

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PRÓPOLIS SOBRE
CONTAMINANTES DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA
DESTINADA A PRODUÇÃO DE CACHAÇA**

José Humberto de Oliveira Filho
Engenheiro de Alimentos

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL
Agosto de 2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PRÓPOLIS SOBRE
CONTAMINANTES DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA
DESTINADA A PRODUÇÃO DE CACHAÇA**

José Humberto de Oliveira Filho

Orientador: Profa. Dra. Marcia Justino Rossini Mutton

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Microbiologia (Microbiologia Agropecuária)

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Agosto de 2010

Oliveira Filho, José Humberto de
O48a Atividade Antimicrobiana de própolis sobre contaminantes da
fermentação alcoólica destinada a produção de cachaça/ José
Humberto de Oliveira Filho. – – Jaboticabal, 2010
iii, 53 f.; 28 cm

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010

Orientador: Márcia Justino Rossini Mutton

Banca examinadora: Maria das Graças Cardoso, Flávia
Cecílio Ribeiro Bregagnoli.

Bibliografia

1. Aguardente. 2. Ampicilina. 3. Biocida natural. 4. Interação
própolis/ampicilina. 5. Processos fermentativos. I. Título. II.
Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 663.1:664.153

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JOSÉ HUMBERTO DE OLIVEIRA FILHO – Nascido em Ribeirão Preto (SP), em 26 de fevereiro de 1986, graduado em Engenharia de Alimentos em fevereiro de 2008 pelas Faculdades Associadas de Uberaba – FAZU. Atualmente trabalha na FAZU na qualidade de professor dos cursos de Engenharia de Alimento e Agronomia.

DEDICO

Aos meus amados pais, José Humberto e Maria de Fatima!

Pelo sincero amor e carinho concedidos aos seus filhos.

Pelo incondicional apoio na realização dos meus sonhos.

Pelos momentos de eterna alegria proporcionados pela sua existência em minha vida.

Aos meus irmãos Carolina e Gustavo,

Pelo intenso carinho que sentem por mim.

Pela união verdadeira e amorosa que graças a Deus temos um pelo outro.

A minha esposa, Adriana.

Minha eterna companheira.

Pelo verdadeiro e sincero amor que você me oferece.

Pelos maravilhosos momentos de muita felicidade ao seu lado.

OFEREÇO

Aos meus padrinhos Roberval e Maria Cristina.

Que me acolheram como um filho, e sempre me concederam muito amor e carinho, me apoiando intensamente na realização de minhas conquistas.

As minhas maravilhosas primas, Taís e Laís
As quais considero minhas irmãs, pois sempre
demonstraram gestos verdadeiros de muito carinho por mim.

Aos meus queridos avós, Euripedes e Janira.

Pelo amor de pai e mãe que me oferecem.

Pela dedicação profunda por toda família.

Pelo carinho e força em todos os momentos.

A minha adorável tia Maria dos Reis.

Que me trata com tanto amor e carinho e sempre
torceu por mim, me apoiando em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

- ✓ A Deus por me conceder muita saúde e felicidade;
- ✓ A minha maravilhosa família por sempre estar ao meu lado, me proporcionando muita força;
- ✓ Aos meus padrinhos e primas pela convivência em família;
- ✓ A FCAV/UNESP Campus de Jaboticabal e a CAPES pela oportunidade de realizar o Mestrado e pela bolsa de estudo concedida.
- ✓ A profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton e ao prof. Dr. Miguel Angelo Mutton, pela amizade e oportunidades concedidos, possibilitando o desenvolvimento deste trabalho.
- ✓ Ao prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro e a profa. Dr. Lucia Maria Carareto Alves pelas contribuições durante o exame de qualificação.
- ✓ Aos amigos do laboratório de Tecnologia do Açúcar e Álcool, pelo companheirismo e colaboração: Aline, Leonardo, Gisele, Sérgio, Tatiane, Juliana, Igor, Flávio, Débora, Raul, Gustavo e Lidyane.
- ✓ A todos que contribuíram direto ou indiretamente para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

Página

RESUMO	ii
SUMMARY	iii
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 – Cachaça	3
2.2 – Fermentação	4
2.3 – Produção de compostos secundários	5
2.4 – Contaminação bacteriana na fermentação alcoólica	7
2.4.1 – Bactérias lácticas e acéticas	9
2.5 – Uso de inibidores na fermentação alcoólica	11
2.6 – Extrato de própolis	12
3 – MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 – Instalação e condução do experimento	17
3.2 – Matéria-prima	17
3.3 – Preparo dos antimicrobianos	17
3.4 – Preparo dos mostos	18
3.5 – Microrganismo e fermentação alcoólica	18
3.6 – Análises microbiológicas do mosto e vinho	18
3.7 – Destilação	19
3.8 – Análises tecnológicas do mosto e vinho	20
3.9 – Delineamento experimental	20
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 – Condições climáticas	21
4.2 – Avaliações microbiológicas	21
4.3 – Acidez total	33
4.4 – Glicerol	35
4.5 – Teor alcoólico	36
4.6 – Compostos secundários	39
5 – CONCLUSÃO	42
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PRÓPOLIS SOBRE CONTAMINANTES DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DESTINADA A PRODUÇÃO DE CACHAÇA

RESUMO - Na produção de cachaça, a microbiota contaminante afeta diretamente o processo fermentativo, originando fermentações indesejáveis, contribuindo para menores rendimentos em álcool e um desbalanceamento na formação dos compostos secundários que caracterizam a bebida. Portanto, são necessárias práticas para minimizar e controlar essas contaminações, sendo a aplicação de antimicrobianos uma alternativa eficaz para tal controle. Dentro desse enfoque, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de antimicrobianos naturais e sua interação com antibióticos convencionais no controle da contaminação bacteriana na produção cachaça. Para as análises tecnológicas e microbiológicas do vinho e pé-de-cuba, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em parcelas sub-subdivididas, em esquema fatorial 5x2x10 com três repetições, sendo quatro biocidas (extrato de própolis marrom, extrato de própolis verde, ampicilina e interação própolis/ampicilina (P/A)) e controle (sem adição de antimicrobiano), combinando-se os tratamentos em início e final de safra por 10 ciclos fermentativos. Para as análises tecnológicas do mosto, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em parcelas subdivididas, em esquema fatorial 2x10 com três repetições, sendo duas épocas da safra (início e final) por 10 ciclos fermentativos. Foi observado um comportamento distinto entre épocas, com maiores valores de contaminantes e acidez em mosto no final da safra. Dentre os tratamentos, o extrato de própolis marrom, própolis verde, ampicilina e interação (P/A) mantiveram os índices de viabilidade celulares a níveis elevados e superiores a 90%, com menores índices observados para o tratamento controle. As concentrações de bactérias no pé-de-cuba foram significativamente menores com o emprego dos biocidas. No tratamento controle a acidez total do vinho foi superior, quando observou-se também, redução no teor alcoólico do vinho para este tratamento. O extrato de própolis e sua combinação com antimicrobiano sintético mostrou-se eficiente no controle de bactérias contaminantes do processo fermentativo.

Palavras-chave: Aguardente, ampicilina, biocida natural, interação própolis/ampicilina, processos fermentativos.

PROPOLIS ANTIMICROBIAL ACTIVITY UNDER CONTAMINANTS OF ALCOHOLIC FERMENTATION FOCUCED ON CACHAÇA PRODUCTION.

SUMMARY - During the cachaça production, the contaminant microbiota affects directly the fermentative process, originating undesirable fermentations, minimizing the alcohol production as well an unbalancing in the secondary compounds formation that characterizes the beverage. Therefore, practices that minimize those contaminations are necessary and the antimicrobial use is one of the efficient alternatives the control. This work aimed to evaluate the natural antimicrobials efficiency as well its interaction with conventional antibiotics to control the bacterial contamination in the cachaça production. A completely randomized design in sub-divided parcels in a factorial 5x2x10 scheme with 3 replications was used, being four biocides (brown propolis extract, green propolis extract, ampicillin and propolis/ampicillin interaction – P/A) and control, combining them in the beginning and final of harvest by 10 fermentative cycles. A different behavior between treatments was observed, being the higher contamination and acidity found in the end of the harvest. Among treatments, the brown propolis extract, green propolis extract, ampicillin and P/A kept cellular viability indexes higher than 90%, and the control treatment was lower. The bacterial concentration in the inoculums was significantly smaller when biocides were used. In the control treatment the residual reducing sugars. The propolis extract and its combination with synthetic antimicrobials were efficient to control contaminant bacteria during the fermentative process.

Keywords: Aguardente, ampicillin, fermentative processes, natural biocides, propolis/ampicillin interaction.

I. INTRODUÇÃO

A cachaça é um produto genuinamente brasileiro, obtida pela destilação do mosto de caldo de cana fermentado, com características peculiares. É a terceira bebida mais consumida no mundo, com cerca de 5 mil marcas, 30 mil produtores no Brasil e volume anual em torno de 1,3 bilhão de litros (ABRABE, 2010). Estima-se que no território nacional existam mais de 25.000 estabelecimentos produtores de cachaça, com cerca de 8.500 no estado de Minas Gerais, sendo esta responsável pela forte ligação com a cultura do estado. Dos 500 milhões de litros de cachaça produzidos no Brasil, Minas Gerais produz 182 milhões. (SEBRAE, 2005).

