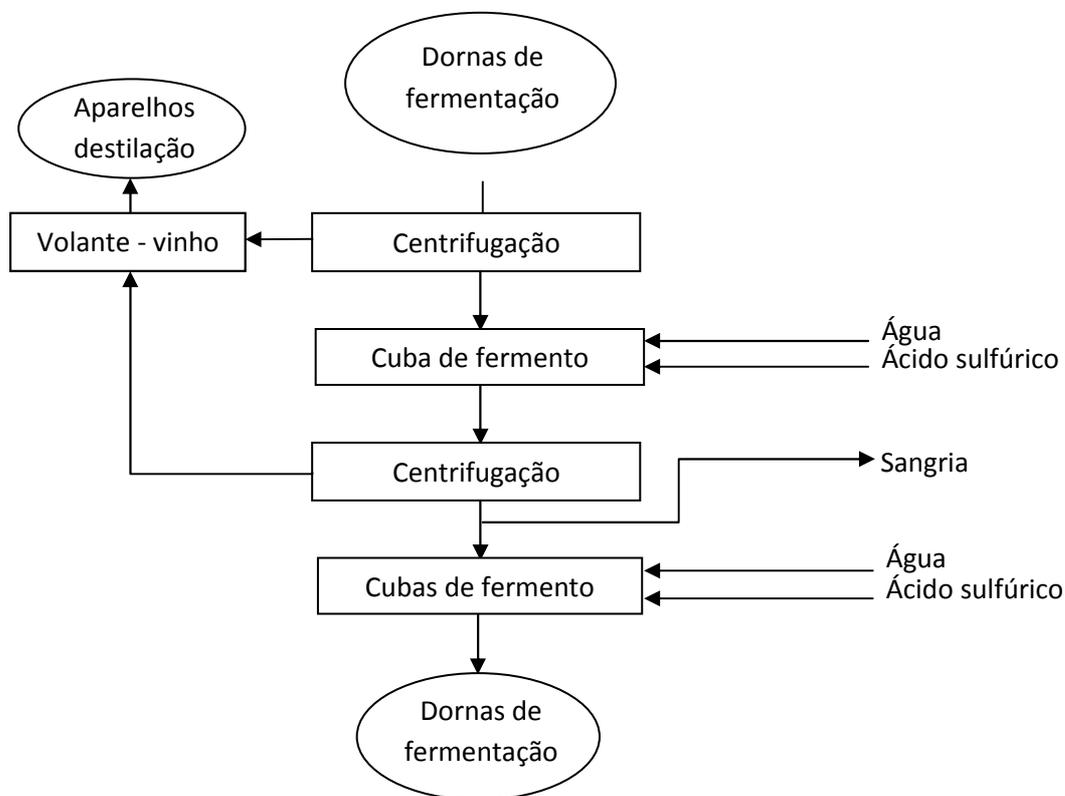


Figura 1 – Fluxograma do processo de recirculação do fermento na Usina São Manoel.

2.2 Planejamento experimental e análise estatística

Os resultados das análises da concentração de compostos fenólicos do mosto foram relacionados com a viabilidade celular, a viabilidade de brotamento e a taxa de brotamento da levedura.

Após as paradas prolongadas por chuva, foram excluídos os dados obtidos nos três dias consecutivos após o reinício de moagem. Esse procedimento foi adotado para desconsiderar as oscilações da viabilidade celular e da taxa de brotamento que ocorrem durante o período da parada, até que o processo se estabilizasse novamente.

A relação entre as variáveis estudadas foi avaliada pelo coeficiente de correlação de Pearson e sua significância verificada através do Teste t ($p < 0,05$) (SILVA; AZEVEDO, 2011).

3 ANÁLISES QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS

3.1 Compostos fenólicos

Amostras pontuais de mosto foram coletadas a cada 4 horas (6 vezes ao dia). As amostras coletadas no mesmo dia foram misturadas e congeladas ($-3,00 \pm 1,00^\circ\text{C}$) até o momento da análise. O descongelamento foi feito pelo método de banho-maria.

A quantificação de compostos fenólicos foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu. Essa técnica promove a redução do reagente pelos compostos fenólicos presentes nas amostras com formação de um composto azul. A absorbância das amostras foi mensurada em espectrofotômetro (Marca Hach, modelo DR 5000) a 650nm, utilizando cubetas de 10mm (CLARKE et al., 1985).

