

Relação da Aglomeração com a Hidrofobicidade Celular de Leveduras Selvagens e Seleccionadas para Produção de Etanol

SELVENCA, Leonardo Pereira
SILVA, Romário Conceição
SENA, Hildo Costa de
PONTES, Wesley

Resumo

Apesar da ocorrência de fenômenos de floculação, flotação, formação de espuma ou sedimentação em fermentações alcoólicas são poucos os métodos capazes de prever essas características nas leveduras. O trabalho teve o objetivo de buscar identificar a relação desses fenômenos com a hidrofobicidade celular e capacidade de auto agregação de leveduras. O experimento foi baseado em um método bifásico composto pelas fases solvente orgânico e aquosa, respectivamente, para obtenção do parâmetro de hidrofobicidade celular e método de sedimentação padronizado em espectrofotômetro utilizando tubos e ensaios visando obtenção do parâmetro de auto agregação. A avaliação do potencial hidrofóbico da levedura isolada foi feita na usina CLEALCO AÇÚCAR E ÁLCOOL S/A no mês de maio de 2019 e comparado com os resultados de seis leveduras seleccionadas que possuem alta performance fermentativa, baixa tendência a floculação e flotação ou produção de espuma assim como sua taxa de auto agregação que indica a tendência da rápida sedimentação. Como forma rápida de identificação da persistência e dominância das leveduras foi empregado um meio de cultura cromogênio sólido capaz de fornecer diferentes perfis morfológicos das colônias de acordo com o gênero e espécie da levedura. Os resultados dos ensaios indicaram que a levedura dominante do processo fermentativo da usina CLEALCO foi uma estirpe com forte produção de espuma e rápida sedimentação, conseqüentemente apresentou uma alta hidrofobicidade e alta taxa de agregação. O método proposto foi capaz de fornecer informações sobre a capacidade floculante, flotante, de produção de espuma ou rápida sedimentação das cepas dominantes durante o processo fermentativo.

Palavras-Chave: Floculação; Hidrofobicidade; Sedimentação; Leveduras; Fermentação.

Abstract

Despite the occurrence of flocculation, flotation, foaming or sedimentation phenomena in alcoholic fermentations there are few methods capable of predicting these characteristics in yeasts. The work aimed to identify the relationship of these phenomena with cellular hydrophobicity and self-aggregation capacity of yeasts. The experiment was based on a two-phase method composed of the organic solvent and aqueous phases, respectively, to obtain the cellular hydrophobicity parameter and standardized sedimentation method in a spectrophotometer using tubes and tests to obtain the self-aggregation parameter. The evaluation of the hydrophobic potential of the isolated yeast was made at the CLEALCO AÇÚCAR E ÁLCOOL S/A plant in May 2019 and compared with the results of six selected yeasts that have high fermentation performance, low tendency to flocculation and flotation or foam production as well as its self-aggregation rate that indicates the tendency of fast sedimentation. A solid chromogen culture medium capable of providing different morphological profiles of the colonies according to the genus and species of the yeast was used as a quick way of identifying the persistence and dominance of the yeasts. The results of the tests indicated that the dominant yeast in the fermentation process of the CLEALCO plant was a strain with strong foam production and fast sedimentation, consequently it presented a high hydrophobicity and high aggregation rate. The proposed method was able to provide information on the flocculating, flotting, foaming or rapid sedimentation capacity of the dominant strains during the fermentation process.

Keywords: Flocculation; Hydrophobicity; Sedimentation; Yeasts; Fermentation.