A fermentação alcoólica é uma das principais etapas do processo de fabricação da cachaça, estando associada diretamente com a obtenção de um bebida com padrões de qualidade adequados. A levedura ao metabolizar anaerobicamente o açúcar, produz etanol, gás carbônico e compostos secundários. No entanto, o microrganismo possui certas exigências para desenvolver seu metabolismo de maneira adequada, necessitando que as condições do meio estejam propícias a sua atividade metabólica.

O controle e monitoramento da fermentação alcoólica possibilitam a obtenção de uma bebida de melhor qualidade com maiores rendimentos em álcool. Microrganismos que se instalam no processo, podem originar fermentações indesejáveis, resultando em menores rendimentos de álcool e um desbalanceamento na formação dos compostos secundários que caracterizam a bebida.

As bactérias contaminantes presentes no caldo, em condições favoráveis, multiplicam-se, provocando diversos transtornos durante a condução do processo. Uma das possibilidades para o controle destes contaminantes é a utilização de antibióticos, os quais, em virtude de suas propriedades bactericidas ou bacteriostáticas, funcionam como agentes desinfetantes, reduzindo a contaminação.

No entanto, o uso contínuo de tais antimicrobianos pode levar ao desenvolvimento de linhagens resistentes, tornando-as cada vez menos susceptíveis a sua ação, além de elevar os custos do processo e possibilitar a incorporação de resíduos no produto, desqualificando a bebida. Portanto, a utilização de biocidas naturais apresenta-se como uma alternativa para este problema.

Neste contexto, o presente estudo objetivou, avaliar a eficiência dos biocidas naturais, extrato de própolis marrom e própolis verde e o sinergismo com agente antimicrobiano sintético, ampicilina, no controle de bactérias contaminantes da fermentação alcoólica destinada a produção de cachaça.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cachaça

A instrução normativa nº 13 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento de 29 de junho de 2005 definiu, Cachaça como a bebida fermento-destillada com graduação alcoólica de 38 a 48% (v/v) a 20°C, obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar, podendo ser adicionado de até 6g/L de açúcares (BRASIL, 2005).

É a terceira bebida destilada mais consumida em todo o mundo, superada apenas pela vodka e soju, apresentando uma produção anual de 1,3 bilhão de litros. Dentre os estados produtores, podem-se destacar os Estados de São Paulo (44%), Pernambuco (12%), Ceará (12%), Minas Gerais (8%) e Paraíba (8%), com apenas 1% da produção total brasileira destinada ao mercado externo (APEX-BRASIL, 2007).

No estado de Minas Gerais a produção de cachaça é de aproximadamente 182 milhões de litros anuais, sendo obtida através da destilação do mosto de caldo de cana fermentado. É um produto artesanal produzido em pequena escala por 8500 produtores em média, sendo esta responsável pela forte identidade com a cultura do estado (SEBRAE, 2005).

O processo de produção da cachaça segundo Lima Neto & Franco (1994), pode ser resumido pelas etapas de preparação da matéria prima (corte da cana-de-açúcar, separação das folhagens, transporte e armazenamento), seguido da extração do caldo, preparo do mosto e fermentação. O produto obtido da fermentação é então, encaminhado para destilação, onde se obtém a cachaça. Esta, ainda pode ser armazenada em tonéis de madeira para que ocorra o envelhecimento, e finalmente ser engarrafada e comercializada.

O aprimoramento da tecnologia de produção desta bebida é essencial para se obter um produto com preço e padrão de qualidade competitivos, possibilitando aumento nas exportações, bem como na sua aceitação pelas classes de maior poder aquisitivo no mercado interno (BOZA & OETTERER, 1999).

A globalização da economia possibilitou mostrar ao mundo que no Brasil não se produz somente cachaça industrial, utilizada como ingrediente básico da caipirinha, mas também, a tradicional cachaça de alambique, revalidando em paladar, aroma e

técnicas de fabricação com destilados conhecidos mundialmente como vodka, whisky e o cognac (RODAS, 2005).

2.2 Fermentação

Na fermentação alcoólica a transformação de carboidratos em etanol, ocorre por meio da ação de leveduras, sendo a mais empregada neste processo, as do gênero *Saccharomyces*. Esta transformação ocorre através de um sistema de reações multi-enzimáticas que se inicia no contato da levedura com as soluções açucaradas (STUPIELLO & HORII, 1981).

O processo fermentativo está relacionado com a degradação anaeróbica da glicose, ou outros carboidratos, para obter energia na forma de ATP (Adenosina trifosfato), ocasionando a formação de duas moléculas de piruvato (VENTURA, 2007).

O piruvato produzido na glicólise possui três destinos, que dependem do tipo de microrganismo e das condições metabólicas que os mesmos são submetidos. A levedura converte o piruvato em etanol e gás carbônico em duas reações. Na primeira reação, o piruvato sofre descarboxilação em uma reação irreversível catalisada pela enzima piruvato descarboxilase. Na segunda reação, através da ação da enzima álcool desidrogenase, o acetaldeído é reduzido a etanol, na presença do NADH (LEHNINGER et al. 2000).

A fermentação alcoólica corresponde a um processo microbiano típico, no qual o produto é sintetizado durante a fase primária de crescimento da levedura, sendo originado como parte do metabolismo energético (MADIGAN et al. 2004).

Referindo-se às características tecnológicas do mosto, um dos fatores de grande relevância nos processos fermentativos na produção de cachaça é a qualidade e padronização do substrato. Mostos com concentrações de açúcares adequadas, da ordem de 12-16° Brix proporcionam maior atividade metabólica para as leveduras, conseqüentemente, melhor rendimento em álcool. De acordo com Marques & Serra (2004), teores elevados de açúcares provocam inibição dos processos metabólicos acarretando desdobramento lento do substrato, interferindo substancialmente no processo fermentativo devido a maior concentração de etanol no vinho.

A temperatura do processo fermentativo também é um fator de grande importância, sendo valores ideais entre 26 a 32°C. Reduções na temperatura podem

ocasionar diminuição na atividade das leveduras, enquanto temperaturas elevadas podem acarretar enfraquecimento do fermento, oferecendo condições ótimas para que microrganismos contaminantes se desenvolvam, assim como, perdas de álcool por evaporação (NOGUEIRA & VENTURINI-FILHO, 2005).

O bom desenvolvimento do processo fermentativo depende também das condições de acidez e do pH do meio (MUTTON, 1998). A levedura apresenta desenvolvimento normal em uma faixa de pH entre 4,5 e 5,5, e a acidez expressa em ácido sulfúrico deve se enquadrar na faixa de 2,5 a 3,0g de ácido sulfúrico/L de mosto, não devendo ultrapassar os 5,0g/L, pois uma acidez excessiva pode destruir as células de leveduras, ao passo que uma acidez deficiente não favorece o desenvolvimento da levedura e facilita a contaminação bacteriana (NOVAES, 1980).

A levedura tem a capacidade de se adaptar ao meio facilmente, dependendo das condições encontradas. Sobretudo, em ambientes que favoreçam sua atividade metabólica, como por exemplo, meios que apresentem nutrientes essenciais para seu metabolismo, uma vez afetados sob condições adversas, podem ocasionar um estresse à levedura reduzindo sua viabilidade (MUTTON, 1998).

Cherubin (2003) pesquisando o comportamento fisiológico de duas linhagens de *S. cerevisiae*, constatou que a queda da viabilidade celular, aliada aos estresses causados pela temperatura, teor alcoólico, autólise e liberação de aminoácidos foram os agentes promotores da elevação da contaminação bacteriana, principalmente na presença de estresse térmico.

Uma cachaça de qualidade deve ter uma correta fermentação, o que pressupõe, entre outros requisitos, o esgotamento dos açúcares fermentescíveis acompanhado de um aumento discreto da acidez volátil original do caldo e desenvolvimento de um aroma agradável, que lembra o floral (MAIA, 1994). O controle e monitoramento dos processos de produção e o aprimoramento da tecnologia, são fatores determinantes para obtenção da bebida com características específicas, garantindo a preservação da qualidade, possibilitando a competitividade no mercado interno e externo.

2.3 Produção de Compostos Secundários

A fermentação alcoólica do caldo de cana tem como principal produto o álcool etílico, além de compostos secundários, tais como aldeídos, cetonas, alcoóis

superiores, ácidos e ésteres. A natureza e qualidade desses componentes dependem da matéria-prima, fermentação, destilação e envelhecimento da bebida (DATO, et al., 2005).

A quantidade de compostos secundários totais, excluindo-se o etanol em cachaça, de acordo com a legislação brasileira atual (BRASIL, 2005), devem estar dentro dos limites de 200 mg a 650 mg/100 mL de álcool anidro, sendo os limites máximos para cada composto secundário de 150 mg de acidez volátil expresso em ác. acético; 200 mg de ésteres totais em acetato de etila; 30 mg de aldeído expresso em acetaldeído; 5 mg para a soma de furfural e hidroximetilfurfural; 10 mg de metanol e 360 mg de alcoóis superiores/100 mL de álcool anidro.

Os ácidos são compostos normais da fermentação, pois estão sempre presentes na matéria-prima. Ésteres são formados durante a fermentação alcoólica, através da reação intracelular entre etanol e ácido acético, formando acetato de etila (RIGOTT, 1989; ROSE, 1970) citado por Maia (1994). Estes ainda são formados durante o processo de envelhecimento da aguardente, pela reação entre álcool e ácido, sendo responsáveis pelo aroma típico e agradável, caracterizando o buquê da bebida.