3.2 Identificação das leveduras

Para a identificação das cepas de levedura presentes durante o processo de fermentação do mosto, amostras

foram coletadas mensalmente ao longo do período da safra. Em seguida, as amostras foram enviadas ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícola (CPQBA/UNICAMP). A identificação das cepas de leveduras foi feita por meio de cariotipagem. Essa técnica separa por eletroforese os cromossomos de leveduras, na sua forma intacta.

3.3 Viabilidade celular, viabilidade de brotamento e taxa de brotamento

Foram realizadas em amostras de vinho da dorna final, por meio de coletas pontuais (2 vezes ao dia). O método usado para a determinação da viabilidade celular, viabilidade de brotamento e taxa de brotamento foi o da contagem em câmara de Neubauer e coloração das células com azul de metileno (CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A levedura CAT-1 foi utilizada como inóculo para o processo de fermentação. Durante a safra, ocorreu a contaminação do fermento original com leveduras nativas (Figura 2). 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 sucessão populacional. Nos três últimos meses de safra (agosto, setembro e outubro), a cepa CAT-1 foi eliminada dos

fermentadores, restando apenas as leveduras nativas. Essa contaminação por leveduras nativas ocorre devido às variações de condições de processo, condições climáticas, qualidade da matéria-prima, etc. (BASSO et al, 2011).

Em um trabalho desenvolvido também na Usina São Manoel durante a safra 2008 por Antonangelo (2009), o autor descreveu o processo de sucessão das leveduras, onde relatou o surgimento de leveduras nativas com características de floculação leve a forte. Durante a safra de 2011 foi novamente verificado o processo de sucessão descrito Antonangelo (2009) através de um trabalho realizado na própria unidade com laboratório externo (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícola – CPQBA/UNICAMP) e análise de cariotipagem. As cepas de leveduras floculantes fizeram parte da safra nos meses de junho a setembro (Figura 2). As cepas floculantes são indesejáveis nos processos que utilizam a centrifugação para separar o vinho das células de levedura, pois os flocos interferem na correta separação, com consequentes perdas nos reciclados. Para minimizar esse problema, a usina São Manoel adotou o processo de recentrifugação, conforme citado no item 2.1. No mês de outubro, a sucessão de leveduras ocorreu por cepas nativas não floculantes (<90%) (Figura 2).

O processo de sucessão das leveduras descrito por Antonangelo (2009) e corroborado no presente estudo não influenciou a produção de álcool ao longo da safra. Portanto, a substituição das leveduras originais CAT-1 por leveduras nativas não causou prejuízos à usina.

