

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Gabriel Torres de Sousa

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA ENZIMA POLIFENOLOXIDASE NA
PRODUÇÃO DE ETANOL**

Buri

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Gabriel Torres de Sousa

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA ENZIMA POLIFENOLOXIDASE NA
PRODUÇÃO DE ETANOL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como exigência parcial para a obtenção do grau
de Bacharel em Engenharia de Alimentos na
Universidade Federal de São Carlos.

Orientação: Prof. Dra. Isabelle Cristina Oliveira
Neves

Co-orientador: Prof. Dra. Thaís Jordânia Silva

Sousa, Gabriel Torres de

Avaliação da influência da enzima polifenoloxidase na produção de etanol / Gabriel Torres de Sousa -- 2024. 30f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos, campus Lagoa do Sino, Buri

Orientador (a): Dra. Isabelle Cristina Oliveira Neves

Banca Examinadora: Dra. Isabelle Cristina Oliveira Neves, Dra. Thaís Jordânia Silva, Dr. Sérgio Henrique Silva

Bibliografia

1. Produção de etanol. 2. Polifenoloxidase. 3. Inativação.

I. Sousa, Gabriel Torres de. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Lissandra Pinhatelli de Britto - CRB/8 7539

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gabriel Torres de Sousa

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA ENZIMA POLIFENOLOXIDASE NA PRODUÇÃO DE ETANOL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de São Carlos.

Aprovado em: 26/01/2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **ISABELLE CRISTINA OLIVEIRA NEVES**
Data: 26/01/2024 09:30:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Isabelle Cristina Oliveira Neves
Universidade Federal de São Carlos

Documento assinado digitalmente
 **THAIS JORDANIA SILVA**
Data: 26/01/2024 09:42:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Thaís Jordânia Silva
Universidade Federal de São Carlos

Documento assinado digitalmente
 **SERGIO HENRIQUE SILVA**
Data: 26/01/2024 09:33:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Sérgio Henrique Silva
Universidade de São Paulo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir a realização deste grande sonho, por responder a minha fé e estar ao meu lado em todos os momentos.

Agradeço ao meu pai e minha mãe pela confiança, apoio e amor que sempre depositaram em mim, pelo sacrifício realizado diariamente e por acreditarem em mim na busca por um sonho.

Agradeço a minha companheira Gabi, pelo apoio incondicional sempre presente, cada abraço e palavra de carinho que me fortalece desde 2018.

Agradeço a exímia professora Dra. Isabelle Neves por me apoiar, orientar e ser uma profissional exemplo nesta importante jornada de difusão do saber.

Agradeço a República K-Zona e as amigas nela forjadas, aos momentos bons, ruins e aprendizados vivenciados em conjunto.

Agradeço a UFSCar e todo corpo docente pela oportunidade e ensinamentos.

A todos citados acima, bem como aqueles que participaram direta e indiretamente da minha formação, meu muito obrigado.

RESUMO

SOUSA, Gabriel Torres. Avaliação da influência da enzima polifenoloxidase na produção de etanol. 2024. 29p. Trabalho de Conclusão de Curso Graduação em Engenharia de Alimentos – Universidade Federal de São Carlos, Buri, 2024.

A produção de etanol a partir de cana-de-açúcar exerce um importante papel econômico, social e ambiental no Brasil, gerando renda e desenvolvimento no país que é a referência mundial na produção de biocombustíveis e energia renovável. Entre as diversas etapas e características da produção de etanol, pode-se observar a ocorrência da reação de escurecimento enzimático logo após a moagem da cana-de-açúcar, sendo esta catalisada pela polifenoloxidase (PFO) naturalmente presente no vegetal. Esta enzima entra em contato com seus substratos e oxigênio logo após a extração do caldo e desencadeia uma série de reações químicas produzindo, entre outros, compostos fenólicos e poliméricos que geram lodo e conferem cor escura ao mosto de cana. Neste cenário, a motivação deste estudo foi avaliar a influência da reação de escurecimento enzimático e seus produtos na produção de etanol a partir da fermentação do caldo de cana-de-açúcar sob diferentes concentrações da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e inativação térmica da enzima PFO antes da etapa de moagem. Os resultados obtidos mostraram que a inativação térmica da enzima proporcionou menor geração de lodo no mosto de cana, aspecto positivo para a produção alcoólica. A inativação enzimática não representou ganhos produtivos de etanol no estudo realizado, mesmo em diferentes concentrações de levedura. A obtenção média de destilado dos tratamentos sem tratamento térmico (STT) com 0,5 g/L de levedura, STT com 1,0 g/L de levedura e com tratamento térmico (CTT) com 1,0 g/L de levedura não apresentou diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Contudo, a amostra CTT com 0,5 g/L de levedura apresentou produção de destilado estatisticamente inferior às demais, indicando que o severo tratamento térmico aplicado nas amostras CTT no início do processo pode ter eliminado grande maioria de leveduras selvagens naturalmente presentes no vegetal, diminuindo o volume de etanol produzido durante a fermentação. Conclui-se que a inativação térmica da PFO não influencia no volume de etanol produzido pela fermentação do caldo de cana pela *Saccharomyces cerevisiae* em concentrações de 1,0 g/L de levedura.

Palavras-chave: Etanol. Fermentação. Polifenoloxidase. Escurecimento enzimático. Cana-de-açúcar.

ABSTRACT

SOUSA, Gabriel Torres. Evaluation of the Influence of Polyphenol Oxidase Enzyme on Ethanol Production. 2024. 29p. Undergraduate Thesis in Food Engineering – Federal University of São Carlos, Buri, 2024.