Os alcoóis superiores são alcoóis com mais de dois átomos de carbono formados durante o processo oxidativo, proveniente em grande parte da transformação de aminoácidos durante a fermentação. O aumento na formação deste composto está relacionado com a baixa atividade do fermento (YOKOYA, 1995) e pela interferência da microbiota durante o processo fermentativo (SILVA, et al., 1996).

A formação de congêneres como acetaldeído ocorre principalmente nas primeiras horas da fermentação, diminuindo posteriormente, especialmente, sob condições de anaerobiose (MAIA et al., 1994).

O furfural é um aldeído formado como resultado da pirogênese da matéria orgânica depositada no fundo das caldeiras do aparelho de destilação, sendo máxima a sua proporção se o aquecimento for feito a fogo direto. É um composto de aroma penetrante, enjoativo, considerado indesejável em bebidas destiladas (TÉO, 2003).

O glicerol é um triálcool de fórmula molecular $C_3H_8O_3$, formado pelas leveduras através da via glicolítica. Sua produção é influenciada por vários fatores, sendo a presença de contaminantes e o pH do mosto os mais relevantes. Sob condições de pH, alcalino, verifica-se maior produção de glicerol, proporcionando maior crescimento de contaminantes em detrimento das leveduras que são acidófilas. Verifica-se também

relação com menor rendimento fermentativo, ou seja, parte dos açúcares estão sendo desviados da produção de álcool para outros fins metabólicos (AMORIM, 1977).

Uma prática fundamental para eliminar compostos indesejáveis que desqualificam a bebida é a separação das frações cabeça, coração e cauda. Esta possibilita a obtenção de uma cachaça com as características peculiares desejáveis ao consumo.

2.4 Contaminação bacteriana na fermentação alcoólica

A presença da microbiota contaminante afeta diretamente o processo fermentativo, uma vez que a cana-de-açúcar abriga em sua estrutura uma grande diversidade de microrganismos próprios. Dentre eles, destacam-se fungos, bactérias e leveduras, que se constituem em uma fonte natural de contaminantes no momento em que se realizam as operações de corte e colheita (MUTTON, 1998). O caldo de cana possui condições favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos devido aos altos teores de nutrientes orgânicos e inorgânicos, alta atividade de água, pH, além da temperatura utilizada nos processos industriais de fermentação (GALLO, 1992).

Os contaminantes utilizam fontes de carbono disponíveis às leveduras para a produção de etanol, competindo assim, com estas quando as condições lhes forem favoráveis, originando subprodutos inibitórios ao metabolismo das leveduras, principalmente, ácido láctico e acético (SKINNER & LEATHERS, 2004).

Gallo (1992), caracterizando a microbiota bacteriana em amostras de leite de levedura, mosto de alimentação e vinho, demonstrou que o gênero *Lactobacillus* foi o contaminante mais freqüente (59,75%), seguido de *Bacillus* (26,58%), *Staphylococcus* (8,76%), *Micrococcus* (1,56%), linhagens da família *Enterobacteriaceae* (1,48%), *Pediococcus* (1,26%) e *Streptococcus* (0,70%).

Tais contaminantes causam diversos problemas no processo fermentativo, destacando-se o consumo de açúcares e nutrientes, contribuindo para a redução na viabilidade das células de leveduras, floculação do fermento, menor rendimento alcoólico do vinho e liberação de metabólitos tóxicos à levedura, comprometendo significativamente o desempenho do processo (BREGAGNOLI, 2006) e a qualidade do destilado final.

Perdas na produção de etanol devido a contaminação bacteriana foram quantitativamente determinadas durante a fermentação na produção de whisky. O estudo mostrou que concentrações de 10^6 a 10^7 UFC/mL acarretaram redução na produção de etanol na ordem de 1-3%, enquanto, populações de 10^7 a 10^8 UFC/mL afetaram negativamente o processo com perda na produção de 3-5% (DOLAN, 1976) citado por Chang et al., 1995.

Thomas, et al., (2001), avaliando uma fermentação de mosto de milho em batelada com diferentes culturas mistas de bactérias lácticas, observaram que a presença de *Lactobacillus fermentum*, ocasionou redução na produção de etanol, aumentando o desvio de carboidratos para a formação de glicerol e ácido láctico, assim como, queda na viabilidade da levedura e diminuição na formação de massa celular.

Microrganismos contaminantes são também reciclados com as leveduras e isto pode causar muitos problemas, gerando competição entre bactérias e leveduras pelo mesmo substrato (OLIVA-NETO & YOKOYA, 2001). O reaproveitamento do inóculo promove um estímulo à multiplicação bacteriana, devido ao enriquecimento do meio causado pelas bactérias hidrolisadas e aminoácidos provenientes das células de leveduras (CHERUBIN, 2003).

Estudos sobre os efeitos da contaminação bacteriana e da produção de ácidos orgânicos em fermentação alcoólica de melaço em sistema batelada-alimentada mostraram que, a acidez produzida aumentou em 2,7 vezes ao longo de 15 ciclos fermentativos. A viabilidade da levedura *S. cerevisiae* diminuiu mais de 64%, assim como o rendimento em etanol decresceu de 75% para 49% do 2º ao 17º ciclo (OLIVA-NETO & YOKOYA, 1994).

Ainda relacionando a acidez aos contaminantes, Nobre (2005) observou que maiores valores de acidez corresponderam a menores porcentagens de viabilidade celular de *S. cerevisiae* quando em cultivo misto com *Lactobacillus fermentum* ou *Bacillus subtilis*, atingindo médias de 6,4 e 2,9g.L⁻¹, enquanto a viabilidade celular da levedura reduziu em 73,5 e 59,2%, respectivamente. Alterthum, et al. (1984) citado por Nobre (2005), observaram que a elevada porcentagem de células mortas e o aumento da acidez do mosto foram devido à liberação no meio de substâncias tóxicas produzidas pelas células bacterianas, promovendo a morte da levedura ou dificultando seu desenvolvimento.

Bactérias como *Lactobacillus* e *Leuconostoc* em concentrações de 10^9 UFC/mL podem levar a uma queda no rendimento alcoólico de 100% e 60%, respectivamente, além de reduzir a viabilidade das leveduras em 10% (ANTONINI, 2004). Narendranath, et al. (2001) ressaltam que é necessário diminuir o número de microrganismos presentes no mosto de tal modo que o nível de produtos bacterianos seja menor para não afetar as taxas de produção e rendimento alcoólico.

Para fermentações industriais, as contaminações bacterianas acima de $5,0 \cdot 10^6$ UFC.mL⁻¹ são consideradas prejudiciais, acima de $1,0 \cdot 10^7$ UFC.mL⁻¹ os prejuízos econômicos são significativos e acima de $1,0 \cdot 10^8$ UFC.mL⁻¹ ocorrem quedas nos rendimentos fermentativo e industrial, dificuldades de operação de centrífugas, floculação e aumento de consumo de ácido sulfúrico e antibióticos (CHERUBIN, 2003).

A maneira para controlar a infecção é adequar o ambiente da fermentação alcoólica. As dornas de fermentação devem ser esvaziadas e limpas regularmente; evitando-se 'pontos mortos' nas tubulações de mosto e vinho; maximizando o crescimento da levedura; promovendo fermentações rápidas com temperatura controlada e quando necessário adicionar agentes antibacterianos (KELSALL & LYONS, 2003).

2.4.1 Bactérias lácticas e acéticas

O consumo de sacarose destinada a formação dos ácidos láctico e acético, como principais ácidos orgânicos formados, é um dos principais prejuízos causados pelas bactérias contaminantes no processo de produção de etanol.

As bactérias ácido lácticas apresentam maior preocupação, pois são mais tolerantes a altas temperaturas, baixo pH e possuem habilidade de crescimento rápido. Na fermentação láctica uma molécula de glicose é convertida em duas de ácido láctico, impossibilitando, a conversão desta molécula em etanol, conseqüentemente, reduzindo o rendimento fermentativo. Além disso, muitos nutrientes são desviados para a multiplicação bacteriana, deixando de ser utilizado pelas leveduras (NARENDRANATH, et al., 1997).

O ácido acético é encontrado em menor proporção, mesmo assim, exibe um forte poder inibitório sobre o processo fermentativo, sendo este, produzido por

microrganismos contaminantes como bactérias ácido láticas e acéticas (NARENDRANATH, et al., 2001). Este ácido na forma não dissociada, difunde no interior da célula da levedura através da membrana celular, a um alto pH intracelular, eles dissociam, produzindo íons hidrogênio, causando mudanças na atividade metabólica da levedura (HUNTER & SEGEL, 1973; KASHKET, 1987) citado por Narendranath, et al. (2001).

Estes autores (NARENDRANATH, et al., 2001), estudando a taxa específica de crescimento de duas linhagens de leveduras na presença de ácido láctico e acético, observaram que com o aumento da concentração dos ácidos, um aumento exponencial na fase *lag* da curva de crescimento foi registrado. Encontraram que, concentrações de ácido acético menores, de 0,05-0,1% p/v e concentrações de ácido láctico de 0,8-1,0% p/v, provocaram estresse a levedura, levando a uma redução na taxa de crescimento e no consumo de glicose, diminuindo a produção de etanol.