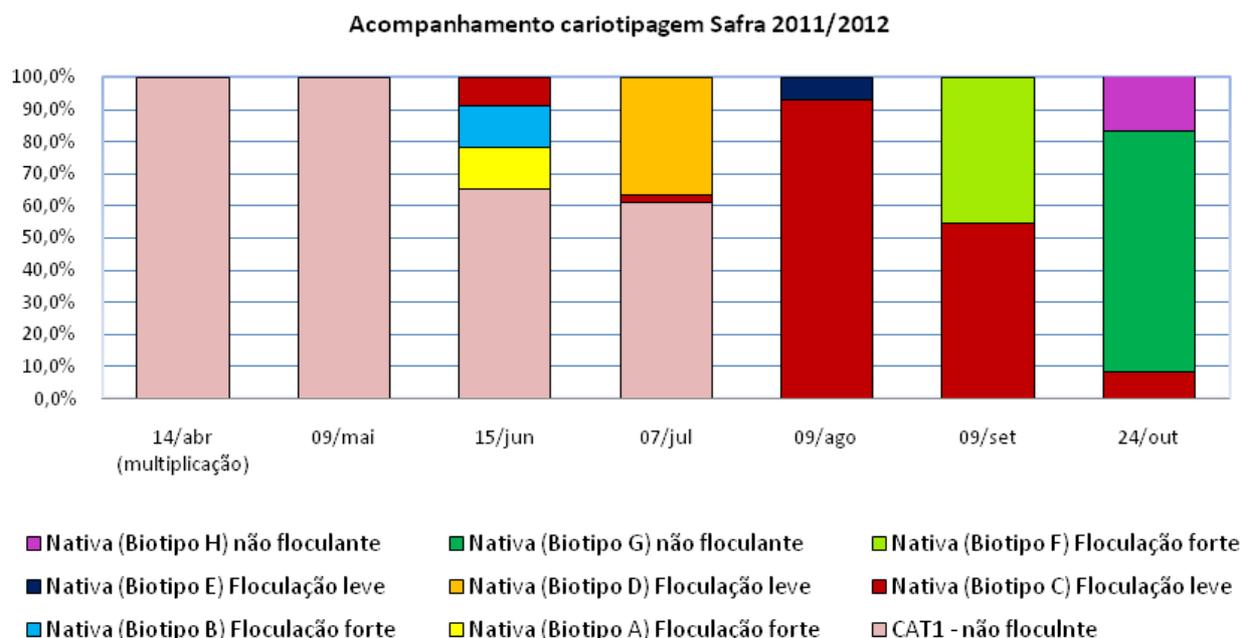


Figura 2 – Resultados das análises de cariotipagem.

Neste estudo, os compostos fenólicos do mosto variaram de 623 a 1749 mg.L⁻¹. Essa variação ocorreu em função do tipo de mosto empregado (caldo/mel ou caldo/mel/água ou mel/água, em diferentes proporções). Além disso, características intrínsecas à cana-de-açúcar e condições ambientais podem influenciar na concentração dos compostos fenólicos contidos no caldo e/ou melaço.

No vinho, a viabilidade celular variou de 70,3 a 98,1 %, a viabilidade de brotamento de 55,9 a 100 % e a taxa de brotamento de 8,5 a 29,4 %. Essa variação nos resultados pode ter sido influenciada pela instabilidade do processo decorrente das paradas prolongadas devido à chuva. Além disso, Basso et al. (1997) citaram que a viabilidade

das leveduras alcoólicas pode ser influenciada por muitos fatores com destaque para a temperatura, teor alcoólico, contaminação bacteriana, concentração de ácidos orgânicos e o uso de mosto composto com mel diluído com água.

Na Tabela 1, os itens “a” e “b” não apresentaram correlação significativa. Neste caso os compostos fenólicos não foram relacionados com a viabilidade celular. Já para os itens “c” e “d”, as correlações foram significativas e os compostos fenólicos no mosto relacionaram-se negativamente com a viabilidade celular.

Tabela 1 – Coeficiente de correlação (r) e respectivos valores do teste t: compostos fenólicos vs. viabilidade celular.

Identificação	Levedura	Período	r	t(r)
a	100% CAT-1	18/04/11 a 09/05/11	0,61	1,71
b	60% CAT-1 e 40% nativa	10/05/11 a 07/07/11	-0,02	0,14
c	100% nativa	08/07/11 a 09/10/11	-0,32	3,42*
d	CAT-1 e nativa (Geral Safra)	18/04/11 a 09/10/11	-0,25	3,17*

