

IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS CONTAMINANTES EM FERMENTAÇÃO DO TIPO BATELADA EM USINA DE ÁLCOOL DE PEREIRA BARRETO-SP

Sousa, R. L. ⁽¹⁾; Scabora, M. H. ⁽²⁾; Silva, E. M. ⁽³⁾; Petroni, T.F ⁽⁴⁾

⁽¹⁾Discente de Biomedicina, AEMS/Três Lagoas-MS; ⁽²⁾Doutoranda, UNESP/Campus de Ilha Solteira; ⁽³⁾ Discente em Ciências Biológicas, UNESP/Campus de Ilha Solteira; ⁽⁴⁾ Docente de Biomedicina das FITL-AEMS ⁽¹⁾Usina Santa Adélia Pereira Barreto-SP, Rodovia SP 310, Km 643, CEP 15370-000

RESUMO

O etanol brasileiro representa hoje a melhor e mais avançada opção para a produção sustentável de biocombustíveis em larga escala no mundo. A produção de etanol no Brasil é produto da fermentação do caldo da cana de açúcar pelas leveduras. Vários são os fatores que interferem nos processos fermentativos de uma usina alcooleira, dentre eles destaca-se a qualidade da matéria prima utilizada, o tempo de fermentação, a contaminação bacteriana e levedurana. A contaminação bacteriana amplia o risco de inibição da levedura *Saccharomyces cerevisiae* uma vez que compete pelo substrato, além de contribuir para a liberação de metabólitos, os quais podem ocasionar perda na eficiência e no rendimento da destilaria. O controle das leveduras contaminantes do processo é importante não somente para obter um bom rendimento alcoólico no processo fermentativo, mas também para garantir um produto de qualidade. Portanto, este trabalho teve como objetivo identificar a presença de leveduras contaminantes em amostras de fermento utilizado na safra de 2010 pela Usina Santa Adélia – Pereira Barreto S.P. Foram utilizadas uma cepa padrão, além de outras 3 cepas contaminantes, as quais foram semeadas em meios específicos para identificação de leveduras. Foi observado que a cepa padrão- gênero *Saccharomyces*-apresentou um bom rendimento fermentativo; e que uma cepa considerada contaminante, embora também apresentando bom rendimento fermentativo, apresentou grande produção de massa. Estes resultados sugerem a utilização destas técnicas para a avaliação da qualidade do etanol produzido, bem como da seleção de novas cepas a serem utilizadas no processo.

PALAVRAS-CHAVE: contaminação levedurana, fermentação, rentabilidade, Usina.

Introdução

O Brasil é o país mais avançado, do ponto de vista tecnológico, na produção e no uso do etanol como combustível. O etanol brasileiro representa hoje a melhor e mais avançada opção para a produção sustentável de biocombustíveis em larga escala no mundo. Sob vários critérios, o etanol de cana-de-açúcar oferece um excelente exemplo de como as questões sociais, econômicas e ambientais podem ser equalizadas no contexto do desenvolvimento sustentável.

O Brasil é o candidato natural a liderar a produção economicamente competitiva e a exportação mundial de etanol devido a menores custos de produção, balanço energético inigualável, enorme possibilidade de ampliação da produção de etanol e o domínio tecnológico nas áreas industrial e agrícola. O etanol brasileiro possui inúmeras vantagens, tanto do ponto de vista econômico, como também ambiental e social. Mesmo sem qualquer tipo de subsídio governamental, é competitivo frente à gasolina. Também possui o menor custo de produção e o maior rendimento em litros por hectare. Em relação ao meio ambiente, reduz as emissões de gases de efeito estufa em cerca de 90% e a poluição atmosférica nos centros urbanos. Sua produção tem baixo consumo de fertilizantes e defensivos e apresenta níveis relativamente baixos de perdas do solo.

Atualmente, cerca de 90% dos veículos leves licenciados no Brasil são bicomcombustíveis. Entre 2003 e fevereiro de 2011, foram comercializados 12,95 milhões de veículos bicomcombustíveis e sua participação estimada na frota total de veículos leves é de 43% (fev/2011).

O etanol é produzido nas regiões Nordeste e Centro-Sul, sendo que a região Centro-Sul é responsável por, aproximadamente, 90% da produção nacional e o estado de São Paulo responsável pela produção de 60% do biocombustível.