O acetato é mais tóxico que o lactato, os quais sendo simultaneamente produzidos pelas bactérias heterofermentativas levariam a se especular que tais bactérias exerceriam um efeito deletério mais pronunciado para as leveduras do que aquelas possuidoras do metabolismo homofermentativo (COSTA, 2006).

O ácido láctico afeta diretamente o metabolismo da levedura, refletindo na queda da viabilidade, teor alcoólico, população e aumento da floculação, fatores indesejáveis no processo fermentativo (VENTURA, 2007).

Através da fermentação de carboidratos, sobre condições anaeróbicas, as bactérias láticas obtém energia para produção de ácido láctico (linhagens homofermentativas) ou para a formação de produtos finais, tais como, etanol, CO₂, ácido láctico e em menor proporção ácido acético (linhagens heterofermentativas). (NARENDRANATH, et al., 1997).

Chang, et al. (1995), estudando o efeito de bactérias contaminantes sobre fermentação em batelada de substrato amiláceo, observaram que, a presença de *L. casei* 4-3 e *L. fermentum* 7-1, provocou uma redução de 6 e 10% respectivamente, na concentração de etanol produzido.

De acordo com Ventura (2007), baixos teores alcoólicos e menor crescimento de leveduras foi registrado, quando o teor de ácido láctico na fermentação atingiu valores acima de 774mg/L, ou seja, próximo a concentração mínima inibitória de 800mg/L (m/v) de ácido láctico em relação a levedura.

A floculação também é um problema que afeta o desempenho da fermentação, ocorrendo através de um mecanismo de agregação de células, originado pela interação entre bactérias floculentas e leveduras.

Ludwing, et al. (2001) caracterizando a floculação de *S. cerevisiae* por *L. fermentum*, verificou em seus ensaios que ao utilizar uma concentração bacteriana de 1,38 a 3,76g/L de biomassa seca, a porcentagem de floculação atingiu 100%, enquanto concentrações de 0,434 e 0,851g/L, apresentou índices de 0 e 13-25%, respectivamente. Segundo estes autores, tal situação comprometeria claramente a estabilidade da fermentação alcoólica industrial, justificando, portanto, a necessidade do controle bacteriano no processo em níveis bem inferiores a esses quantificados.

2.5 Uso de Inibidores na Fermentação Alcoólica

Como já mencionado, o caldo de cana constitui-se num ótimo substrato para o crescimento microbiano, devido às varias condições favoráveis ao seu desenvolvimento. Neste contexto, observa-se a importância do controle e monitoramento do processo fermentativo, destinado a produção de cachaça, possibilitando a redução dos problemas causados pela contaminação. De modo semelhante, verifica-se a obtenção de maiores rendimentos de álcool e um melhor balanço dos compostos secundários que caracterizam a bebida.

Uma das maneiras de combater o crescimento microbiano é com a utilização de agentes antimicrobianos. Porém, o eficiente controle só é conseguido com o uso de antimicrobianos adequados e na dosagem correta, pois a aplicação desses produtos deve visar apenas a população de bactérias e não a de leveduras (ANTONINI, 2004).

O ácido sulfúrico adicionado no mosto é um dos antissépticos mais utilizados no controle de contaminantes durante a fermentação alcoólica. Gallo & Canhos (1991) observaram que o tratamento ácido do fermento com a utilização de ácido sulfúrico, por um tempo de aproximadamente de 2 horas, mantendo-se o pH em 2,5, provocou uma redução média de 44,38% na microbiota bacteriana presente.

Um estudo avaliando a susceptibilidade de 40 estirpes de *Lactobacilos* spp. sobre diferentes agentes antimicrobianos, mostraram uma concentração bactericida inibitório, superior à 100µg/mL para penicilina, com um grau de inibição de 100% das linhagens, mas somente 22% foram mortas. Similarmente, para ampicilina, uma

concentração bactericida inibitório, superior a 350µg/mL, foi encontrada, com inibição de 97% das linhagens, com 5% de células mortas (BAYER, et al., 1978).

A ampicilina é um antimicrobiano sintético do tipo penicilina, de amplo espectro, sendo um quimioterápico do grupo β-lactâmico que interfere na síntese de polipeptidioglicano, na parede celular bacteriana, cuja ação final é a inativação de um inibidor das enzimas autolíticas, conduzindo à lise da bactéria. A ampicilina é destruída por algumas bactérias que produzem β-lactamase e por muitos microrganismos Gram-negativos (RANG et al., 1995).

A aplicação de sulfito em meio fermentativo, também mostrou reduzir o número de células de *L. fermentum* 7-1 de $3,1 \times 10^8$ para $1,9 \times 10^7$ células/mL, aumentando a concentração de etanol de 57,2 para 78,1g/L (CHANG, et al. 1997).

O uso indiscriminado e prolongado de antimicrobianos químicos sintéticos tem levado à seleção de microrganismos patogênicos mutantes resistentes a esses compostos, tornando o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa eficaz e econômica (CRISAN et al., 1995).

2.6 Extrato de Própolis

A própolis é uma substância resinosa produzida pelas abelhas *Apis mellifera* através da transformação de diferentes exudatos de plantas, tais como secreções de árvores, folhas e flores. Esta resina é utilizada na proteção da colméia contra proliferação de microrganismos, incluindo fungos e bactérias (SILVA, et al. 2006), assim como, para selar aberturas e eliminar insetos invasores (PARK & IKEGAKI, 1998).

O extrato etanólico de própolis demonstra propriedades biológicas e farmacológicas, tais como antibacteriana (GRANDE & DAVEY, 1990; MARCUCCI, et al., 2001; SALOMÃO, et al., 2008), antioxidante (PARK & IKEGAKI, 1998), antifúngica (KUJUMGIEV, et al., 1999; OLIVEIRA, et al., 2006; SALOMÃO, et al., 2008), citotóxica (BANSKOTA, et al. 2000), antiinflamatória (BORRELLI, et al., 2002), antiviral (AMOROS, et al., 1992; KUJUMGIEV, et al. 1999), entre outras. Além das diversas utilidades, a própolis também vem sendo utilizada pelas indústrias farmacêutica e alimentícia na forma de alimentos funcionais (ACKERMANN, 1991).

Bankova, et al., (2000), identificaram mais de 300 constituintes em diferentes amostras de própolis. Flavonóides, derivados prenilados, ácido caféico, terpenóides, ésteres e compostos fenólicos parecem ser os principais componentes responsáveis pelas propriedades biológicas da própolis (SILICI & KUTLUCA, 2005; SILVA, et al, 2006; CASTRO, et al., 2007; SALOMÃO, et al., 2008). Estes componentes podem variar em função do período e região geográfica de coleta, interferindo de maneira substancial na concentração de compostos bioativos, influenciando assim, a atividade antibacteriana (KUJUMGIEV, et al., 1999; FERNANDES JR., et al., 2006).

Castro, et al. (2007) estudando amostras de extrato etanólico de própolis, coletadas em períodos distintos do ano no sudeste e nordeste do Brasil, mostraram que a atividade antimicrobiana do extrato foi menor durante o período de inverno e maior durante a seca. Provavelmente, isso se reflete em aumento na concentração dos princípios ativos em diferentes épocas de coleta.

De acordo com Marcucci & Bankova (1999), a atividade biológica do extrato etanólico de própolis brasileira, têm sido atribuída a compostos fenólicos, tais como, flavonóides, ácido cumárico, ácido caféico e seus derivados prenilados. O mecanismo de ação destes compostos está relacionado com o sinergismo entre fenóis e outros compostos na resina (BURDOCK, 1998). Os flavonóides e os ésteres fenólicos do ácido caféico são compostos fenólicos que possuem a capacidade de inibir o crescimento e a divisão celular, aumentar a permeabilidade da membrana e interferir na motilidade celular dos microrganismos (SWERTS, et al., 2002). Entretanto, Kujumgiev, et al. (1999), observaram que a diminuição no conteúdo de compostos fenólicos em amostras de própolis, não provocou redução na atividade biológica do extrato, associando este fato a outros compostos, no qual, contribuem na manutenção desta atividade.

O mecanismo de atuação da própolis sobre o crescimento bacteriano tem sido demonstrado pela inibição da divisão celular, destruição na estrutura da parede celular, desorganização do citoplasma, além de causar alterações na membrana citoplasmática e inibir a síntese de proteínas (TAKAISI-KIKUNI & SCHILCHER, 1994).

Salomão, et al. (2008), estudando a atividade antibacteriana de extrato etanólico de própolis, mostraram que esta biomolécula é efetiva sobre os gêneros *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Trypanossoma cruzi*, associando esta atividade com a presença de derivados do ácido cumárico e ácido caffeolyquinie.

Uma completa inibição do crescimento de *S.aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Branhamella catarrhalis* e *B. cereus* foi observada utilizando-se extrato etanólico de própolis. Em particular, houve inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, mas não de *Klebsiella pneumoniae* (GRANGE & DAVEY, 1990)

Extrato comercial de própolis brasileira foi testado quanto à sua atividade antimicrobiana contra algumas linhagens de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O extrato apresentou maior atividade contra *S. mutans* e *S. aureus*, e menor ação contra Gram negativas, tais como, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *E. coli* (REZENDE, et al., 2006).

Amostra de própolis obtida a partir de etanol 80% (m/v) demonstrou maiores atividades antioxidantes, resultado, de altos níveis de flavonóides liberados com uma concentração de solvente desta ordem (PARK & IKEGAKI, 1998). De acordo com Russo, et al. (2002), extrato de própolis contendo éster de ácido caféico prenilado exibiram forte atividade antioxidante, quando comparado com extrato sem este componente.