Resumen

A pesar de la aparición de fenómenos de floculación, flotación, espumación o sedimentación en las fermentaciones alcohólicas, existen pocos métodos capaces de predecir estas características en las levaduras. El trabajo tenía por objeto identificar la relación de estos fenómenos con la hidrofobia celular y la capacidad de autoagregación de las levaduras. El experimento se basó en un método de dos fases compuesto por las fases de disolvente orgánico y acuoso, respectivamente, para obtener el parámetro de hidrofobia celular y un método de sedimentación normalizado en un espectrofotómetro utilizando tubos y pruebas para obtener el parámetro de autoagregación. La evaluación del potencial hidrofóbico de la levadura aislada se realizó en la planta de CLEALCO AÇÚCAR E ÁLCOOL S/A en mayo de 2019 y se comparó con los resultados de seis levaduras seleccionadas que tienen un alto rendimiento de fermentación, una baja tendencia a la floculación y a la flotación o a la producción de espuma, así como su tasa de autoagregación que indica la tendencia a la sedimentación rápida. Se utilizó un medio de cultivo de cromógeno sólido capaz de proporcionar diferentes perfiles morfológicos de las colonias según el género y la especie de la levadura, como una forma rápida de identificar la persistencia y la dominancia de la levadura. Los resultados de los ensayos indicaron que la levadura dominante en el proceso de fermentación de la planta CLEALCO era una cepa con una fuerte producción de espuma y una rápida sedimentación, y por consiguiente presentaba una alta hidrofobicidad y una elevada tasa de agregación. El método propuesto pudo proporcionar información sobre la capacidad de floculación, flotación, espumación o sedimentación rápida de las cepas dominantes durante el proceso de fermentación.

Palabras clave: Floculación; Hidrofobia; Sedimentación; Levaduras; Fermentación.

INTRODUÇÃO

A fermentação alcoólica ocorre sempre com leveduras inicialmente escolhidas de acordo com a característica do processo produtivo. Entretanto, devido às condições do meio de cultura não serem estéreis, essas leveduras são rapidamente substituídas por leveduras naturais ou selvagens, caracterizadas como contaminantes num processo industrial. As leveduras selvagens ou contaminantes podem ser definidas como organismos que produzem mudanças indesejáveis em alimentos ou processos fermentativos (ANDRIETTA et al., 1997). Estas são provenientes de ambiente com muitos fatores desfavoráveis para o crescimento e se adaptando por meio de seleção natural a viverem nesses ambientes.

Todavia, para obtenção de robustez e resistência muitas leveduras possuem alta tendência à floculação, flotação, rápida sedimentação ou formação de espuma. Com consequência, estas leveduras são responsáveis pela variação do rendimento em vinícolas e cervejarias devido as suas propriedades bioquímicas que causam problemas no sabor, cor ou turbidez do produto (PHAFF et al., 1966).

Atualmente, as cepas seleccionadas respondem pela produção de aproximadamente 70 a 75% de todo etanol produzido no país e o seu uso tem a função de barrar ao máximo a entrada de cepas de leveduras selvagens, reduzindo o consumo de antiespumantes quando se compara a fermentação com predominância de levedura seleccionada com a de predominância de leveduras selvagens (LNF Latino Americana, 2019).

Em se tratando de morfologia, as leveduras seleccionadas apresentam características morfológicas celulares distintas como células dispersas e com perfil fenótipo em meio sólido de colônias de bordas lisas, brilhantes e livres de textura crespada ou rugosa. Entretanto, ao contrário das leveduras seleccionadas, o fenótipo das ditas selvagem é rapidamente identificado devido seu perfil celular com mais de cinco células unidas formando cachos e em meio sólido apresentar colônias opacas, com bordas irregulares e textura crespada ou rugosa (RODRIGUES et al., 2018).

Diversas técnicas têm sido aplicadas visando obtenção da morfologia celular de leveduras. Habitualmente é utilizada lâmina úmida com a levedura do processo em comparação visual com lâmina úmida de leveduras de partida em microscópio com auxílio de corantes capazes de evidenciar células vivas e mortas (ANTONINI, 2010). Nessas análises observam-se que as

leveduras seleccionadas não apresentam característica de floculação, flotação ou produção de espuma e seus valores de hidrofobicidade e aglomeração celular são utilizadas como referência para analisar valores obtidos de outras cepas. As interações hidrofóbicas desempenham um papel crucial em fenômenos de agregação microbiana. Estudos indicam que um aumento na floculação está fortemente correlacionado com um aumento da hidrofobicidade da superfície celular quando se utiliza, por exemplo, as estirpes de *Saccharomyces* (TEIXEIRA et al., 1995; STRATFORD, 1989).