The production of ethanol from sugarcane plays a crucial economic, social, and environmental role in Brazil, generating income and development in a country that is a global benchmark in biofuel and renewable energy production. Among the various stages and characteristics of ethanol production, the occurrence of enzymatic browning reaction can be observed shortly after sugarcane milling, catalyzed by the naturally present polyphenoloxidase (PFO) enzyme in the plant. This enzyme comes into contact with its substrates and oxygen immediately after juice extraction, triggering a series of chemical reactions that produce, among other compounds, phenolic and polymeric substances that generate sludge and impart a dark color to the sugarcane must. In this context, the motivation for this study was to evaluate the influence of the enzymatic browning reaction and its products on ethanol production through the fermentation of sugarcane juice under different concentrations of *Saccharomyces cerevisiae* yeast and thermal inactivation of the PFO enzyme before the milling stage. The results obtained showed that the thermal inactivation of the enzyme led to a lower generation of sludge in the sugarcane must, a positive aspect for alcohol production. Enzymatic inactivation did not result in increased ethanol production in the study, even at different yeast concentrations. The average distillate yield from treatments without thermal treatment (STT) with 0.5 g/L of yeast, STT with 1.0 g/L of yeast, and with thermal treatment (CTT) with 1.0 g/L of yeast showed no statistical difference by the Tukey test ($p < 0.05$). However, the CTT sample with 0.5 g/L of yeast showed statistically lower distillate production than the others, indicating that the severe thermal treatment applied to the CTT samples at the beginning of the process may have eliminated a large majority of naturally occurring wild yeasts in the plant, reducing the volume of ethanol produced during fermentation. It is concluded that the thermal inactivation of PFO does not influence the volume of ethanol produced by the fermentation of sugarcane juice by *Saccharomyces cerevisiae* at yeast concentrations of 1.0 g/L.

Keywords: Ethanol. Fermentation. Polyphenol Oxidase. Enzymatic Browning. Sugarcane.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação de escurecimento enzimático catalisada pela PFO	13
Figura 2 - Fluxograma da obtenção de etanol	13
Figura 3 - Diagrama de Cobenze	17
Figura 4 - Fluxograma da metodologia utilizada no experimento.....	19
Figura 5 - Caldo de cana sem tratamento térmico (esquerda) e com tratamento térmico (direita)	21
Figura 6 - Avaliação visual das amostras após 12 horas de fermentação a 32 °C	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados analíticos	21
Tabela 2 - Análise de variância (ANOVA)	23
Tabela 3 - Teste de médias Tukey ($\alpha=0,05$)	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PFO	Polifenol oxidase
CTT	Com tratamento térmico
STT	Sem tratamento térmico
TSS	Teor de sólidos solúveis

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 OBJETIVOS.....	10
2.1 OBJETIVO GERAL.....	10
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	10
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	10
3.1 CANA-DE-AÇÚCAR	10
3.2 POLIFENOLOXIDASE.....	11
3.3 ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO.....	12
3.4 PRODUÇÃO DE ETANOL	13
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4.1 MATERIAIS	15
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	15
4.3 INATIVAÇÃO DA PFO E EXTRAÇÃO DO CALDO DE CANA.....	16
4.4 PADRONIZAÇÃO E FERMENTAÇÃO DO CALDO DE CANA.....	16
4.5 DESTILAÇÃO SIMPLES DO CALDO DE CANA FERMENTADO	17
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1 INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA: UMA ANÁLISE EMPÍRICA	20
5.2 RESULTADOS ANALITICOS OBTIDOS APÓS AS ETAPAS DE FERMENTAÇÃO E DESTILAÇÃO	21
6 CONCLUSÕES	24
REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

A *Saccharum officinarum* L., espécie vegetal pertencente à família Poaceae, popularmente conhecida como cana-de-açúcar, é uma cultura antiga e relevante na história mundial. Trata-se de uma planta de formato cilíndrico, fina, com folhas grandes e alta concentração de sacarose em seus colmos. Apesar de sua origem ainda ser tema de discussão, acredita-se que seu surgimento ocorreu na Ásia em meados de 510 a.C., favorecido pelo clima tropical e subtropical de algumas partes da região, condição climática de preferência da espécie (Rodrigues; Ross, 2020). Tão grande quanto sua história é a importância social da cana-de-açúcar. Há séculos esta é a principal fonte de açúcar à humanidade, contribuindo ativamente com a nutrição de diversos povos. Além disso, junto ao milho, é uma matéria-prima utilizada para a produção do etanol no mundo contemporâneo, fonte energética considerada o biocombustível do futuro (BNDES, 2008).

O etanol, o açúcar e a energia elétrica são os principais produtos obtidos a partir do processamento da cana-de-açúcar. O Brasil é o maior produtor da cultura no mundo, estimando-se para a safra de 23/24 uma produção superior a 677 milhões de toneladas, com geração de açúcar alcançando a maior marca produtiva já registrada no país, superior a 46 milhões de toneladas. Além disso, a estimativa de produção de etanol hidratado encontra-se próxima a 28 bilhões de litros, alta de 5,5% em relação à safra anterior (Conab, 2023).

O etanol, também chamado de álcool etílico, é um composto orgânico representado pela fórmula molecular C_2H_6O , obtido a partir da ação fermentativa de microrganismos sob açúcares, em especial linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Pereira, Macri e Gimenez, 2020). Considerado um combustível renovável, representa grande importância na matriz energética brasileira, mas também é amplamente utilizado nas indústrias alimentícia, farmacêutica, química, automobilística, entre outros (Lima; Marcondes, 2002). O destaque brasileiro no setor traz consigo a necessidade frequente de evolução do segmento, com novas tecnologias, práticas e inovações que tornem o ciclo produtivo deste importante produto cada vez mais rentável e sustentável (BNDES, 2008).

A produção de etanol a partir de cana-de-açúcar envolve diversos fenômenos físicos e químicos. Entre as várias etapas e transformações do processo, pode-se perceber facilmente a ocorrência da reação de escurecimento enzimático no caldo de cana extraído, ocorrendo majoritariamente em virtude da catalização promovida pela enzima polifenol oxidase (PFO), naturalmente presente na cana. Durante a etapa de moagem para obtenção do caldo, as estruturas celulares do vegetal são danificadas expondo a PFO a seus substratos, compostos fenólicos também presentes de forma natural na espécie. O encontro de enzima, substrato e

oxigênio desencadeia uma série de reações químicas no caldo de cana recém obtido, produzindo compostos que conferem características ao produto, como alteração da cor e geração de lodo (Azevedo *et al.*, 2019).