Uma mistura de isômeros de 3,3-dimetil cafenato e cafeato de isopentenil isolados de própolis da região da Turquia mostrou-se mais ativo que o padrão Ampicilina sobre as linhagens *S. aureus* e *S. epidermidis*, mas menos ativo contra *B. subtilis* (KARTAL, et al., 2003).

Dentre as variedades de própolis encontradas no território nacional, a própolis dos arbustos do alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*), conhecida também como própolis verde, é um produto tipicamente brasileiro, altamente eficaz no combate de uma série de microrganismos (BASTOS, 2001; MARCUCCI et al., 2001; PINTO, et al., 2001; LEITÃO, et al., 2004; INOKUCHI, et al., 2006).

As abelhas *Apis mellifera* coletam secreções resinosas nos ápices vegetativos de *B. dracunculifolia*, quando estas não estão em floração. Tudo indica que as abelhas ao romperem os tecidos superficiais dos ápices vegetativos, alcançam as secreções resinosas dos tricomas glandulares, coletando células epidérmicas e mesofílicas, que possuem em sua constituição, compostos fenólicos e terpênicos, até atingirem os ductos exudados (BASTOS, 2001).

A própolis do alecrim-do-campo possui um teor relativamente baixo de flavonóides, constituintes considerados comumente como responsáveis pelas

propriedades terapêuticas de própolis (PEREIRA, et al., 1999). Bastos (2001) apontou os compostos fenólicos e os terpenos como os principais constituintes das secreções resinosas de *B. dracunculifolia*, sugerindo que a presença destes no extrato de própolis, advém da planta.

Sugere-se que a combinação de extratos de própolis com antimicrobianos sintéticos possam reduzir a dose de determinados antibióticos potencializando o tratamento de infecções em que a resistência bacteriana torna-se fator determinante (MIRZOEVA, et al. 1997). Relatos demonstram que o sinergismo entre antibióticos (Amoxicilina, Ampicilina e Cefaloxin) e extrato etanólico de própolis, mostram eficiente redução sobre o crescimento de *Salmonella Typhi* (ORSI, et al. 2006). A adição de 100 µg/mL de própolis em meio sólido de Agar aumentou a sensibilidade de *B. subtilis* à Kanamicina, ácido nalidíxico, tetraciclina, penicilina G e ampicilina. Numa concentração de 200 µg/mL, uma amostra selvagem de *E. coli* mostrou maior sensibilidade à tetraciclina e ácido nalidíxico. Porém, uma amostra de *E. coli* resistente à Kanamicina, neomicina e ampicilina não adquiriu sensibilidade em concentração de 200 µg/mL e 400 µg/mL de própolis ao meio. Tais dados sugerem um pequeno efeito sinérgico entre própolis com alguns antibióticos (MIRZOEVA, et al. 1997)

A combinação de extrato etanólico de própolis com antibiótico Doxiciclina sobre o crescimento de *K. pneumoniae*, demonstrou maior grau de inibição quando na presença de baixa concentração de extrato de própolis. Isso mostra o potencial da própolis em aumentar a atividade do antibiótico potencializando o tratamento de infecções microbianas (STEPANOVIC, et al. 2003).

Bregagnoli (2006) estudando os reflexos do extrato etanólico de própolis no controle de contaminantes da fermentação alcoólica na produção de cachaça orgânica, evidenciou que mostos tratados com esta biomolécula, apresentaram menores índices de contaminantes e viabilidade celular sempre constante. O extrato etanólico de própolis atenuou a competição entre células de leveduras e bactérias pelos nutrientes do meio, exercendo efeito inibitório sobre as bactérias contaminantes do processo.

Diversos estudos demonstram que a própolis possui acentuada ação inibidora, sobre os gêneros Gram-positivos e, menor inibição sobre os gêneros de bactérias Gram-negativas (GRANGE & DAVEY, 1990). Geralmente, as bactérias contaminantes da fermentação alcoólica são em sua maioria Gram-positivas, o que pode explicar a

eficiência biocida do extrato de própolis no controle de contaminantes do processo (BREGAGNOLI, 2006).

Dentro desse enfoque, o objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência de biocidas naturais, extrato de própolis marrom e própolis verde e o sinergismo com agente antimicrobiano sintético, ampicilina, no controle de bactérias contaminantes da fermentação alcoólica na produção de cachaça.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Instalação e condução do experimento

O experimento foi instalado na região de Uberaba-MG, na Fazenda Tamboril, nos meses de julho/agosto (início) e setembro/outubro (final) da safra 2009/2010, em unidade de produção de cachaça. As avaliações e análises foram realizadas no laboratório da indústria e no laboratório de Tecnologia do Açúcar e Álcool, Microbiologia das Fermentações do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Jaboticabal –SP.

3.2 Matéria-prima

Foram utilizados colmos de cana-de-açúcar cultivados na propriedade produtora de cachaça da região de Uberaba – MG, empregando-se a variedade SP 70-1406, colhida manualmente, sem queima da palha, despontada e imediatamente processada.

3.3 Preparo dos antimicrobianos

A extração dos princípios ativos das própolis marrom e verde (coletadas respectivamente em Guaxupé e Patos de Minas - MG - Brasil) foi realizada a partir da mistura de 25g de própolis triturada em 100 mL de solução de etanol 80% (v/v) sob agitação, em banho termostático a temperatura de 70°C durante 30 minutos (KOO, 1996). A solução de ampicilina foi elaborada triturando-se um comprimido de ampicilina de 500 mg em almofariz, diluindo em 100mL de água destilada e esterilizada em autoclave a 121°C por 15 minutos.

As dosagens utilizadas foram 700 $\mu\text{L.L}^{-1}$ para os extratos de própolis e ampicilina, e para o sinergismo entre os antimicrobianos foi utilizado 500 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de própolis verde e 300 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de ampicilina. Essas dosagens foram estabelecidas através de ensaios preliminares, quando se verificou inibição do crescimento bacteriano sem afetar a viabilidade das leveduras.

3.4 Preparo do mosto

O caldo extraído foi submetido a filtração no processo industrial para retenção de impurezas minerais e bagacilho. O mosto foi padronizando a Brix 14° com auxílio de um refratômetro, com adição de água de qualidade. Não houve adição de outros complementos nutricionais, considerando-se que o caldo de cana deve possuir todos os nutrientes necessários para garantir o pleno desenvolvimento do processo fermentativo.

3.5 Microrganismos e fermentação alcoólica

O microrganismo utilizado para o desenvolvimento do processo fermentativo foi o fermento comercial prensado constituído por 30g.L^{-1} de mostos de células de *S. cerevisiae* (10×10^7 UFC x mL^{-1}).

As fermentações foram realizadas em bateladas, com recuperação do fermento por decantação, em dornas de aço inoxidável de fundo cônico, com capacidade para 4,5L. Cada tratamento recebeu 2,5L de mosto a 14°Brix, divididos em duas alimentações de 1,0L na primeira alimentação e 1,5L após um intervalo de 60 minutos. Os tratamentos utilizados foram: controle (sem adição de biocidas), mosto com adição de extrato de própolis marrom, mosto com adição de extrato de própolis verde, mosto com solução de ampicilina e mosto com extrato de própolis verde e ampicilina. A cada dois ciclos o fermento foi lavado com água para a testemunha e água mais os biocidas correspondentes a cada tratamento, nas concentrações citadas anteriormente. Ao final do 5º ciclo fermentativo foi realizada a limpeza do fundo de dornas para retirada de material inerte e células mortas. Realizou-se 10 ciclos fermentativos, com duração de aproximadamente 18-24 horas cada. Ao término de cada ciclo, aguardava-se a decantação do fermento para separação do vinho.

3.6 Análises microbiológicas do mosto e vinho.

Para a determinação da viabilidade das leveduras empregou-se a contagem em câmara de Neubauer (LEE, et al., 1981) no início (30 min após a última alimentação da dorna) e no final dos ciclos fermentativos (após aproximadamente 24 horas, quando o

Brix apresentava leitura ≤ 1 no intervalo de 1 hora). Os parâmetros avaliados foram: viabilidade celular e de brotos e índice de brotamento. A quantificação de microrganismos no pé-de-cuba foi realizada antes do tratamento com biocidas e após 1 hora da aplicação dos biocidas. Para determinação de bactérias lácticas foi utilizado o meio MRS (Man, Rogosa e Sharp – Merck: extrato de levedura – 5g, peptona – 10g, extrato de carne – 5g, dextrose – 20g, fosfato hidrogênio dipotássico – 2g, tween 80 – 1g, acetato de sódio – 5g, sulfato de magnésio – 0,05g e agar – 15g por litro de meio) com adição de cicloheximida (100mg/L). Para contagem de leveduras totais empregou-se o meio WLN (Wallerstein Laboratories Nutrient Agar-Difco: glicose – 50g, fosfato hidratado de potássio – 550mg, cloreto de potássio – 425mg, cloreto de cálcio – 125mg, sulfato de magnésio – 125mg, cloreto férrico – 2,5mg, sulfato de manganês – 2,5g, caseína – 5g, extrato de levedura – 4g, verde de bromocresol – 22mg e Agar – 20g para cada litro de meio) com adição de ampicilina (500mg/L) e ácido nalidíxico (500mg/L). Para contagem de microrganismos totais foi utilizado o meio de cultura PCA (Plate Count Agar – Difco: caseína – 5g, extrato de levedura – 2,5g, dextrose – 1g e Agar – 15g por litro de meio). As amostras de vinho foram diluídas em solução salina estéril (0,85%), para 10^{-6} para os meios WLN e PCA e 10^{-4} e 10^{-5} para o meio MRS. Alíquotas de 0,1mL foram transferidas para as placas contendo os meios de culturas e incubadas por aproximadamente 48 horas a $30^{\circ}\text{C} \pm 1$ para o meio WLN e PCA e aproximadamente 72 horas para o meio MRS. Para mosto, foram realizadas contagens de bactérias lácticas em meio MRS, utilizando-se a diluição de 10^{-2} , incubados a $30^{\circ}\text{C} \pm 1$.