O alto fator de auto agregação celular é obtido em cepas que possuem rápida sedimentação, tanto formação de flocos ou não, divergindo de uma relação com a hidrofobicidade celular. A falta de relação entre hidrofobicidade e comportamento de agregação também foi relatado para cepa de um *S. cerevisiae* usada para produção contínua de etanol (MOZES et al., 1994) e para *S. cerevisiae* leveduras de vinho (SUZZI et al., 1994).

No decorrer do processo fermentativo ocorre uma competição de leveduras de partida (*starter*) e leveduras selvagens de processo denominada de dinâmica populacional. Essa competição é capaz de selecionar a levedura que dominará o processo fermentativo de acordo com sua capacidade adaptativa. A capacidade de formação de espuma, assim como a floculação, vem sendo relacionada com a hidrofobicidade da superfície celular das leveduras, pois ao comparar a hidrofobicidade superficial destas células formadoras de espumas com células não formadoras de espuma é possível identificar que a hidrofobicidade é maior nas superfícies celulares das leveduras espumantes (SHIMOI et al., 2002; MIYASHITA et al., 2004).

Acredita-se que a hidrofobicidade das superfícies celulares das leveduras permite uma maior afinidade destas com a interface ar-líquido das bolhas, levando assim, ao acúmulo de uma grande quantidade de células na espuma formada (DE-SOUSA et al., 2006).

Dessa forma, neste trabalho após obtenção de levedura isolada do processo de fermentação industrial, busca-se relacionar a rápida sedimentação ou flotação da levedura em biorreatores com a hidrofobicidade celular.

1 Objetivos

Este trabalho teve o objetivo de analisar o poder de auto agregação de leveduras e hidrofobicidade celular de sete estirpes de leveduras fermentativas, sendo seis destas seleccionadas (CAT-1; PE-2; BG-1; SA-1; FERME e FT-858) e uma isolada da unidade Clealco Açúcar e Álcool S/A (FQ-11).

2 Metodologia

O processo fermentativo da usina CLEALCO AÇÚCAR E ÁLCOOL S/A, localizada na fazenda Pouso Alegre, Queiroz-SP, iniciou-se com cepas de leveduras com características fermentativas conhecidas sendo um *starter* misto composto por seis estirpes de leveduras com perfil morfológico liso, ausência de espuma, flotação ou floculação sendo elas: CAT-1 isolada na USINA CATANDUVA; PE-2 isolada na USINA DA PEDRA; BG-1 isolada na USINA BARRA GRANDE; SA-1 isolada na USINA SANTA ADÉLIA; FERMEL e FT-858 isoladas pela FERMENTEC.

a. Propagação de levedura

As células de leveduras estavam armazenadas em tubos de ensaio com meio de cultura YPD (*Yeast Peptona Dextrose*) sólido inclinado com adição de óleo mineral estéril para proteção das colônias em temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$. Foram coletadas duas alçadas de massa celular com auxílio de uma alça de platina estéril que foi suspensa novamente em 100 mL de meio YPD líquido e incubados em estufa bacteriológica por 24 horas em temperatura de $33 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

b. Análise de auto agregação ou adesão celular das leveduras

Após propagação, as leveduras foram separadas por centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos, lavadas duas vezes e suspensas novamente em tampão PBS com pH 7,2. Os ensaios de auto agregação foram realizados a $33 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Em todos os experimentos a concentração inicial de microrganismos foi padronizada para $\text{DO}_{600\text{ nm}} = 1$ aproximadamente. A padronização ocorreu da seguinte forma: 5 mL de tampão PBS pH 7,2 foi adicionado em triplicada em tubos de ensaios com rosca (20x150mm) e adicionado 0,1 mL de amostra lavada em tampão PBS pH 7,2 até densidade óptica desejada de ± 1 em 600 nm para cada tempo correspondente. A densidade ótica de cada suspensão foi medida a 600 nm em um espectrofotômetro marca HACH, modelo DR-2800, utilizando os próprios tubos em intervalos de 2 e 4 horas sem agitação da suspensão.