A não existência de estudos relacionados à avaliação da influência do escurecimento enzimático e seus subprodutos, causado pela ação da PFO em processos fermentativos, na produção de etanol a partir de cana-de-açúcar, motivou a realização deste estudo, buscando-se avaliar a ocorrência da reação de escurecimento enzimático no caldo de cana-de-açúcar, sua influência sobre o volume de etanol produzido e outros aspectos do processo fermentativo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

A realização deste estudo teve objetivo de avaliar a produtividade de etanol hidratado produzido a partir de cana-de-açúcar mediante a inativação térmica da enzima PFO, avaliando empiricamente a atividade enzimática e se esta interfere no volume de etanol produzido após a fermentação, para diferentes concentrações de levedura fermentativa.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Submeter os toletes de cana-de-açúcar a um tratamento térmico pré-moagem para inativação da enzima PFO;
- Processar a matéria-prima para obtenção do mosto a ser utilizado na etapa de fermentação;
- Submeter o mosto à fermentação, variando a concentração de levedura utilizada;
- Realizar o processo de destilação simples do vinho fermentado;
- Avaliar o volume de etanol hidratado produzido a partir de cana-de-açúcar e coletado na etapa de destilação.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 CANA-DE-AÇÚCAR

De forma e estrutura bem definidas, algumas características marcam a morfologia da cana-de-açúcar. Caule fino, estrutura fibrosa, folhas compridas e alta concentração de sacarose em seus colmos são algumas características da *Saccharum officinarum L.*, nome científico da espécie (James, 2004). A cana pertence à família Poaceae, assim como outras culturas de grande relevância como milho, trigo e cevada, por exemplo. Suas plantas são formadas por raízes e

rizomas na parte subterrânea e caule dividido por colmos e folhas na parte vegetativa. As raízes finas, ramificadas e pouco profundas exercem papel importante no fornecimento de água e nutrientes ao caule. Já o caule, também chamado de colmo, é a parte de maior interesse econômico da planta. Esta área é dividida em nós e internódios. No colmo há presença de gemas, que durante o desenvolvimento da planta darão origem a novos brotos e novas raízes se plantados. Já as folhas são presas no colmo na região dos internódios; seu comprimento e largura podem variar de 0,5 a 1,5 m e 2,5 e 10 cm, respectivamente. Suas funções são de grande importância à planta, desempenhando papel de proteção das gemas além da captação de luz solar para processos metabólicos (Silva, 2021).

A cana-de-açúcar é composta majoritariamente por água, representando entre 65 e 75% m/m de sua composição total, somada às fibras (8 e 14% m/m) e sacarose (10 e 17% m/m), que completam a lista dos seus principais constituintes. Outros compostos como proteínas com função estrutural e enzimática, compostos fenólicos, carboidratos e minerais também participam e têm função importante na composição bioquímica da cana (BNDES, 2008). O cultivo em escala comercial da cana-de-açúcar encontra excelência em zonas de clima tropical e/ou subtropical, onde existe abundância de luz solar durante todo o ciclo de vida da planta, precipitações ou irrigação artificial no período de crescimento, além de clima relativamente seco nas fases de maturação e pré-colheita (James, 2004).

No Brasil, estima-se que a cana chegou nas regiões litorâneas por volta do século XVI pelas mãos portuguesas, que encontraram no país fatores que favoreceram seu cultivo como solos férteis, águas profundas, temperaturas quentes, relevos planos e mão de obra indígena abundante (Rodrigues; Ross, 2020). Desde então, a cultura foi difundida para o interior do país, tornando o Brasil o maior produtor mundial da cultura na safra 2021/2022, maior produtor mundial de açúcar e segundo maior produtor mundial de bioetanol (Brasil, 2023). Números tão expressivos carregam consigo avanços sociais importantes. Segundo a Federação da Agricultura e Pecuária do estado de São Paulo, a cultura de cana foi destaque na geração de empregos em 2022, sendo responsável pela criação do maior número de vagas de trabalho do setor agrícola em determinados períodos do ano no estado (Faesp, 2022).

3.2 POLIFENOLOXIDASE

As enzimas são proteínas que exercem função catalítica em reações químicas, acelerando e tornando possíveis diversas transformações bioquímicas. Desempenham um papel fundamental para a vida e encontram-se naturalmente presentes em plantas e animais (Pereira, 2010). A polifenoloxidase (PFO), enzima do grupo das oxirredutases, ocorre de forma

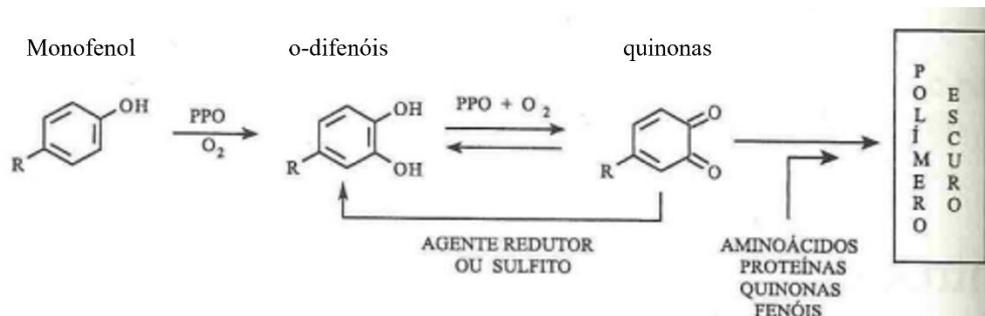
abundante em diversos vegetais, sendo sua principal função a catalisação de reações químicas que envolvem a oxidação de compostos fenólicos, reações popularmente conhecidas como escurecimento enzimático. Estas enzimas estão presentes nos tecidos celulares vegetais isoladas de seus substratos e são liberadas quando os tecidos são rompidos ou danificados (Alvarenga *et al.*, 2011). Sua presença é relevante para o metabolismo de vegetais, principalmente para o sistema de defesa das plantas, uma vez que os produtos gerados nas reações de escurecimento enzimático são tóxicos para microrganismos e patógenos. Ainda, segundo Alvarenga *et al.* (2011) e Brondani *et al.*, (2003), as quinonas geradas no processo de escurecimento enzimático têm a função de se concentrar em áreas atacadas e/ou danificadas e agir como um potente bactericida e fungicida, sendo altamente tóxicas para microrganismos invasores. Além disso, as reações catalisadas pela PFO podem ter caráter tecnológico, exercendo papel importante na alteração desejável de propriedades organolépticas em alguns alimentos como chás, cacaus, ameixas, entre outros. Alterações indesejáveis também podem ocorrer pela ação da enzima, como o escurecimento enzimático de vegetais e crustáceos (Nabechima, 2010).

A PFO não pertence à classe de enzimas termorresistentes, podendo ser desnaturada quando submetida ao calor, por exposições a curtos períodos de tempo (Nabechima, 2010). Estudos como o de Gonçalves *et al.* (2015) e Valderrama, Fabiane e Clemente (2001) mostraram que temperaturas entre 75 e 100 °C por períodos de 3 a 10 minutos geralmente foram suficientes para a destruição completa de suas funções catalíticas. A depender do tempo e temperatura de aquecimento, a desnaturação enzimática por via térmica inativa a função catalítica da enzima de forma irreversível, promovendo alterações estruturais no sítio catalítico da proteína, desenovelando-a e anulando sua ação (Nabechima, 2010).