3.7 Destilação

A destilação do vinho foi realizada em alambiques de cobre, com capacidade para 10 litros de vinho. O equipamento foi aquecido através de fogo direto. O vinho decantado foi recolhido na quantidade de 2.000 mL de cada repetição, em cada tratamento. Os vinhos dos mesmos tratamentos (repetições) foram misturados totalizando 6.000 mL e enviados ao alambique, aquecido sob temperatura controlada. A destilação foi conduzida separando-se as frações cabeça, coração e cauda. A fração de coração foi recolhida, correspondendo a 80% (volume) do destilado com graduação de 38 a 40%.

3.8 Análises tecnológicas do mosto e vinho

- **Brix do mosto e vinho:** determinado por refratometria (SCHENEIDER, 1979) e densimetria a 20°C, respectivamente;
- **Açúcares Redutores Totais (ART) % do mosto:** expressos em relação a glicose e dosados pelo método volumétrico de LANE & EYNON (1934);
- **Acidez Total do mosto e vinho:** determinado através da titulação do mosto e vinho em agitação com NaOH padrão 0,05N, expressa em g H₂SO₄/L (AMORIM, 1996);
- **Açúcares Redutores Residuais Totais (ARRT) do vinho:** segundo a técnica descrita por LANE & EYNON, (1934).
- **Glicerol do vinho:** segundo técnica descrita por MACGOWAN, et al. (1983);
- **Teor Alcoólico do vinho (%v/v):** segundo NOVAES (1988).

Para quantificação cromatográfica do destilado, coletou-se amostras das frações de coração dos ciclos 1,4,7 e 10, segundo metodologia proposta por Monick (1986).

3.9 Delineamento experimental

Para as análises tecnológicas e microbiológicas do vinho e pé-de-cuba, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em parcelas sub-subdivididas, em esquema fatorial 5x2x10 com três repetições, sendo quatro biocidas (extrato de própolis marrom, extrato de própolis verde, ampicilina e interação própolis/ampicilina) e controle, combinando-se os tratamentos em início e final de safra por 10 ciclos fermentativos.

Para as análises tecnológicas do mosto, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em parcelas subdivididas, em esquema fatorial 2x10 com três repetições, sendo duas épocas da safra (início e final) por 10 ciclos fermentativos (BANZATTO & KRONKA, 2006).

IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Condições climáticas

O presente estudo foi realizado nos meses de julho/Agosto e Outubro/Novembro, durante os períodos de início e final da safra 2009/2010. A precipitação pluviométrica teve um acentuado acréscimo entre o início e final da safra, passando de 27,0 mm no mês de agosto para 214,0 mm no mês de outubro (Tabela 1). Houve elevação da temperatura, sendo outubro e novembro os meses no qual se registrou maior temperatura média do ano de 2009 para a região (Tabela 1). As características climáticas apresentaram-se distintas entre as épocas estudadas, observando-se alta precipitação, com conseqüente aumento na umidade relativa do ar e do solo, não determinadas, mas observadas visualmente, para o final da safra.

Tabela 1 – Dados meteorológicos mensais para o ano de 2009. Uberaba-MG. Fonte: Prata e Oliveira consultoria (2009).

Mês	Tmax (°C)	Tmin (°C)	Tmed (°C)	UR (%)	Precipitação Total (mm)
Janeiro	20,4	27,3	23,9	68,5	576
Fevereiro	20,8	27,4	24,1	70,4	421
Março	20,7	26,8	23,8	73,6	305
Abril	18,8	26,0	22,4	63,2	193
Mai	17,5	27,1	22,3	53,2	57
Junho	15,6	24,8	20,2	58,8	51
Julho*	12,0	28,4	20,2	51,7	20
Agosto*	17,3	27,9	22,6	55,1	27
Setembro	19,6	29,2	24,4	66,9	110
Outubro*	20,3	31,0	25,7	73,7	214
Novembro*	21,4	33,0	27,2	74,1	219
Dezembro	20,5	28,4	24,5	81,8	250

Tmax: temperatura máxima; Tmin: temperatura mínima; Tmed: temperatura média; UR: umidade relativa do ar, * : meses desenvolvimento do experimento.

4.2 Avaliações microbiológicas

Os resultados obtidos e submetidos a análise de variância, para acidez total e contagem de bactérias lácticas no mosto em início e final de safra, indicaram diferença

significativa ($p < 0,01$) (Tabela 2). Os resultados (Figura 1) mostram que houve um maior nível de comprometimento na qualidade da matéria-prima entre as épocas estudadas. Para acidez total do mosto, as médias diferiram estatisticamente entre si, apresentando comportamentos distintos entre épocas, com índices maiores no final da safra. Tal comportamento também foi observado para os contaminantes, verificando-se que no final da safra ocorreram melhores condições para o desenvolvimento da microbiota contaminante.

Tabela 2: Resultados da análise de variância de acidez total ($\text{gH}_2\text{SO}_4/\text{mL}^{-1}$) e bactérias lácticas (10^{-3} UFC/mL) no mosto em início e final de safra 2009/2010.

Causas de Variação	Acidez Total (valores de F)	Bactérias Lácticas UFC.mL⁻¹ (valores de F)
Épocas (A)	75,55**	240,54**
Ciclos (B)	1,34 ^{ns}	0,73 ^{ns}
AxB	0,87 ^{ns}	0,86 ^{ns}

ns = não significativo, * = significativo ao nível de 5% e ** = significativo ao nível de 1%

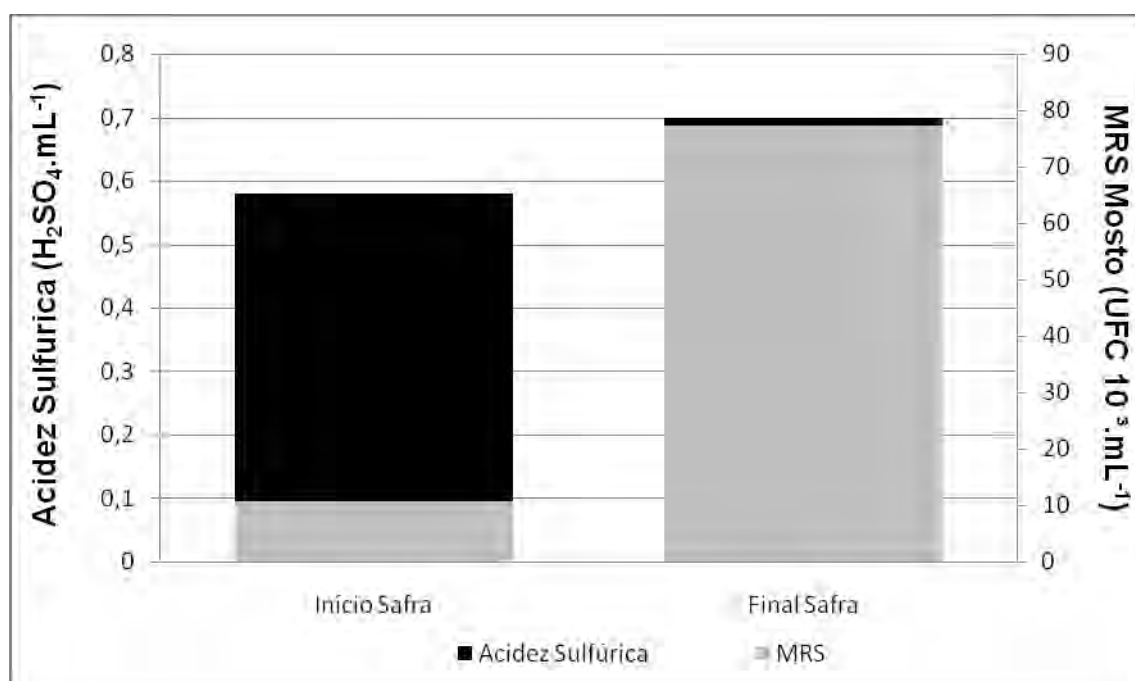


Figura 1: Valores médios de acidez total ($\text{gH}_2\text{SO}_4/\text{mL}^{-1}$) e bactérias lácticas (10^{-3} UFC.mL⁻¹) no mosto em início e final de safra

Tal fato pode estar relacionado ao aumento da temperatura e umidade no ambiente de cultivo da planta, proporcionando condições mais favoráveis ao desenvolvimento de bactérias contaminantes na matéria-prima. Além disso, o aumento na disponibilidade de água e a elevada temperatura induzem a planta ao crescimento,

conseqüentemente aumentando a produção dos ácidos orgânicos. Neste sentido, deve-se considerar que a planta apresenta uma acidez intrínseca, proveniente de ácidos orgânicos e outros metabólitos que a caracterizam. Há que se observar ainda a possibilidade de agregação de compostos ácidos formados pelos microrganismos contaminantes, que se encontravam em maiores concentrações no final da safra. Possivelmente este fato explica a maior concentração de microrganismos contaminantes nos tratamentos mais comprometidos, para as épocas analisadas.