A porcentagem de auto agregação (%AA) foi calculada como: $\%AA_t = [(OD_i - OD_t) \div OD_i] \times 100$ onde OD_i é a densidade ótica inicial da suspensão e OD_t é a densidade ótica no tempo t (GOLOWCZYC et al., 2009).

c. Análise de hidrofobicidade da superfície celular das leveduras

Foi empregada metodologia proposta por ROSENBERG et al. (1980) com modificação do solvente uma vez que, em revisão bibliográfica, autores como FIDALGO (2006) citam que o solvente tolueno ou hexano seria o mais ideal para determinação desse parâmetro. As leveduras foram cultivadas durante 24 h a $33 \pm 1^\circ\text{C}$ em caldo YPD. Em seguida lavadas com uma solução PBS estéril (pH 7,2), retirados e suspensos novamente no mesmo tampão.

A suspensão foi em seguida ajustada para $\text{DO}_{600} \text{ nm} = 1$ aproximadamente (A1). Três mililitros das suspensões de leveduras foram colocados em contato com 1 mL do hexano em tubo tipo Falcon. A densidade óptica da fase aquosa (A2) é resultado da mistura da suspensão de levedura com hexano em agitador de tubos (Vórtex) marca Phoenix, modelo AP56, durante 60 s, depois de 2 h a $33 \pm 1^\circ\text{C}$. A fase aquosa foi cuidadosamente removida com auxílio de micropipeta e a absorbância a 600 nm foi avaliada em cubeta de 10 mm (MEIRA et al., 2012). O índice de hidrofobicidade (IHPC) foi calculado como: $\%IHPC = [(A1 - A2) \div A1] \times 100$.

d. Identificação de dominância e persistência

A identificação das leveduras foi realizada com base na morfologia da colônia crescida em meio cromogênio sólido composto por corantes exógenos capazes de atribuir diferentes colorações a leveduras diferentes de gênero e espécie (LIEVITO BIOTECNOLOGIA, 2018).


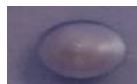


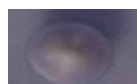


3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A persistência e dominância das estirpes selecionadas observada por meio da técnica de biologia molecular foi de apenas dois meses após observação morfológica das colônias isoladas em meio de cultura cromogênico desenvolvido pela empresa LIEVITO BIOTECNOLOGIA. Nos dois meses em que as leveduras selecionadas dominavam o processo foi observado menor consumo de antiespumante e ausência de floculação, flotação, produção de espuma ou rápida sedimentação.

Nos meses subsequentes foi possível notar variabilidade fenotípica nos biorreatores comprovando a ocorrência da dinâmica populacional. No mês de maio do corrente ano, na usina CLEALCO AÇÚCAR E ÁLCOOLS/A foi constatada a persistência e dominância de um fenótipo selvagem (FQ-11), sendo ele rugoso, de rápida sedimentação celular e com alta produção de espuma. Após o domínio do fenótipo selvagem notou-se aumento de espuma, sedimentação variável entre 10 e 20% bem como uma flotação das leveduras no biorreator. A cepa não

apresentou capacidade de flocular e formar flocos bem definidos, porém teve alta capacidade de sedimentação. Os dados de porcentagem de agregação celular e hidrofobicidade celular foram obtidos por meio da leitura da densidade em percurso óptico a 600 nm e a caracterização fenotípica foi realizada de acordo com cor, formato, textura, elevação e formato da borda crescidas em meio de cultura sólido. Estes resultados são observados na Tabela 1.

Tabela 2 -Resultado dos testes de auto agregação e hidrofobicidade celular realizados com leveduras selecionadas e uma levedura isolada do processo fermentativo da usina Clealco Açúcar e Álcool S/A, FQ-11.

Perfil fenotípico	Auto agregação (%)		Hidrofobicidade Celular (%)	
	Cepas	2h		4h
CAT-1		40,16	87,97	49,93
PE-2		70,25	93,50	51,02
BG-1		36,85	44,95	48,10
SA-1		36,85	75,85	66,62
FERMEL		68,30	95,65	25,55
FT-858		64,50	90,30	61,37
FQ-11		94,25	95,15	85,54

Fonte: Autores.

Os resultados obtidos condizem com o proposto por alguns autores. Stratdford (1992), citado por Pacheco (2010), verificou que as células de leveduras se agregam devido às forças de Van der Waals na ausência de outro tipo de força atrativa.