Com relação à capacidade produtiva, desde 2003, mais de 100 usinas de etanol entraram em operação no País. Em março de 2011, 436 usinas estavam em funcionamento, sendo 122 produtoras de etanol e 301 mistas (açúcar e etanol), gerando emprego e renda em todo país. (União da Indústria da cana de açúcar, ÚNICA, 2010).

Desde o lançamento dos veículos bicombustíveis, o governo brasileiro vem criando condições positivas para que a economia do etanol pudesse atingir um nível recorde de produtividade. O Brasil voltou à posição de destaque mundial na produção, utilização e exportação de biocombustíveis em larga escala. Hoje, o País é o segundo maior produtor mundial e o maior exportador de etanol. (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA).

A quantidade de cana-de-açúcar moída em 2010 na região Centro-Sul do País (RS, SC, PR, SP, RJ, ES, MG, MS, GO) totalizou 552,48 milhões de toneladas. A produção de etanol alcançou 25,13 bilhões de litros, sendo 17,78 bilhões de litros de etanol hidratado e 7,35 bilhões de litros de etanol anidro.

Atualmente, o Brasil é internacionalmente reconhecido por sua eficiência na produção de cana-de-açúcar, expertise industrial e centros privados de desenvolvimento de tecnologia agrícola e melhoramento de espécies de cana-de-açúcar. E a produção de etanol no Brasil é produto da fermentação do açúcar (sacarose) da cana de açúcar pelas leveduras.

A palavra levedura traz imediatamente à mente a idéia "fermentação", pois os dois termos têm sido muito associados através da História. Entretanto, o desenvolvimento do conceito de levedura pode ser considerado como tendo tido início por volta de 1680 através de trabalhos de Van Leeuwenhoek. Mas foi somente após estudos de Pasteur, em 1876, que ficou caracterizada a individualidade da levedura como um organismo vivo com características próprias.

A levedura é unicelular e frequentemente apresenta formato oval; podendo apresentar também formas arredondadas ou elípticas dependendo da maneira da reprodução vegetativa, bem como das condições de cultivo e idade da cultura. Geralmente possuem de 5-16 μm de comprimento por 3-7 μm de largura, mas este fator também é bastante variado (Figura 1).

A maioria das investigações feitas acerca da estrutura de uma levedura é baseada em trabalhos feitos com *Saccharomyces cerevisiae*. As informações sobre a citologia da levedura têm sido obtidas por observações diretas com o microscópio óptico; técnicas de coloração da célula para componentes específicos; microscopia eletrônica de transmissão de cortes ultrafinos das células, bem como através da microscopia de varredura. As principais estruturas

da célula de levedura são: parede celular, membrana citoplasmática, núcleo, vacúolos e mitocôndria.

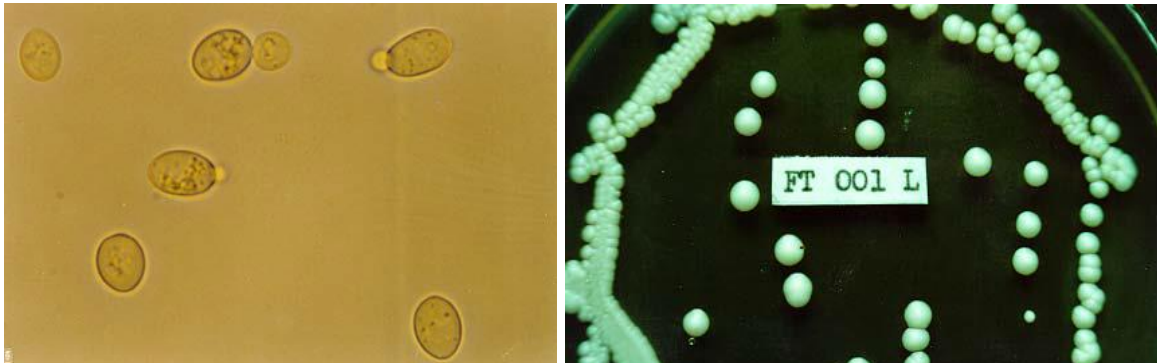


Figura 1. Células vegetativas e colônias de *Saccharomyces cerevisiae* (Fermentação alcoólica- Química Real 09.09.2011)

As leveduras podem se reproduzir por esporulação, por gemulação (ou brotamento) ou por fissão. O método mais comum é o da gemulação, onde a partir da célula-mãe é formada uma protuberância que dará origem à célula-filha, conforme mostrado na Figura 2. Durante sua vida uma célula madura produz, por gemulação, uma média de 24 células-filhas. As gemulações sucessivas são sempre formadas em locais diferentes na superfície celular, permanecendo cicatrizes das gêmulas como resultado deste processo de reprodução.