*Significativo a 5% de probabilidade

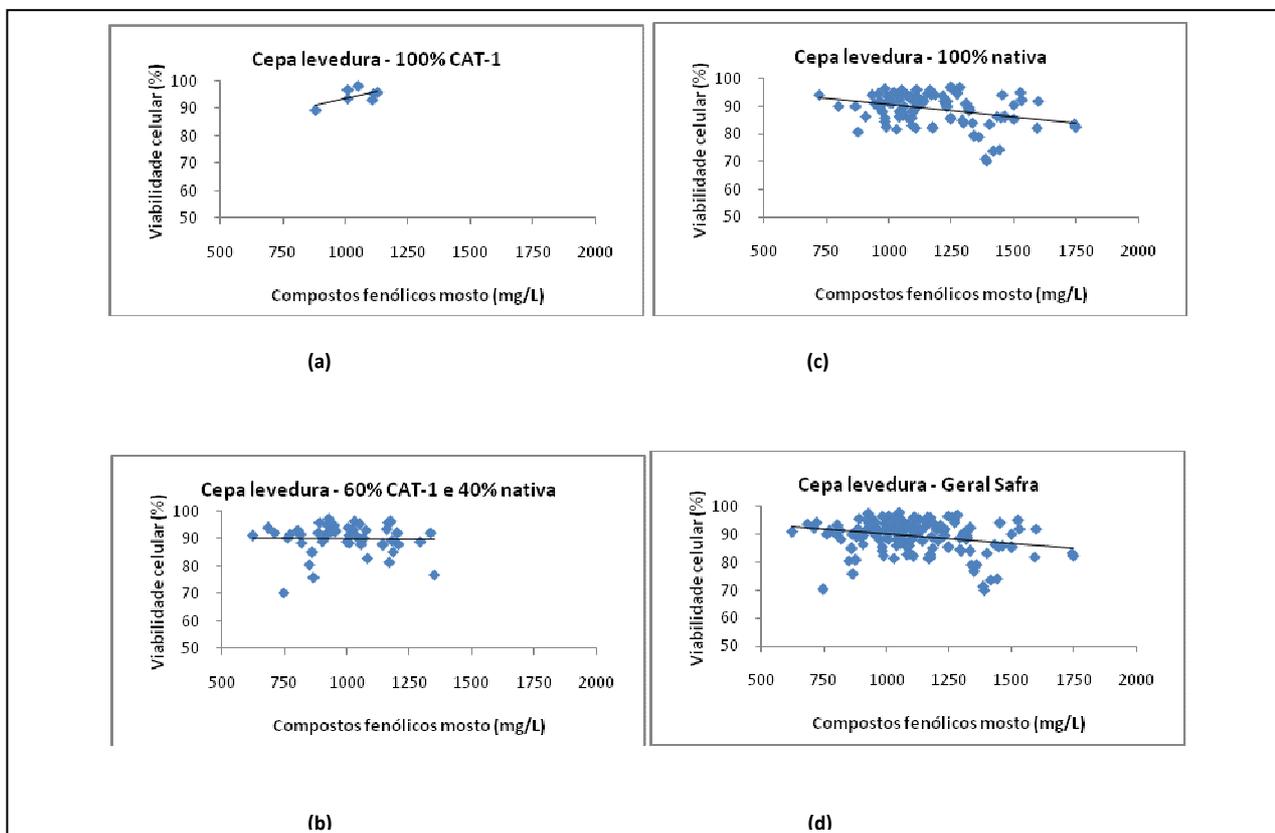


Figura 3 – Correlação entre a concentração de compostos fenólicos do mosto e a viabilidade celular de levedura alcoólica.

Na Tabela 2, o item “c” teve correlação entre os compostos fenólicos no mosto e a viabilidade do brotamento. Nesse caso, os compostos fenólicos tiveram relação negativa sobre viabilidade de brotamento. Para

os demais períodos as correlações não são significativas, mostrando que os compostos fenólicos não tiveram relação com o brotamento celular.

Tabela 2 – Coeficiente de correlação (r) e respectivos valores do teste t : compostos fenólicos x viabilidade de brotamento.

Identificação	Levedura	Período	r	$t(r)$
a	100% CAT-1	18/04/11 a 09/05/11	0,35	0,82
b	60% CAT-1 e 40% nativa	10/05/11 a 07/07/11	-0,03	0,20
c	100% nativa	08/07/11 a 09/10/11	-0,23	2,29*
d	CAT-1 e nativa (Geral Safra)	18/04/11 a 09/10/11	-0,12	1,55