3.3 ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO

A reação de escurecimento enzimático ocorre naturalmente em vegetais por meio de enzimas e substratos presentes no meio, podendo ser observada durante o desenvolvimento normal do vegetal, causando alterações características como mudança de cor em função do estágio de maturação pelo desenvolvimento de pigmentos escuros e alteração de textura, sabor e aroma; ou acidentalmente, provocando danos e avarias nos tecidos vegetais (Koblitz, 2008). Segundo Araújo (2008), em vegetais, quando sua ocorrência é por via acidental, o escurecimento enzimático inicia-se após o rompimento ou danificação do tecido celular, onde ocorre liberação de PFO. No citoplasma, a enzima encontra seus substratos, os monos ou difenóis, e então catalisa a reação de escurecimento enzimático, como esquematizado na figura 1.

Figura 1 - Reação de escurecimento enzimático catalisada pela PFO



Fonte: Araújo, 2008.

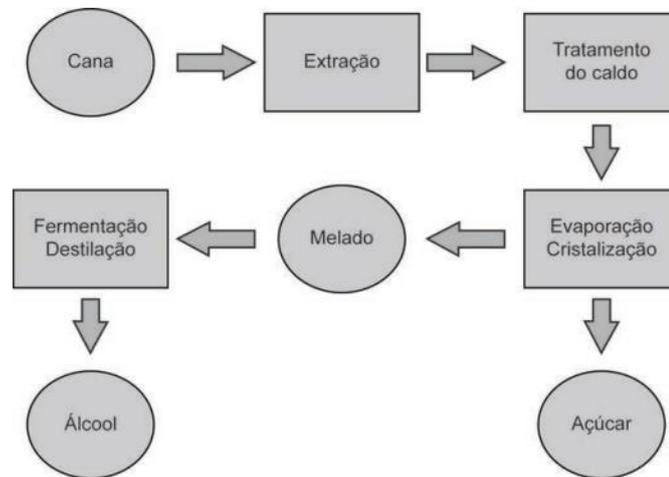
Inicialmente, monofenóis (fenóis) são convertidos a o-difenóis (catecóis) pela ação catalítica da PFO na presença de oxigênio. Em seguida, os catecóis recém gerados passam por outra reação, gerando as orto-quinonas, sendo esta etapa também dependente da catalisação enzimática e da presença de oxigênio. A partir deste ponto, as reações seguintes ocorrem de forma espontânea, não sendo mais dependentes da PFO e O_2 . As orto-quinonas são altamente instáveis e reagem com outros compostos presentes no meio como aminoácidos, proteínas, quinonas e fenóis, produzindo polímeros de coloração escura, como a melanina, composto responsável pela alteração da cor dos vegetais (Araújo, 2008).

3.4 PRODUÇÃO DE ETANOL

O etanol, composto orgânico de fórmula molecular $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, é um importante e versátil produto químico para a humanidade. Tendo diferentes aplicações, pode-se citar seu amplo uso desde a revolução industrial na indústria alimentícia, farmacêutica, química e de combustíveis (Lopes *et al.*, 2011).

Segundo Lopes *et al.* (2011), o etanol pode ser obtido por via fermentativa a partir de diversas matérias-primas ou sintetizado quimicamente a partir de produtos minerais. No Brasil, sua produção é majoritariamente oriunda de caldo de cana-de-açúcar por meio de um processo fermentativo desempenhado por leveduras, um tipo de fungo amplamente espalhado pela natureza. A figura 2 mostra o fluxograma simplificado de produção de etanol a partir da cana-de-açúcar.

Figura 2 - Fluxograma da obtenção de etanol



Fonte: Lopes et al., 2011

Para a produção de etanol, a cana recém-chegada à indústria passa por etapas como lavagem, extração e tratamento do caldo, evaporação, fermentação e destilação. Na lavagem, a cana é descarregada em esteiras que injetam água sobre a superfície do vegetal, removendo sujidades e objetos estranhos provenientes da colheita e transporte. Na etapa de extração, a cana é desfibrilada e passa por uma sequência de grandes moendas com embebição de água para extração do caldo. O bagaço gerado pode ser encaminhado para geração de energia, enquanto o caldo segue para tratamento. Tratar o caldo é importante para produção de etanol e açúcar. O objetivo desta etapa é diminuir a carga microbiana, remover sujidades, clarear por meio de separação de compostos em suspensão e padronizar o teor de açúcares (para fermentação). Em seguida, com o caldo tratado, o mesmo pode ser encaminhado para fabricação de açúcar ou etanol. No caso do combustível, leveduras são adicionadas para a etapa de fermentação, onde o microrganismo converte açúcares em etanol e CO_2 . O produto obtido da fermentação, chamado vinho fermentado, possui etanol em sua composição, que será separado pela destilação. Basicamente, o vinho fermentado é aquecido a aproximadamente $78\text{ }^{\circ}C$ (temperatura de ebulição do etanol) para que o composto se volatilize e seja separado do vinho. Um processo de resfriamento condensa o gás, obtendo-se etanol hidratado na sua forma líquida (Chieppe, 2012).

As etapas de tratamento do caldo e fermentação representam grande importância para o processo, visto que seu correto andamento se relaciona diretamente com a eficiência produtiva. No tratamento do caldo, etapas como a padronização do teor de sólidos solúveis de

acordo com características do processo, diminuição da carga microbiana e separação de lodo são importantes para a efetiva ação da levedura durante a fermentação (Chieppe, 2012).

Na fermentação, o microrganismo fermentativo em contato com açúcares presentes no caldo tratado realiza diversos processos metabólicos que, entre outros, promovem sua multiplicação celular e produzem gás carbônico e etanol. Geralmente, para a produção em escala industrial, utiliza-se cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* devido à sua alta produtividade e flexibilidade nas condições específicas deste processo (Lopes *et al.*, 2011).