Figura 2. Brotamento em levedura (<http://www.ufrgs.br/alimentus/pao/fermentacao/reproducao.htm> 09.09.2011)

As leveduras estão presentes em vários ambientes e são utilizadas para a elaboração de vinhos, cervejas, pães e etanol através de processos fermentativos. Em biotecnologia é corrente o emprego do termo fermentação para definir reações microbianas. No conceito bioquímico, se o substrato for

completamente oxidado diz-se que há respiração e se o substrato for parcialmente degradado acarretando a formação de metabólitos diz-se que há fermentação.

A levedura como entidade viva independente, realiza a fermentação do açúcar com o objetivo de conseguir a energia química necessária à sua sobrevivência, sendo o etanol apenas e tão somente um subproduto desse processo. Entretanto, se o homem pretende beneficiar-se dessa habilidade metabólica, ele deve propiciar às leveduras, condições ideais para que as mesmas trabalhem a seu favor, isto é, com maior eficiência na produção de etanol. A célula de levedura possui compartimentações para adequação de sua atividade metabólica. A fermentação alcoólica (glicólise anaeróbia) ocorre no citoplasma, enquanto que a oxidação total do açúcar (respiração) ocorre na mitocôndria.

A transformação do açúcar (glicose) até resultar em etanol e CO_2 envolve 12 reações em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Tais enzimas sofrem ações de diversos fatores (nutrientes, minerais, vitaminas, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, pH, temperatura, etc.), alguns que estimulam, outros que reprimem a ação enzimática, afetando assim o desempenho do processo.

A fermentação alcoólica que ocorre nas dornas de fermentação para a produção de álcool ocorre em três etapas distintas.

A pré-fermentação se inicia quando o fermento (leveduras) é adicionado ao mosto devidamente preparado e se caracteriza por ativa multiplicação das células e elevação lenta e gradual da temperatura do meio. Após cinco a seis horas, com pouca espuma, inicia-se a fermentação principal, que é reconhecida pela elevação rápida da temperatura, queda da densidade do mosto por causa do desaparecimento dos açúcares e da formação equivalente do álcool. A acidez eleva-se abaixando o pH. Essa fase termina quando as espumas desaparecem, durando de nove a 10 horas (ANTONINI, 2004).

A pós-fermentação é caracterizada pela diminuição lenta e gradual da temperatura do mosto, diminuição do desprendimento do gás carbônico e não há formação de espumas. Essa fase dura de 6 a 8 horas e deve durar o mínimo

possível para evitar a infecção do vinho e do pé-de-cuba, que será utilizado em nova fermentação. O mosto totalmente fermentado é denominado vinho (ANTONINI, 2004).

Há várias maneiras de se conduzir a fermentação. O reator biológico pode ser operado de forma descontínua, semicontínua, descontínua alimentada (ou batelada alimentada) ou contínua, todos podendo trabalhar com ou sem recirculação do fermento. Atualmente no Brasil, a maior parte da produção industrial de álcool em grande escala, ocorre em processos fermentativos em batelada e contínuos, sendo que a denominação batelada na prática industrial se refere à batelada alimentada (PACHECO, 2010).

Dentre as inúmeras espécies de leveduras existentes, aquelas da espécie *Saccharomyces cerevisiae* são as mais utilizadas mundialmente quando se trata de processos fermentativos industriais. Sendo assim, suas aplicações nos processos de fermentação encontram-se bem estabelecidos. Porém outras espécies de leveduras têm sido identificadas na maioria destes processos fermentativos, ora agindo favoravelmente ao produto final, ora atuando como contaminantes e muitas vezes causando prejuízos (LOUREIRO; MALFEITO-FERREIRA, 2003). Alguns autores relatam o isolamento de outras linhagens, diferente de *S. cerevisiae* em dornas de fermentação. Leveduras como *Rhodotorula glutinis*, *Candida maltosa*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida valida*, *Candida glabrata*, *Schizosaccharomyces pombe*, *S. exiguus*, *S. unisporus*, *S. paradoxus* têm sido relatadas como isolados de destilarias de produção de cachaça (ANDRIETA, 2006).