*Significativo a 5% de probabilidade e

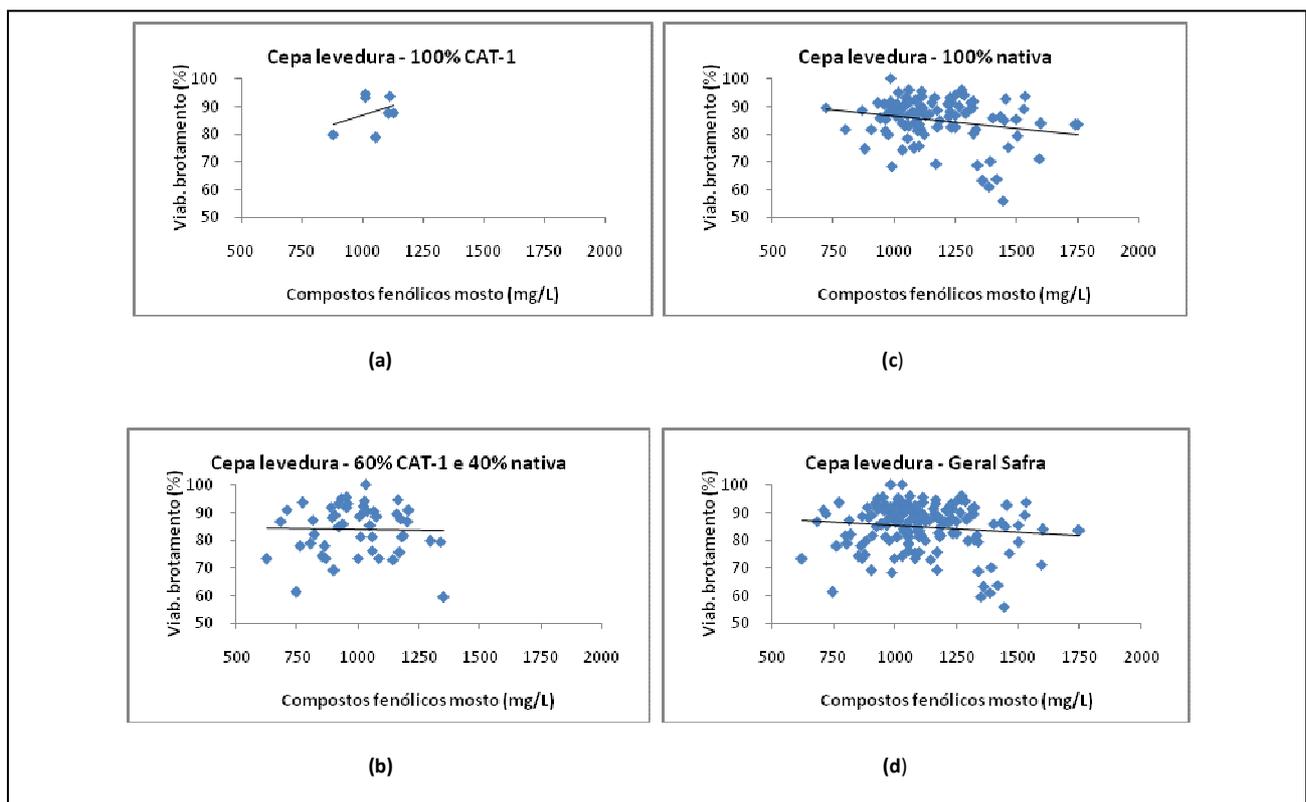
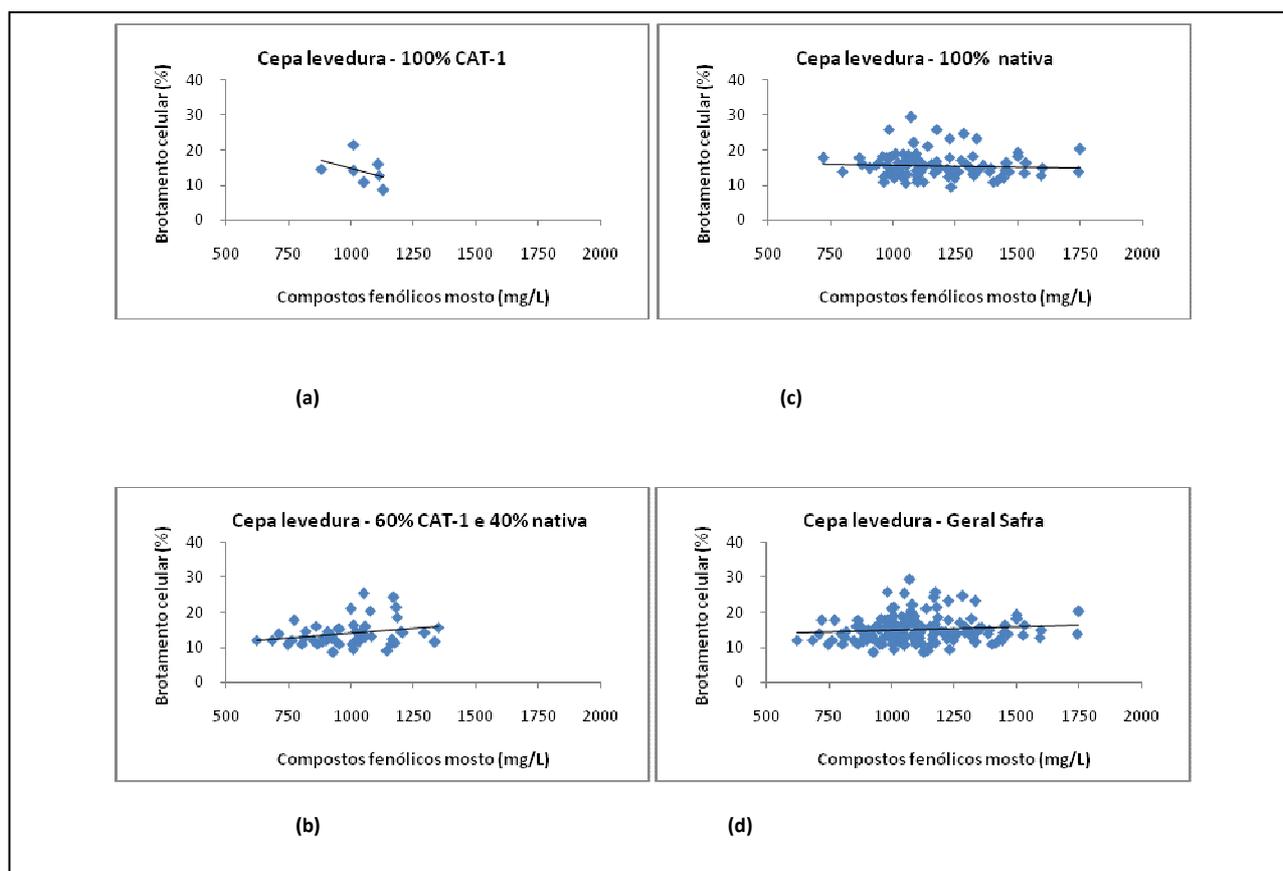