A eficiência da *Saccharomyces cerevisiae* pode ser associada ao controle de diversas condições do meio fermentativo, como temperatura (ótima entre 28 e 32°C) e pH (ótimo entre 4,0 e 6,0), disponibilidade de açúcares, microrganismos competidores, compostos inibidores, entre outros (Pereira, Macri e Gimenez, 2020). O não controle destas condições pode afetar o processo, desfavorecendo a ação fermentativa da levedura e conseqüentemente ocasionando um menor rendimento de produto. Colombi *et al.* (2017) observaram o poder de inibição de substâncias sob os processos metabólitos da *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação, como ácidos fracos, derivados furanos e quinonas, apontando o último como um dos inibidores mais potentes observados. Os inibidores diminuem consideravelmente o rendimento e a produtividade de etanol por comprometer diretamente o desempenho dos microrganismos, causando menor taxa de absorção de açúcares e, conseqüentemente, menor geração do produto.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Os experimentos foram executados nos laboratórios da Universidade Federal de São Carlos, Campus Buri, em dezembro de 2023, utilizando estrutura, utensílios e equipamentos do local para as análises realizadas. As amostras de cana-de-açúcar utilizadas no experimento foram da variedade RB966928, colhidas maduras em uma unidade produtora situada no município de Piracicaba – SP. Para a etapa de fermentação do caldo, utilizou-se a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA-11, levedura seca e ativa destinada para produção de etanol.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi conduzido em um esquema fatorial completo 2x2, variando-se a concentração da levedura fermentativa de acordo com a indicação do fabricante (0,5 g/L ou 1,0 g/L) e a aplicação ou não da etapa de inativação enzimática por via térmica, com três repetições

em cada tratamento. Os tratamentos foram nomeados como STT (sem tratamento térmico prévio) e CTT (com tratamento térmico prévio).

4.3 INATIVAÇÃO DA PFO E EXTRAÇÃO DO CALDO DE CANA

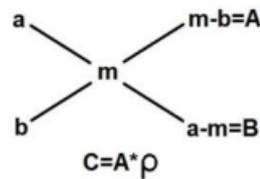
Inicialmente, as amostras de cana-de-açúcar foram lavadas em água corrente e cortadas na sua região nodal em pedaços de aproximadamente 30 centímetros, utilizando uma lâmina de serra metálica (STARRETT BS1224, Brasil). Os pedaços foram mesclados e, então, separados em 2 grupos com massa semelhante, denominados STT e CTT. O grupo CTT passou por um tratamento térmico antes da moagem, por meio do qual objetivou-se a inativação térmica da polifenoloxidase. O tratamento térmico aplicado ao grupo CTT consistiu em imergir e manter os toletes de cana em água a 98 °C, por 10 minutos, em banho-maria digital (SolidSteel, SSD-20L, Brasil). Acoplou-se um termômetro em um dos toletes de cana para verificação da temperatura interna da amostra durante o processo. O grupo STT seguiu para a etapa de moagem logo após a lavagem.

Em seguida, para a extração do caldo, ambas as amostras foram moídas em um engenho elétrico (Botini B120, Brasil) previamente higienizado. As amostras do grupo CTT foram as primeiras a passar pelo processo de extração, buscando evitar o contato de enzimas não inativadas do grupo STT com o extrato tratado termicamente. Logo após, as amostras do grupo STT passaram pelo mesmo processo. Entre as extrações dos grupos CTT e STT, foi realizada a higienização do equipamento com água corrente.

4.4 PADRONIZAÇÃO E FERMENTAÇÃO DO CALDO DE CANA

Após a moagem, os extratos CTT e STT foram aquecidos a 100 °C por 5 minutos. Esta etapa buscou diminuir a carga microbiana inicial das amostras, evitando que microrganismos indesejáveis exercessem influência sobre o processo fermentativo. Em seguida, deixou-se resfriar até temperatura ambiente. Com os extratos resfriados, foi realizada a padronização do teor de sólidos solúveis (TSS) do caldo de cana de ambas as amostras à 16 ° Brix, utilizando água desmineralizada. Para isso, a proporção entre as partes foi calculada pelo diagrama de Cobenze, detalhado na Figura 3, onde a e b representam o TSS (° Brix) do caldo de cana e da água, respectivamente, m o TSS (° Brix) desejado, A é massa do caldo (g), B é a massa da água (g), C é o volume de caldo (mL) e ρ é a densidade do caldo (g/mL). O teor de sólidos solúveis foi determinado utilizando um refratômetro analógico (Vodex VX2832SG, Brasil), previamente calibrado com água destilada. A densidade do caldo foi determinada medindo-se a massa exata de 1000 μ L de caldo de cana em balança analítica (Shimadzu ATY224, Brasil).

Figura 3 - Diagrama de Cobenze



Fonte: Autor, 2024.

Os extratos padronizados foram divididos igualmente em 4 recipientes: 2 recipientes de 1 litro cada com a amostra CTT e 2 recipientes de 1 litro cada com a amostra STT. Em cada recipiente, adicionou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* nas proporções de 0,5 g/L ou 1,0 g/L. A levedura adicionada em cada amostra foi previamente solubilizada e aclimatada em 50 mL compostos de água desmineralizada e caldo de cana-de-açúcar padronizado retirado das próprias amostras, na proporção de 9:1, respectivamente. Esse extrato foi deixado a 38 °C por 5 minutos e, em seguida, adicionado em cada tratamento. Após a adição da levedura, as amostras foram suavemente homogeneizadas e transferidas para garrafas plásticas esterilizadas com capacidade máxima de 500 mL. Cada garrafa recebeu 250 mL de extrato de cana-de-açúcar com a levedura adicionada, sendo posteriormente identificada de acordo com o tratamento, ou seja, CTT ou STT e concentração de *Saccharomyces cerevisiae* em gramas por litro. Ao final desta etapa, utilizou-se bexigas na boca das garrafas para análise visual da geração de gás formado durante a fermentação.

As amostras acondicionadas e identificadas foram encaminhadas para uma incubadora tipo B.O.D. (EletroLab EL202, Brasil) onde permaneceram por 12 horas a 32 °C, seguidas por mais 6 horas a 38 °C. Após o período de fermentação, mediu-se o teor de sólidos solúveis (TSS) residual de cada amostra utilizando-se um refratômetro analógico (Vodex VX2832SG, Brasil), observando também a produção de CO₂ pelo enchimento das bexigas.