Em escala industrial, as leveduras do gênero *Saccharomyces* têm sido largamente utilizadas para a produção de álcool por apresentarem características favoráveis para transformar açúcares em álcool (STECKELBERG, 2001). O desempenho do processo fermentativo é enormemente afetado pelo tipo de levedura utilizado (LIMA et al., 2001); o substrato ou matéria prima utilizada; o teor alcoólico desejado no produto final; a duração da fermentação; as propriedades do produto, entre outros. Assim a escolha do agente fermentador correto fornece alta eficiência na produção de álcool, além de baixa produção de glicerol e alta tolerância a diversos fatores estressantes.

Geralmente observa-se durante a fermentação, por técnicas de cariotipagem, que as linhagens que dão início ao processo são substituídas por leveduras comuns à região da destilaria, comumente denominadas de leveduras selvagens. É importante ressaltar que as leveduras selvagens podem dominar o processo ao longo da safra melhorando a eficiência na produção de álcool ou acarretando problemas na fermentação, como baixo rendimento, formação excessiva de espumas e floculação do fermento (LIMA et al., 2001).

Na produção do etanol combustível, a definição para contaminação microbiana vem paralelamente ao rendimento e produtividade. O caldo da cana de açúcar é um substrato complexo, o qual permite o crescimento de diferentes leveduras e bactérias lácticas (SOUZA-LIBERAL et al., 2007). Em uma safra, uma linhagem de levedura contaminante pode ser responsável por uma queda de 18% na produção de etanol, sendo isto equivalente a uma redução de cerca de 17 milhões de litros de etanol em uma única safra (CECCATO-ANTONINI; PARAZZI, 1996). Esta ocorrência de contaminantes pode causar redução drástica no rendimento industrial, sendo necessário que se mantenha um monitoramento constante da fermentação. Podendo este ser realizado através da morfologia celular e isolamento em meios diferenciais. Com isto, este trabalho teve como objetivo caracterizar leveduras contaminantes estabelecidas em processo fermentativo ao final da safra de 2010.

Materiais e Métodos

O trabalho foi realizado no laboratório de microbiologia da Usina Santa Adélia - Pereira Barreto - SP. Foram utilizadas: Levedura comercial do processo (I1); Leveduras contaminantes (I2 e I3); Levedura não-fermentativa (I4) e um controle sem levedura (I5).

As leveduras foram isoladas da unidade industrial de fermentação etanólica, cuja fermentação é conduzida em dornas de fermentação no processo de batelada alimentada. As amostras de vinho levedurado foram coletadas ao final da safra de 2010.

Para a caracterização dos isolados empregou-se os meios: a) WLN Agar - para enumeração de leveduras totais; b) WLN Agar + 5 ppm de actidiona - para

enumeração e isolamento de leveduras resistentes a actidiona; c) Meio de Lisina modificado pela adição de ágar por MORRIS (EDDY, 1957), pela utilização de Bacto Yeast Base - para enumeração e isolamento de leveduras selvagens não pertencentes ao gênero *Saccharomyces* (não fermentadoras) (WALTERS; THISELTON, 1953) e d) meio basal para fermentação. A descrição das características dos isolados foi realizada utilizando-se diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , para os meios de lisina e WLN Agar e WLN+actidiona; e 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} para o meio WLN Agar e WLN+actidiona. Todos os testes foram realizados em duplicata. Foram selecionadas três colônias representantes de cada padrão morfológico apresentado em WLN. As placas foram incubadas por sete dias em estufa de cultura a 35°C.

O meio de cultura utilizado para o teste de fermentação foi o meio basal de Wicherhan (1951). Nesse teste, coloca-se o tubo de Durham invertido dentro do tubo de cultura e adiciona-se 4 ml da solução basal estéril. É adicionado ao meio 2 ml do açúcar estéril, agitando lentamente. Aguardou-se um período de 24 horas para inocular as culturas a serem testadas, onde a levedura é preparada em uma solução salina estéril e inocula-se 0,1 ml. Depois de transcorrido 24 horas da inoculação interpreta-se da seguinte maneira: (+) forte: completo preenchimento do tubo de Durham com gás, no prazo de 1 a 3 dias; (+W) fraca: preenchimento parcial de gás; (-) negativa.