Figura 4 – Correlação entre a concentração de compostos fenólicos do mosto e a viabilidade de brotamento de levedura alcoólica.

Para todos os itens da Tabela 3, os compostos fenólicos não tiveram correlação significativa com a taxa de brotamento.

Tabela 3 – Coeficiente de correlação (r) e respectivos valores do teste t : compostos fenólicos x taxa de brotamento.

Identificação	Levedura	Período	r	$t(r)$
a	100% CAT-1	18/04/11 a 09/05/11	-0,38	0,93
b	60% CAT-1 e 40% nativa	10/05/11 a 07/07/11	0,24	1,69
c	100% nativa	08/07/11 a 09/10/11	-0,06	0,20
d	CAT-1 e nativa (Geral Safra)	18/04/11 a 09/10/11	0,11	1,31

**Figura 5** – Correlação entre a concentração de compostos fenólicos no mosto e o brotamento de levedura alcoólica.

A literatura especializada afirma que a presença de alguns compostos fenólicos no mosto em fermentação prejudica o metabolismo da levedura alcoólica, inibindo a reprodução da levedura e a viabilidade celular (RAVANELI et al., 2006; TOSETTO, 2008; RAVANELI, 2010). Segundo Tosetto (2008), as linhagens de leveduras têm comportamentos diferentes quando relacionados aos compostos fenólicos, isso pode explicar a relação diferenciada entre os compostos fenólicos e viabilidade celular e de brotamento em determinados momentos da safra.

Os autores que trabalharam nesse tema fizeram uso de laboratórios, enquanto que o presente trabalho foi realizado em planta industrial, ou seja, em condições ambientais diferentes. Por exemplo, nos experimentos laboratoriais, o número de reciclagem é pequeno (10 ciclos) (RAVANELI, 2010; GARCIA et al., 2010) em relação ao processo industrial, onde o fermento permanece em atividade durante 6 a 7 meses (aproximadamente 570 ciclos). Mesmo este sendo um estudo em planta industrial foi observado em determinado período (08/07/11 a 09/10/11), a mesma relação dos compostos fenólicos sobre a viabilidade celular e de brotamento.

Ravaneli et al. (2006) constaram que houve redução da viabilidade celular no decorrer dos ciclos fermentativos. Observaram também que a limpeza de fundo de dorna realizada ao final da maioria dos ciclos (do 3º ao 8º), contribuiu para a melhoria da viabilidade celular. Neste caso, os autores podem ter feito uma sangria involuntária, favorecendo a renovação do fermento.

Estima-se que a biomassa de levedura aumente entre 5 a 10% durante um ciclo de fermentação, sendo suficiente para substituir as células de levedura perdida durante a centrifugação (BASSO et al., 2011). Considerando esse raciocínio, na Usina São Manoel, ocorre a sangria (média de 14g de massa seca por litro de etanol produzido) do fermento para a secagem da levedura, favorecendo a renovação da população de levedura (AMORIM, 1996), ou seja, as células mais novas estariam menos suscetíveis ao efeito dos compostos fenólicos em suas concentrações.