Estas forças atrativas são importantes para que as leveduras superem as forças de repulsão eletrostática entre as células. As leveduras rugosas ou também chamadas de leveduras floculantes possuem a habilidade de se agregarem espontaneamente e formar flocos. Stewart e Russel (1975) descreveram a floculação como sendo uma agregação de células inicialmente livres, que após se unirem, sedimentam no meio ou flutam. Esse fenômeno ocorre devido a fatores intrínsecos como o controle genético, ou seja, genes que expressam proteínas conhecidas como floculinas que permitem que essas leveduras cresçam de forma floculada e a fatores extrínsecos como as condições do meio em que se encontram e sua interação com a estrutura da parede celular.

O mix composto pelas seis cepas seleccionadas tiveram uma média de porcentagem de 52,81% para o ensaio de auto agregação com duas horas de análise e a levedura isolada do processo fermentativo da Clealco FQ-11 94,25% de capacidade de auto agregação. Isso indica que a levedura isolada da usina Clealco tem rápida sedimentação. A porcentagem de hidrofobicidade celular da cepa isolada apresentou valor superior ao da média das leveduras seleccionadas cerca de 1,70 vezes o que justifica a formação de espuma e flotação.

Em unidade industrial é possível notar efeito da hidrofobicidade celular uma vez que o consumo de antiespumante aumentou de 0,30 kg/m³ para 0,52 kg/m³. Entretanto, a taxa de conversão e o rendimento fermentativo possuem altos índices com média de concentração de etanol de 12% (v/v) no vinho de levedurado. No creme de levedo obtido da centrifugação do biorreator final notou-se alta flotação após observação visual devido à falta de residual de agentes tensoativos, fato esse constatado com a aplicação de antiespumante e ausência visual da flotação pois o antiespumante é capaz de fazer a dispersão das células em meio aquoso.

O método empregado para determinação da hidrofobicidade celular e da porcentagem de auto agregação se mostrou rápido e confiável, podendo ser utilizados para avaliações das capacidades de flotação, floculação, aglomeração ou sedimentação e produção de espuma de leveduras isoladas de unidades industriais em comparação com as leveduras seleccionadas que já possuem características conhecidas.

CONCLUSÕES

Dentro das condições em que os testes foram realizados pode-se observar que a porcentagem de aglomeração celular tem relação direta com a capacidade de sedimentação da levedura o tempo sugerido para a avaliação desse parâmetro é de 2 horas visto que leveduras com alto índice chegaram a 94,25% nesse período e o índice de hidrofobicidade tem concordância

direta em expressar que com seu acréscimo acontece um aumento na produção de espuma, flotação ou floculação em comparação com os resultados das cepas que não apresentam essas características.

REFERÊNCIAS

- ANDRIETTA, S. R.; ANDRIETTA, M. G. S.; RODRIGUES, M. I. Métodos de caracterização de leveduras de processo utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. *STAB Açúcar, Alcool e Subprodutos*, v. 15, n.6, p.32-35, 1997.
- ANTONINI, Sandra Regina Ceccato. Características gerais das bactérias e leveduras: Leveduras. In: *MICROBIOLOGIA da fermentação alcoólica: A importância do monitoramento microbiológico em destilarias*. São Carlos: EdUFSCar, 2010. cap. Morfologia, estrutura celular, metabolismo, nutrição e multiplicação de bactérias e leveduras, p. 93. ISBN 978-85-7600-2222.
- DE-SOUSA, S. R.; OLIVEIRA, K. F.; SOUZA, C. S.; KILIKIAN, B. V. & LALUCE, C. Yeas floation as the result of interplay of supernatant composition and cell-wall hydrophobicity, *Colloids and Surfaces*, v. 29, p. 309-319, 2003.
- FIDALGO, M.; BARRALES, R. R.; IBEAS, J. I. & JIMENEZ, J. Adaptive evolution by mutations in the FLO11 gene, *Proceedings of the Natural Academy of Science of USA*, v. 103, n. 30, p. 11228-11233, 2006.
- GOLOWCZYC, M. A.; MOBILI, P.; GARROTE, G. L.; DE LOS ANGELES SERRADELL, M.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Interaction between Lactobacillus kefir and Saccharomyces lipolytica isolated from kefir grains: Evidence for lectin-like activity of bacterial surface proteins. *The J Dairy Res.*, v. 76, p. 111-116, 2009.
- LIEVITO Biotecnologia: Monitoramento de Leveduras em Processos Fermentativo. 1. ed. Araraquara: [s. n.], 2018.
- LNF: Leveduras Seleccionadas. Bento Gonçalves: [s. n.], 2019.
- MEIRA, Q. G. S.; BARBOSA, I. M.; ATHAYDE, A. J. A. A.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; SOUZA, E. L. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by Staphylococcus aureus from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. *Food Control*, v. 25, p. 469-475, 2012.
- MIYASHITA, K.; SAKAMOTO, K.; KITAGAKI, H.; IWASHITA, K.; ITO, K. & SHIMOI, H. Cloning and analysis of the AWA1 gene of a nonforming mutant of a sake yeast. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 97, n. 1, p. 14-18, 2004.
- PACHECO, Thályta Fraga. *Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente*. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