Resultados

Na Tabela 01 observa-se que leveduras do gênero *Saccharomyces* (I1) possuem produção de ácidos além de preenchimento completo do tubo de Durham devido à produção de gás (como pode visualizado em I1), ausência no meio cultura WLN+ e Lisina. Em I2 também foi observado um perfil parecido, porém trata-se de uma levedura contaminante devido ao crescimento no meio de cultura WLN+. As leveduras autóctones contaminantes apresentaram maior número de unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL) nos meios WLN e WLN+actidiona como pode ser visualizado na Tabela 01 para os isolados I2 e I3.

O isolado I4 foi caracterizado como uma levedura contaminante, uma vez que não apresentou produção de ácido e nem de gás; além de ausência de crescimento no meio WLN e WLN+.

TABELA 01. Número de UFC/mL de leveduras em meio WLN; WLN + actidiona; Lisina; Produção de Ácidos a partir de Glicose e Meio Livre de Vitaminas.

Meios Isolados	WLN	WLN + actidiona	Lisina	Produção Ácidos	Produção de gás
I 1 (SA1)	$1,11 \times 10^6$	Ausente	Ausente	+	+
I 2	$3,25 \times 10^7$	3×10^4	Ausente	+	+
I 3	$2,75 \times 10^6$	$1,4 \times 10^3$	Ausente	-	+W
I 4	Ausente	Ausente	$6,5 \times 10^2$	-	-
I 5	testemunha	testemunha	testemunha	-	-

(+) forte: completo preenchimento do tubo de Durham com gás, no prazo de 1 a 3 dias; (+W) fraco: preenchimento parcial de gás; (-) negativa

Na Tabela 01 e Figura 03 a levedura do processo I1 e a levedura contaminante I2 foram as que apresentaram completo preenchimento do tubo de Durham com gás. Esse resultado demonstra que a levedura contaminante (não identificada) apresentou características fermentativas adequadas ao processo industrial, dado esse que requer estudos mais aprofundados para possível isolamento e utilização no processo industrial.

O isolado I3 apresentou fraco preenchimento do tubo de Durham com gás, não apresentando boas características fermentativas. Já o isolado I4 apresentou resultados negativos, por se tratar de uma levedura não *Saccharomyces* e portanto não fermentativa e prejudicial ao processo quando encontrar condições de se instalar no mesmo (Figura 03).

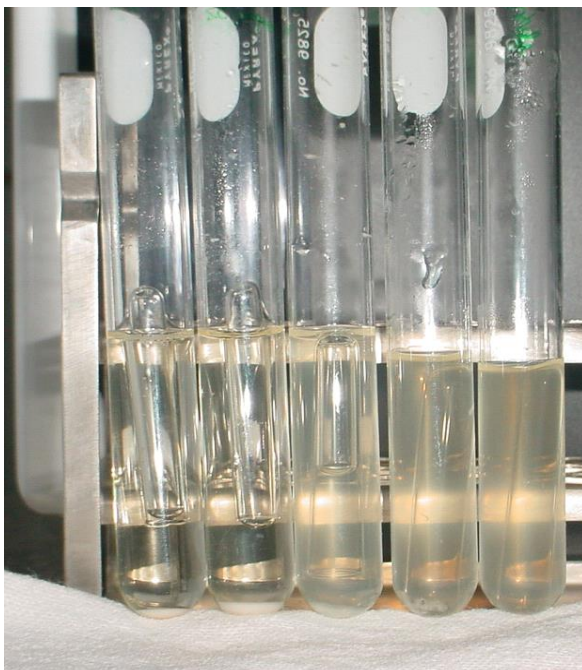


Figura 3. Teste do tubo de Durham com as leveduras isoladas ao final da safra de 2010. Da esquerda para a direita: SA1 (I1-levedura comercial do processo); I2-levedura contaminante; I3-levedura contaminante; I4- não fermentativa e I5- testemunha.

O isolado I2 apresentou boas características fermentativas, porém possui uma maior produção de massa por ser uma levedura autóctone, o que pode acarretar em excesso de células no processo causando maior consumo de insumos para o reciclo do fermento.

Discussão e Conclusões

Os dados obtidos indicam que a determinação do desempenho fermentativo pelas técnicas utilizadas, além de avaliar o desempenho industrial de isolados de levedura, pode proporcionar a diferenciação final entre cepas *S. cerevisiae* que podem ser utilizadas no processo industrial. Resultados estes que são corroborados por Andrietta et al. 2006.