Outro fator que deve ser considerado é que na Usina São Manoel o mosto entra na dorna de fermentação na proporção de 2:1 em relação ao fermento que foi centrifugado duas vezes, sendo a última com água. Dessa forma, pode-se considerá-lo com menor concentração de compostos fenólicos. Portanto, a concentração de compostos fenólicos no mosto em fermentação diminui, passando a ser em torno de dois terços (67%) da concentração inicial.

Fatores que interferem no processo fermentativo, podem ser minimizados através de controles e manobras operacionais que possibilitam ajustes na condução do processo garantindo a sanidade e vitalidade das células, exemplos: 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, fosfato, etc.), centrifugação e controle de contaminação bacteriana com aplicação de antimicrobianos/antibióticos, controle da temperatura nos reatores, etc. Esses controles operacionais podem ter colaborado para que a concentração dos compostos fenólicos não tivesse relação significativa sobre a viabilidade celular (levedura 100% CAT-1 e levedura 60% CAT-1 e 40% nativa), viabilidade de brotamento em alguns períodos e sobre a taxa de brotamento em todos os períodos.

Esses controles operacionais podem ter colaborado para que a concentração dos compostos fenólicos não tivesse relação significativa sobre a viabilidade celular (levedura 100% CAT-1 e levedura 60% CAT-1 e 40% nativa), viabilidade de brotamento em alguns períodos e sobre a taxa de brotamento em todos os períodos.

Tosetto (2008) identificou os compostos fenólicos do mel e concluiu que há linhagens de leveduras que são sensíveis a determinados compostos fenólicos, ao contrário de outras cepas. Neste trabalho não foram identificados isoladamente os compostos fenólicos contidos no mosto. Foi observado que as leveduras nativas apresentaram maior sensibilidade em relação aos

compostos fenólicos do mosto, quando se refere à viabilidade celular e de brotamento. Não foram encontrados dados na literatura que corroborem com essa observação.

5 CONCLUSÃO

Dentro das condições de trabalho em que os testes foram realizados, os compostos fenólicos contidos no mosto tiveram relação negativa sobre a viabilidade celular no período com leveduras 100% das nativas. Tiveram relação negativa sobre a viabilidade de brotamento somente no período com leveduras 100% nativas. Os compostos fenólicos no mosto não apresentaram relação com a taxa de brotamento da levedura em todos os períodos.

6 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.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.

ANTONANGELO, A.T.B.F.; HENRIQUE, M. R.; RIBOLLA, P. E. M.; COLOMBI, D. Microsatellite PCR method monitoring yeast population at a bioethanol plant in Brazil. **Yeast**, Chichester, v. 26, n. S1, p. 132, 2009. Supplement.

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

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: BERNARDES, M. A. S. (Ed.). **Biofuel production: recent developments and prospects**. Rijeka: In Tech, 2011. cap. 5, p. 85-100.

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

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.

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, 2010.

HIRSHFIELD, I. N.; TERZULLI, S.; O'BYRNE, C. Weak organic acids: a panoply of effects on bacteria. **Science Progress**, London, v. 86, n. 4, p. 245-269, 2003.

KYOTO. **Encyclopedia of genes and genomes**: KEGG. Tokyo: Kanehisa Laboratories, 2015. Disponível em: <<http://www.genome.jp/kegg/>>. Acesso em: 22 set. 2015.

MARTIN, C.; JONSSON, L. J. Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* to 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. (Ed.). **Disinfection, sterilization and preservation**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. cap 12, p. 204-224.

RAVANELI, G. C. **Qualidade da matéria-prima, microbiota fermentativa e produção de etanol sob ataque de *Mahanarva fimbriolata* em cana-de-açúcar**. 2010. 103 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

RAVANELI, G. C.; MADALENO, L. L.; PRESOTTI, L. E.; MUTTON, M. A.; MUTTON, M. J. R. Spittlebug infestation in sugarcane affects ethanolic fermentation. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 6, p. 543-546, 2006.

SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. **Programa de assistência estatística Assistat: versão 7.6 beta**. Campina Grande: Universidade Federal de Campina Grande, 2011.

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