Durante os processos fermentativos é desejável que as leveduras tenham à sua disposição não só açúcares, mas também outros elementos que possam promover seu desenvolvimento. Portanto, a composição do caldo é de fundamental importância, e depende da variedade da cana, estágio de maturação, sanidade da cultura, higiene dos processos de produção, dentre outros. Neste contexto, a viabilidade celular das leveduras é um parâmetro, que auxilia na interpretação do comportamento das células em uma determinada condição de processo.

Os resultados obtidos e submetidos a análise de variância, para a viabilidade das células de leveduras presentes no vinho no início e final dos ciclos fermentativos, indicaram diferença significativa ($p < 0,01$) (Tabela 3) com os maiores valores de F no início das fermentações para biocidas e ciclos e no final para biocidas e época.

Tabela 3: Resultados da análise de variância da porcentagem de viabilidade de células de leveduras no início e final dos ciclos fermentativos, em vinho de mosto de cana.

<i>Causas de Variação</i>	<i>Viabilidade Celular (valores de F)</i>	
	Início Safra	Final Safra
Biocidas (A)	24,12**	87,80**
Épocas (B)	2,87 ^{ns}	14,13**
Ciclos (C)	4,98**	8,67**
AxB	0,90 ^{ns}	0,59 ^{ns}
AxC	3,39**	2,42**
BxC	1,58 ^{ns}	1,26 ^{ns}
AxBxC	0,72 ^{ns}	0,95 ^{ns}

ns = não significativo, * = significativo ao nível de 5% e ** = significativo ao nível de 1%

No decorrer dos ciclos fermentativos, os índices de viabilidade foram decrescendo para o tratamento controle, em função da perda de células viáveis durante o reciclo das células, assim como aumento da competitividade entre células de leveduras e bactérias, submetendo as leveduras a condições de maior estresse. No início e final dos processos fermentativos, os índices de viabilidade celulares (Figura 2)

mantiveram-se sempre em níveis elevados e superiores a 90% para os tratamentos com extrato de própolis marrom, própolis verde, ampicilina e interação própolis/ampicilina (P/A), decrescendo para o tratamento controle. Este resultado corrobora com Bregagnoli (2006), que relatou a manutenção da viabilidade celular de leveduras, através do controle de microrganismos contaminantes pelo emprego de extrato etanólico de própolis no tratamento do pé-de-cuba.

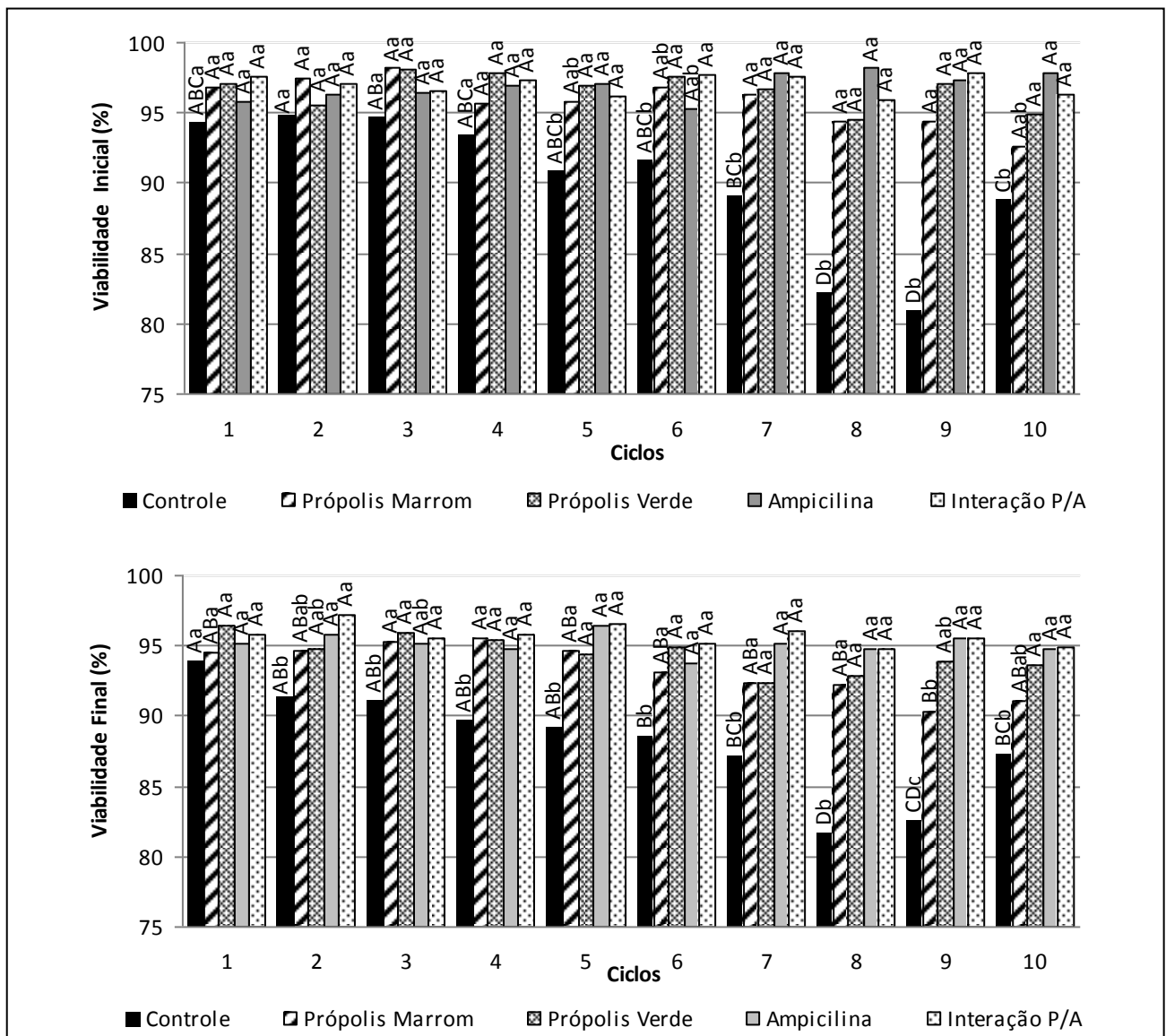


Figura 2: Desdobramento da interação entre tratamentos e ciclos para viabilidade celular de leveduras no início e final do processo fermentativo. Letras maiúsculas comparam médias entre ciclos com mesmo tratamento. Letras minúsculas comparam médias entre os tratamentos de cada ciclo.

De acordo com Oliva-Neto & Yokoya (1997), o principal indicador de estresse na levedura é a viabilidade celular, portanto, quanto maior a viabilidade, melhor o desempenho fermentativo. Esses resultados demonstram a capacidade da própolis em aumentar a competitividade entre células de leveduras e bactérias contaminantes, favorecendo a manutenção de células viáveis de leveduras durante a fermentação alcoólica.

A queda na viabilidade celular está associada a diversos fatores, tais como disponibilidade de nutrientes e presença de contaminantes, decorrentes da matéria-prima deteriorada. No presente estudo, houve uma redução menos acentuada na viabilidade celular quando os contaminantes foram controlados, evidenciando os reflexos negativos dos mesmos sobre o desempenho da microbiota fermentativa.

A análise de variância para viabilidade de brotos no final dos ciclos fermentativos foi significativa para biocidas, épocas e ciclos, não apresentando diferença significativa no início dos ciclos fermentativos, o que pode ser atribuído ao potencial do inóculo no início da safra (Tabela 4). Na Figura 3 é possível observar que a viabilidade de brotos foi inferior para o tratamento que não submetia o pé de cuba ao tratamento com antimicrobianos, demonstrando o impacto negativo dos microrganismos contaminantes durante os reciclos do fermento. Este fato já era esperado, uma vez que a viabilidade celular também foi menor para o tratamento controle.

Tabela 4: Resultados da análise de variância da porcentagem de viabilidade de células de brotos no início e final dos ciclos fermentativos, em vinho de mosto de cana.