4.5 DESTILAÇÃO SIMPLES DO CALDO DE CANA FERMENTADO

Após a etapa de fermentação, encaminhou-se cada tratamento para o processo de destilação simples, realizado em bancada, utilizando um balão de fundo redondo com 4 pedras de ebulição, acoplado a um condensador tipo Liebig com duas juntas ligadas à circulação de água, e uma manta aquecedora (ION SKU 30120-02, Brasil). Cada amostra foi depositada integralmente no balão, aquecida até ebulição e mantida em 90 °C até que não houvesse mais

observação de condensação do destilado. A temperatura durante a destilação foi acompanhada com o auxílio de um termômetro de mercúrio posicionado na saída da cabeça de destilação. O líquido obtido durante a destilação foi recolhido em uma proveta de vidro graduada de 25 mL. A duração média do processo de destilação de cada amostra foi de aproximadamente 1 hora. A temperatura superior ao ponto de ebulição do etanol foi aplicada em virtude da não observação do líquido condensado à 80 °C. A Figura 4 mostra as etapas da metodologia aplicada ao experimento.

Figura 4 - Fluxograma da metodologia utilizada no experimento



Fonte: Autor, 2024.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos para o volume de etanol coletado após a etapa de destilação do vinho fermentado foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, ambos a 5% de significância, utilizando o *software* Sisvar (versão 5.6).

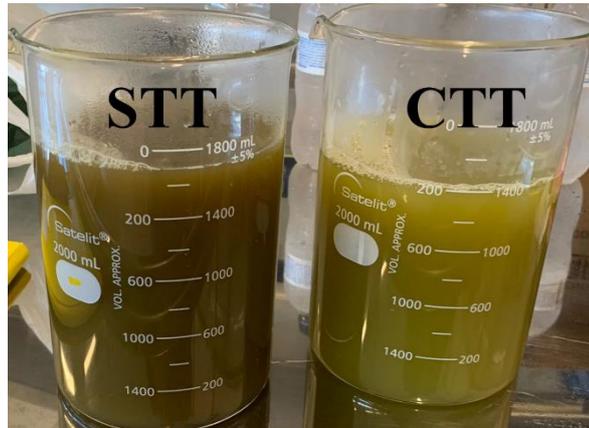
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA: UMA ANÁLISE EMPÍRICA

Diversos estudos evidenciaram a eficiência da aplicação de tratamento térmico na inativação da enzima PFO em extratos vegetais. Gonçalves *et al.* (2015) mostraram que o aquecimento de água de coco a 100 °C por 3 minutos foi suficiente para a inativação de 100% da carga enzimática de PFO naturalmente presente no meio. Valderrama, Fabiane e Clemente (2001) demonstraram a inativação da PFO em extratos de polpa e casca de maçãs, anulando 100% de sua atividade enzimática sob o tratamento térmico de 75 °C por 10 minutos. Já Fortea *et al.* (2009) promoveram a inativação de mais de 90% de PFO do extrato de uvas de mesa, aplicando o tratamento térmico de 78 °C por 5 minutos. Tais estudos utilizaram metodologias analíticas para a determinação da atividade enzimática da PFO após os tratamentos térmicos aplicados, em que se faz necessário a utilização de reagentes que não estavam disponíveis durante a realização do presente estudo. Desta forma, considerou-se empiricamente que os tratamentos identificados como CTT, aquecidos a 98 °C/10 min, não apresentavam atividade enzimática de PFO, baseando-se no rigoroso tratamento térmico aplicado. Uma evidência para este fato é a análise visual de cor das amostras pós-tratamento térmico, onde não foi observado o escurecimento do caldo de cana ao longo do tempo (Figura 5). Visto que o processo de escurecimento enzimático causado pela PFO em extratos vegetais produz, entre outros, grande quantidade de melanoidinas, este composto polimérico é responsável por conferir cor escura ao extrato onde esta reação ocorreu, quando comparado ao seu aspecto natural (Araújo, 2008).

A figura 5 traz uma análise visual das amostras CTT e STT. A primeira (CTT) apresentou cor mais clara e natural, quando comparada à amostra STT, demonstrando que o tratamento térmico aplicado foi adequado para a não ocorrência das reações de escurecimento enzimático catalisadas pela PFO. A amostra STT apresentou, além de coloração mais intensa, maior presença de lodo em suspensão, favorecido pelo agrupamento dos compostos poliméricos gerados nas reações de escurecimento enzimático (Alvarenga *et al.*, 2011).

Figura 5 – Caldo de cana STT (esquerda) e CTT (direita)



Fonte: Autor, 2024.

5.2 RESULTADOS ANALITICOS OBTIDOS APÓS AS ETAPAS DE FERMENTAÇÃO E DESTILAÇÃO

Os resultados obtidos nos experimentos após as etapas de fermentação e destilação, quanto ao TSS e rendimento em etanol, foram compilados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados obtidos das amostras STT e CTT

Amostra	Concentração de <i>S. cerevisiae</i> (g/L)	TSS após fermentação (° Brix)	Volume de etanol (mL)
STT	1	9,8±0,4	23,8±1,8 ^b
STT	0,5	10,1±0,1	26,5±0,7 ^b
CTT	1	10,2±0,0	26,5±0,7 ^b
CTT	0,5	10,6±0,1	18±0,0 ^a

STT: sem tratamento térmico; CTT: com tratamento térmico

*Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Fonte: Autor, 2024

O TSS residual no vinho fermentado é um importante parâmetro de análise da eficiência fermentativa na produção de etanol a partir de cana-de-açúcar (Lopes *et al.*, 2011). Todas as amostras avaliadas neste estudo apresentaram elevado TSS ao fim do processo fermentativo, indicando a existência de açúcares fermentescíveis disponíveis para conversão à etanol. A baixa eficiência fermentativa observada pode ser justificada pelas condições de processo aplicadas. Às 12 horas iniciais de fermentação, que ocorreram a 32 °C, apresentaram em análise visual pouco acúmulo de gás nas amostras, indicando uma possível baixa atividade das leveduras

presentes, como indicado na Figura 6. Desta forma, elevou-se a temperatura de incubação para 38 °C por mais 6 horas, seguindo a recomendação do fabricante da cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada.

Figura 6 - Avaliação visual das amostras após 12 horas de fermentação a 32 °C



Fonte: Autor, 2024.