Castro (1995) utilizaram o WLN para avaliação da diversidade de leveduras em usinas de açúcar e etanol. Campbell (1999) indica a análise da variação de morfologia e cor de colônias de leveduras crescidas em meio WLN como um dos

testes para distinção de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Segundo o autor, este é um teste simples e suficiente para reconhecer similaridades ou diferenças entre isolados de levedura, apesar de não fornecer informações sobre sua identidade. Podendo após essa etapa proceder o teste de fermentação com o meio basal de Wicherhan (1951), para caracterizar o potencial fermentativo de leveduras contaminantes do processo.

Com isso conclui-se que a caracterização de leveduras contaminantes é essencial para identificar leveduras com boa fermentação ou leveduras não fermentativas que possam causar prejuízos na produção de etanol.

Agradecimentos

À Usina Santa Adélia Pereira Barreto pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.

REFERÊNCIAS

- ALQUATI, P. H. **Caracterização e controle de micro-organismos contaminantes em microdestilaria de álcool**. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 1990.
- ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, M. G. S. **Bioetanol-Brasil, 30 anos na vanguarda**. Multiciência, Universidade de Campinas, 2006.
- ANGELIS, D. F. **Contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. Disponível em:
<http://www.cca.ufscar.br/~vico/Contaminacao%20bacteriana%20na%20fermentacao%20etanolica.pdf>.
- ANTONINI, S.R.C. **Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. Universidade Federal de São Carlos, Depto. Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Econômica Rural, Centro de Ciências Agrárias, São Carlos, SP, Brasil, 2004.
- BATISTA, A.S. **Saccharomices cerevisiae em milho armazenado e o efeito na redução de aflatoxicoses**. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP, Brasil, 2001.
- BERTELLI, L.G. **"A verdadeira História do Proálcool"**. Disponível em:
<http://www.biodieselbr.com/proalcool/historia/proalcool-historia-verdadeira.html>.

BORZANI, W., SCHIMIDELL, W., LIMA, U., AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial: Fundamentos**, v.1, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001.

Campbell, I. **Detection and identification of yeasts**. Technical Quaterly, v.8, p. 129-133, 1971 1999.

CASTRO, M.M.S. **Leveduras contaminantes do processo de fermentação alcoólica; diversidade taxonômica e metabólica**. Campinas, 1995. 124 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas.

CECCATO-ANTONINI, S. R.; PARAZZI, C. **Isolamento de levedura selvagem floculante e efeitos da contaminação em processo de fermentação etanólica continua**. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TECNICOS AÇUCAREIROS DO BRASIL, Maceió, 1996. **Anais**. Maceió: STAB, 1996. p. 23-29.

GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. Tese de Doutorado. Universidade de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, Brasil, 1989.

LIMA, U. A., BASSO, L. C., AMORIM, H. V. **Produção de Etanol**. In: SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**, v.3, capítulo 1, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001.

LIMA, U. de A., AQUARONE, E., BORZANI, W. **Tecnologia das Fermentações**. v.1, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 1986.

LOUREIRO, V.; MALFEITO-FERREIRA, M. **Spoilage yeasts in the wine industry**. International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v.86, p. 23-50, 2003.

LUDWING, K. M., OLIVA-NETO, P. de, ANGELIS, D. F. **Quantificação da floculação de *S. cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 21, p. 63-68, Jan./Abr., 2001.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA – Disponível em:
<http://www.mme.gov.br/mme/menu/comunicacao/noticias.html>. Acessado em 09 Setembro de 2011.

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

MUTTON, M.J.R. **Reflexos da qualidade da matéria-prima sobre a fermentação etanólica.** Workshop sobre: “Produção de etanol: qualidade de matéria-prima”. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil, 2003.

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

PACHECO, T. F. **Fermentação Alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente.** Tese de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, Uberlândia, MG, Brasil, 2010.

Química Real – Fermentação alcoólica volume 02.

SILVA, R.B.O. **Leveduras contaminantes na produção de etanol industrial por processo contínuo: quantificação e identificação.** 1994. 145p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1994.

SOUZA-LIBERAL, A.T.; SILVA FILHO, E.A.; MORAIS, J.O.F.; SIMOES, D.A.; MORAIS Jr, M.A. **Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR.** Letters in Applied Microbiology. Oxford. V. 40. p. 19-23, 2005.

STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP, Brasil, 2001.

União da Indústria de cana de açúcar – **ÚNICA** – Disponível em: <http://www.unica.com.br/noticias/>. Acesso em 09 Setembro 2011.

Contato:

Ricardo Luis de Sousa

E-mail: ricardobiomedicina@gmail.com