SELVENCA, Leonardo Pereira; SILVA, Romário Conceição; SENA, Hildo Costa de; PONTES, Wesley

PHAFF, H. J.; MILLER, M. W.; MRAK, E. M. *The life of yeasts*. Harvard University Press, Cambridge, 1966, 186 p.

RODRIGUES -Prause, Aline et al. A Case Study of Genomic Instability in an Industrial Strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *G3 (Bethesda, Md.)* vol. 8,11 3703-3713. 6 Nov. 2018, doi:10.1534/g3.118.200446.

ROSENBERG, M.; GUTNICK, D.; ROSENBERG, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons, a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *Fems Microbiol Lett.*, v. 9, p. 29-33, 1980.

SHIMOI, H.; SAKAMOTO, K.; OKUDA, M.; ATTHI, R.; IWASHITA, K. & ITO, K. The AWA1 gene is required for the foam-formation phenotype and cell surface hydrophobicity of sake yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 4, p.2018-2025, 2002.

STEWART, G. G.; RUSSEL, I. Centenary review: one hundred years reseaech and development in the brewing industry. *Journal Institute of Brewing*, London, v. 81, p. 248-257, 1975.

STRATFORD, M. Lectin-mediated aggregation of yeasts: yeasts flocculation. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, v. 10, p. 283-341, 1992.

1 SELVENCA, Leonardo Pereira é graduando em Tecnologia em Biocombustíveis pela Faculdade de Tecnologia de Araçatuba-SP “Prof. Fernando Amaral de Almeida Prado”. Técnico em Açúcar e Álcool pela instituição ETEC- Amim Jundi de Osvaldo Cruz. Possui conhecimento em microbiologia industrial e de fermentação. Atualmente é microbiologista em uma usina de açúcar e álcool. leonardoselvenca@gmail.com

2 SILVA, Romário Conceição é graduando em Tecnologia em Biocombustíveis pela Faculdade de Tecnologia de Araçatuba-SP.

3 SENA, Hildo Costa de. Mestre em Engenharia Química pela UNICAMP (2011) e Engenheiro Químico pela Universidade Federal de Sergipe - UFS (2008). Tem experiência em pesquisa na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos com ênfase em Fisiologia Pós-Colheita e na área de Ciência e Tecnologia de Polímeros com ênfase em Fenômenos de Interface. Atualmente é professor de ensino superior no Curso Superior de Tecnologia em Biocombustíveis da Fatec Araçatuba. Leciona as disciplinas de Análise Instrumental, Operações unitárias e Produção de Bioetanol no referido curso. Além disso, desenvolve pesquisas na área de bebidas fermento-carbonatadas e coordena projetos de extensão voltados a estudantes do Ensino Médio. hildosena@gmail.com, Avenida Prestes Maia, 1764, Bairro Ipanema, Araçatuba, SP, CEP 16052-045.

4 PONTES, Wesley é docente da Faculdade de Tecnologia de Araçatuba-SP.