Nota-se também que os tratamentos STT apresentaram TSS médio inferior ao tratamento CTT em ambas as concentrações de levedura. Apesar de não verificação de diferença estatística entre TSS residual entre as amostras STT e CTT, sabe-se que, segundo Lopes *et al.* (2011), o lodo gerado no processamento de cana-de-açúcar pode adsorver açúcares do meio, gerando diferentes gradientes de concentração de sólidos solúveis ao longo de uma coluna de amostra, uma vez que após decantado em processos sem agitação, leva consigo certa carga de açúcares. Em processos industriais de produção de etanol, existem etapas específicas para a extração de açúcares residuais no lodo, pelo uso de filtros rotativos ou prensas desaguadoras (Lopes *et al.*, 2011). Para o presente estudo, presumiu-se que o menor teor de sólidos solúveis residuais nas amostras STT ocorreu em virtude da adsorção de açúcar pelo lodo presente, que estava em maior quantidade nestas amostras quando comparadas às CTT. Desta forma, após decantado, deixou a camada superior do extrato, de onde foram retiradas amostras para a medida do parâmetro analítico, com TSS mais baixo. Esta hipótese se confirma quando é observado que mesmo com TSS menor, o rendimento médio dos tratamentos STT com 0,5 g/L ou 1,0 g/L de levedura e o tratamento CTT com 1,0 g/L de levedura não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) (Tabela 1).

O volume de etanol coletado após o processo de destilação do vinho fermentado de cada uma das amostras encontra-se apresentado na Tabela 1. Os dados foram submetidos a análise

estatística por meio da qual realizou-se uma análise de variância (ANOVA) e o teste de médias Tukey a 5% de significância, conforme mostrado nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2 - Análise de variância (ANOVA)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
AMOSTRA	3	96.343.750	32.114.583	28,8	0,0103
REP	1	0,78125	0,78125	0,701	0,4639
erro	3	3.343.750	1.114.583		
Total corrigido	7	100.468.750			
CV (%) =	4,46				
Média geral:	236.875.000			Número de observações:	8

Fonte: Autor, 2024.

Tabela 3 - Teste de médias Tukey ($\alpha=0,05$)

DMS: 5,09254167587189 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 2

Erro padrão:

0,746519702798705

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
CTT_0,5	18.000.000	a1
STT_1,0	23.750.000	a2
STT_0,5	26.500.000	a2
CTT_1,0	26.500.000	a2

Fonte: Autor, 2024

Percebe-se pela análise de variância e pelo teste de comparação de médias que as amostras STT com 0,5 g/L de levedura, STT com 1,0 g/L de levedura e CTT com 1,0 g/L de levedura não apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) entre si, evidenciando que não houve aumento da eficiência do processo em decorrência do aumento da concentração do microrganismo fermentativo ou da inibição das reações de escurecimento enzimático. É possível relacionar a semelhança estatística quanto ao volume de etanol recolhido destas amostras com as condições do processo que podem ter tornado a oferta de açúcares aos microrganismos limitante, independentemente da concentração de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada. A agitação tem a principal função de favorecer o contato e a interação entre microrganismo fermentativo e substrato (Chippe, 2012). A ausência de agitação no experimento

pode ter desfavorecido o contato da levedura com os açúcares do mosto e, desta forma, padronizado o rendimento mesmo em diferentes concentrações do microrganismo.

A amostra CTT com 0,5 g/L de levedura apresentou um volume de destilado de 18 mL, quantidade inferior aos demais tratamentos ($p < 0,05$), sendo esta a única diferença estatística observada nos experimentos. O baixo volume de etanol coletado, em comparação com a amostra de mesma concentração celular sem tratamento térmico (STT com 0,5 g/L de levedura), pode se justificar pelo severo processo de inativação enzimática aplicado no início do experimento, que promoveu nas amostras CTT a eliminação de leveduras selvagens. Freiria (2023) mostrou em seu estudo que leveduras selvagens naturalmente presentes na cana-de-açúcar podem competir e até mesmo se adaptar melhor ao meio fermentativo do que leveduras selecionadas, produzindo metabólitos além de etanol que compõe o destilado obtido. Esse comportamento justifica a coleta de maior volume de destilado para o tratamento STT com 0,5 g/L de levedura em comparação à amostra CTT com 0,5 g/L de levedura.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo puderam mostrar aspectos importantes relacionados à inativação térmica da PFO no caldo de cana-de-açúcar. Apesar da ausência de método analítico para avaliação da atividade enzimática, características físicas como cor e presença de lodo foram um forte indicativo de que o tratamento térmico aplicado foi suficiente para inativação da enzima, impedimento grande parte das reações de escurecimento enzimático por ela catalisada. A menor geração de lodo observada, em virtude da não produção de compostos poliméricos provenientes da reação de escurecimento enzimático nas amostras que passaram por tratamento térmico, pode representar uma vantagem ao processo de produção de etanol. O lodo gerado adsorve açúcares do caldo, levando-os consigo quando decantado e separado do mosto. Desta forma, a não geração ou a diminuição da geração de lodo pode ser uma interessante otimização do processo.

A semelhança produtiva entre as amostras CTT e STT sugeriu que as reações de escurecimento enzimático e seus produtos, apesar de apresentarem toxicidade a certos microrganismos, não afetaram a atividade da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A amostra CTT com 0,5 g/L de levedura apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) das demais quanto ao volume de etanol coletado após a destilação do caldo de cana fermentado, mostrando que as leveduras selvagens podem ser relevantes nos produtos obtidos a partir de um processo fermentativo. Estes microrganismos naturalmente presentes podem gerar outros compostos além de etanol, comprometendo a qualidade do produto final obtido. O estudo realizado indica

que a inativação enzimática da PFO durante o processo de produção de etanol pode representar vantagens tecnológicas para a indústria sucroalcooleira.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA, T. C.; DA SILVA NETO, H. F.; OGASSAVARA, F. O.; ARANTES, F. C.; MARQUES, M. O.; FRIGIERI, M. C. **POLIFENOLOXIDASE: uma enzima intrigante**. *Ciência & Tecnologia*, [S. l.], v. 3, n. 1, 2011. Disponível em: <https://citec.fatecjab.edu.br/index.php/citec/article/view/60>. Acesso em: 9 jan. 2024.

ARAÚJO, Júlio Maria A.. **Química de Alimentos: teoria e prática**. Viçosa, MG. Ed. Ufv, 2008. 571 p.

AZEVEDO, A. C. B. et al.. **Enzymatic polyphenoloxidase inactivation with temperature and ozone in sugarcane variety RB 92579 to produce lower color sugar**. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 22, p. e2018043, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.04318>. Acesso em: 09 jan. 2024.

BNDES - BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL (BRASIL). CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. 1 ed. Rio de Janeiro: Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social, 2008. 314 p. ISBN 9788587545244. Disponível em: <http://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/2002>. Acesso em: 09 jan. 2024.

BRASIL. EMBRAPA. . **Cana: agência embrapa de informação tecnológica**. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. 2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/cana>. Acesso em: 09 jan. 2024.

BRONDANI, Dalci J. *et al.* **Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana de análogos da primina 5 e 6 alquil-substituídos**. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 22, n. 3, p. 217-222, 2003. Disponível em: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/6591>. Acesso em: 16 jan. 2024.

CHIEPPE, João Baptista Júnior. **Tecnologia e fabricação do álcool**. Inhumas: IFG; Santa Maria. Universidade Federal de Santa Maria, 2012. 74p. Disponível em:

https://redeetec.mec.gov.br/images/stories/pdf/eixo_prd_industr/tec_acucar_alcool/161012_tec_fabric_alc.pdf. Acesso em: 21 dez. 2023.

COLOMBI, Bruna Lyra et al. **Efeito de compostos inibidores na bioconversão de glicose em etanol por levedura *Saccharomyces cerevisiae***. *Engevista*, Blumenau, v. 19, n. 2, p. 339-352, maio 2017. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/160826/1/2017-PatriciaZ-E-Efeito.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2024.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Produção de cana-de-açúcar cresce 10,9%, estimada em 677,6 milhões de toneladas na safra 2023/24. 2023**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/5295-producao-de-cana-de-acucar-cresce-10-9-estimada-em-677-6-milhoes-de-toneladas-na-safra-2023-24>. Acesso em: 09 jan. 2024.

FAESP - FEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO ESTADO DE SÃO PAULO (São Paulo). **CANA-DE-AÇÚCAR É DESTAQUE NA CRIAÇÃO DE POSTOS DE TRABALHO NO AGRO PAULISTA**. 2022. Disponível em: <https://faespsenar.com.br/faesp-cana-de-acucar-e-destaque-na-criacao-de-postos-de-trabalho-no-agro-paulista/#:~:text=Na%20agropecu%C3%A1ria%2C%20foram%20gerados%209.474,aumentaram%20em%201%2C37%25..> Acesso em: 16 jan. 2024.

FORTEA, M. I.; LÓPEZ-MIRANDA, S.; SERRANO-MARTÍNEZ, A.; CARREÑO, J.; NÚÑEZ-DELICADO, E.; **Kinetic characterisation and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (Crimson Seedless)**, *Food Chemistry*, Volume 113, Issue 4, 2009, Pages 1008-1014, Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608010297>, Acesso em: 24 dez. 2023.

FREIRIA, Beatriz Helena. **Levedura Selvagem: Comparação e análise de contaminação do processo fermentativo para obtenção de etanol de cana-de-açúcar**. 2023. 62 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2023. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/38572>. Acesso em: 24 de dez. 2023.

GONÇALVES, B.; ISHIMOTO, C. K.; DE PAULA, M. R.; BATTESTIN, V. **Efeito da cinética de inativação térmica das enzimas peroxidase e polifenoxidase da água de coco.** Scientia Vitae, v.2, n.7, ano 2, jan. 2015, p. 13-19. Disponível em: <www.revistaifsp.com/v2n7ano2_2015.htm>; acesso em: 24 de dez. 2023.

JAMES, Glyn. **Sugarcane.** 2. ed. Oxford: Blackwell Science, 2004. 224 p. Disponível em: <http://base.dnsgb.com.ua/files/book/Agriculture/Cultures/Sugarcane.pdf>. Acesso em: 09 jan. 2024.

KOBLITZ, M.G. **Bioquímica de Alimentos, Teoria e Aplicações Práticas.** Rio de Janeiro, RJ. Ed. Guanabara Koogan, 242p. 2008. 663/664:54 K75b.

LIMA, Léo da Rocha; MARCONDES, Aluizio de Abreu. **Álcool Carburante: Uma estratégia brasileira.** Curitiba: Ufpr, 2002. 246 p.

LOPES, Cláudio Hartkopf et al. **Produção de etanol a partir da cana-de-açúcar: tecnologia de produção de etanol.** São Carlos: Sead, 2011. 133 p. Disponível em: http://livresaber.sead.ufscar.br:8080/jspui/bitstream/123456789/2669/1/TS_Claudio_ProducaoEtanol.pdf. Acesso em: 16 dez. 2023.

NABECHIMA, Gilson Hideki. **Inativação térmica das enzimas polifenoxidase e peroxidase em forno esteira e efeitos sobre a cor da erva-mate (*Ilex paraguariensis*).** 2010. 179 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/94276?show=full>. Acesso em: 09 jan. 2024.

PEREIRA, Danilo Aparecido; MACRI, Rita de Cássia Vieira; GIMENEZ, Alex Zerbinatti. **FATORES QUE AFETAM A FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA.** Ciência & Tecnologia Fatec, Jaboticabal, v. 12, n. 1, p. 44-55, dez. 2020. Disponível em: <https://citec.fatecjab.edu.br/index.php/citec/article/view/113>. Acesso em: 02 jan. 2024.

PEREIRA, Francisco Sávio Gomes. **BIOQUÍMICA: numa abordagem química.** Recife: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, 2010. 100 p. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/311994359_BIOCHEMISTRY_IN_A_CHEMICAL_APPROACH_in_portuguese_BIOQUIMICA_NUMA_ABORDAGEM_QUIMICA. Acesso em: 09 jan. 2024

RODRIGUES, Gelze Serrat de Souza Campos; ROSS, Jurandyr Luciano Sanches. **A trajetória da cana-de-açúcar no Brasil: perspectiva geográfica, histórica e ambiental**. Uberlândia: Edufu, 2020. 268 p. Disponível em: <https://books.scielo.org/id/2hfcy/pdf/rodrigues-9786558240112.pdf>. Acesso em: 09 jan. 2024.

SILVA, Meire Cristina Andrade Cassimiro da et al. **CANA-DE-AÇÚCAR: MANEJO, ECOLOGIA E BIOMASSA**. Bauru: Spessotto, 2021. 212 p. Disponível em: https://faculdadegalileu.com.br/ebook_cana.pdf. Acesso em: 16 jan. 2024.

VALDERRAMA, P.; FABIANE, M.; CLEMENTE, E.; **EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO SOBRE A ATIVIDADE DE PEROXIDASE (POD) E POLIFENOLOXIDASE (PPO) EM MAÇÃ (*malus communis*)**. Food Science and Technology, v. 21, n. 3, p. 321–325, set. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612001000300012>>; acesso em: 24/12/2023