Causas de Variação	Viabilidade de Brotos (valores de F)	
	Início Safra	Final Safra
Biocidas (A)	1,28 ^{ns}	14,71 ^{**}
Épocas (B)	0,04 ^{ns}	13,41 ^{**}
Ciclos (C)	1,92 ^{ns}	6,37 ^{**}
AxB	0,49 ^{ns}	1,62 ^{ns}
AxC	1,30 ^{ns}	2,09 ^{**}
BxC	3,73 ^{**}	2,03 [*]
AxBxC	1,82 ^{**}	1,09 ^{ns}

ns = não significativo, * = significativo ao nível de 5% e ** = significativo ao nível de 1%

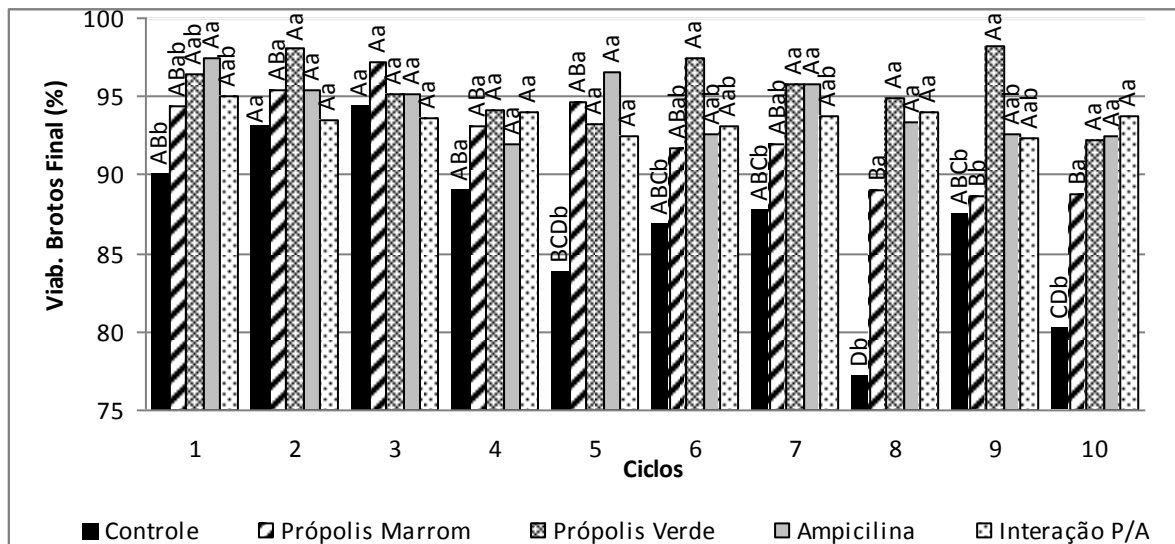


Figura 3: Desdobramento da interação entre tratamentos e ciclos para viabilidade celular de brotos no final do processo fermentativo. Letras maiúsculas comparam médias entre ciclos com mesmo tratamento. Letras minúsculas comparam médias entre os tratamentos de cada ciclo.

A redução no número de brotos viáveis no decorrer dos ciclos fermentativos para o tratamento controle pode estar relacionada ao aumento da concentração de bactérias contaminantes e seus metabólitos tóxicos no pé-de-cuba, resultantes da ausência de controle dos microrganismos contaminantes. Em condições normais, essa redução ocorre, porém sem interferir na condução da fermentação e viabilidade das células de leveduras (MUTTON, 1998). Considerando-se que as leveduras são reutilizadas em ciclos fermentativos posteriores, é de extrema importância a manutenção de células e brotos viáveis até o final da fermentação, sendo fundamental a redução da população de bactérias contaminantes e conseqüentemente, redução da liberação de metabólitos tóxicos a estes procaríotos.

A partir do 5º ciclo fermentativo, verificou-se redução na viabilidade de brotos de leveduras para o período de final de safra da interação ciclos e época (Figura 4). Provavelmente resultantes da melhor qualidade da matéria-prima no início da safra, quando o mosto apresentava-se com uma menor concentração de contaminantes e acidez total. Observou-se um comportamento variável entre épocas, ora mostrando melhores porcentagens em um ora em outro, e ainda em ciclos onde não se observaram diferenças significativas. Provavelmente este fato está associado à capacidade de adaptação das leveduras ao longo dos ciclos fermentativos, na tentativa de permanecerem no processo.

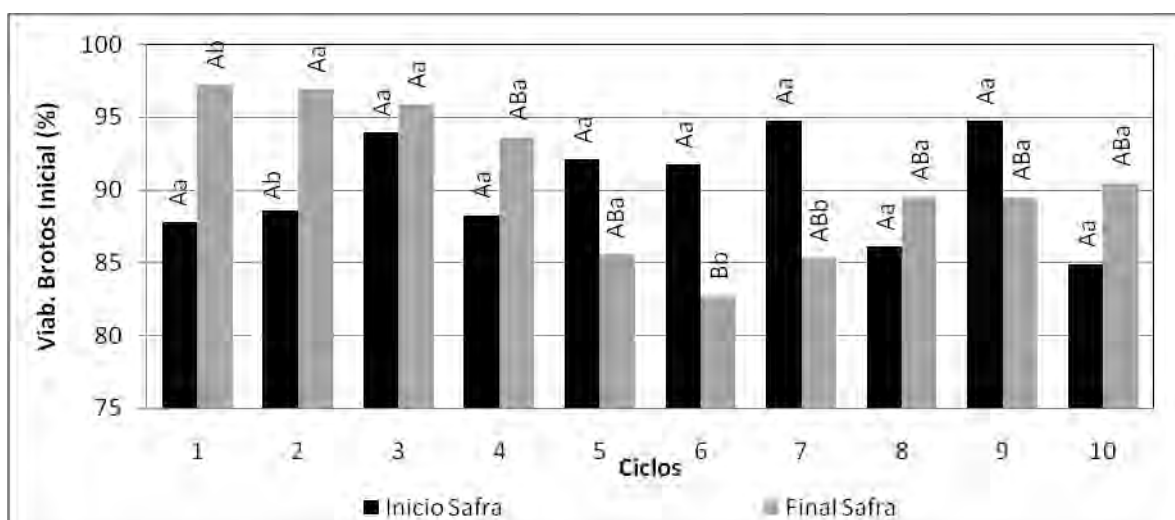


Figura 4: Desdobramento da interação entre tratamentos e ciclos para viabilidade de brotos de leveduras (%). Letras maiúsculas comparam médias entre os ciclos da mesma época. Letras minúsculas comparam médias entre épocas no mesmo ciclo.

O efeito biocida da própolis foi mais evidente no início da safra, confirmando que a qualidade da matéria-prima aliada ao controle das bactérias contaminantes, favoreceram a manutenção de células viáveis de leveduras durante os ciclos fermentativos.

Os resultados da análise de variância para os resultados de plaqueamento dos vinhos diluídos para 10^{-6} em meio MRS mostraram diferenças significativas para biocidas, épocas e ciclos ($p < 0,01$) no plaqueamento realizado em pé-de-cuba antes e depois do tratamento com biocidas (Tabela 5).

Tabela 5: Resultados da análise de variância do número de UFC/mL em placas de MRS de pé-de-cuba diluído a 10^{-6} em amostragens feitas antes e após tratamento do pé-de-cuba com biocidas.

Causas de Variação	UFC mL⁻¹ em MRS (valores de F)	
	Início Safra	Final Safra
Biocidas (A)	1106,33**	891,43**
Épocas (B)	7734,33**	5017,07**
Ciclos (C)	741,50**	785,13**
AxB	853,63**	566,62**
AxC	40,21**	44,22**
BxC	156,54**	161,59**
AxBxC	40,39**	45,05**

ns = não significativo, * = significativo ao nível de 5% e ** = significativo ao nível de 1%

As concentrações de bactérias lácticas no pé-de-cuba (Figura 5) foram significativamente menores com o emprego de extrato de própolis marrom, própolis verde, ampicilina e interação P/A. Essa redução foi mais acentuada no início da safra, onde a interação P/A mostrou-se mais eficiente no controle dos microrganismos contaminantes. O sinergismo entre antibióticos e extrato etanólico de própolis, demonstra eficiente redução sobre o crescimento de microrganismos tornando-os mais sensíveis aos antimicrobianos. Isso mostra o potencial da própolis em aumentar a atividade do antibiótico potencializando o tratamento de infecções microbianas (MIRZOEVA, et al. 1997; STEPANOVIC, et al., 2003; ORSI, et al. 2006).

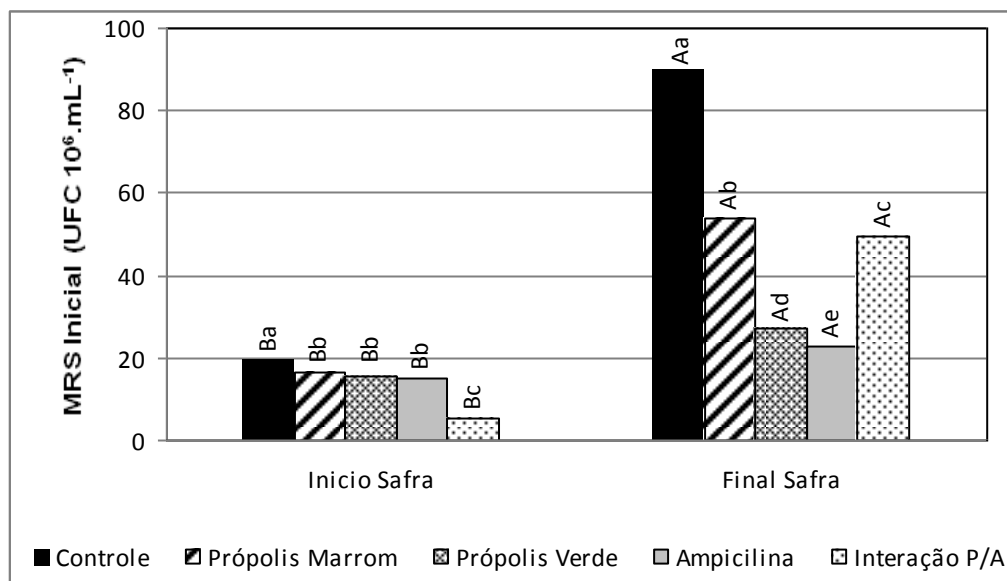


Figura 5: Desdobramento da interação entre tratamentos e épocas para contagem de bactérias lácticas em pé-de-cuba diluído à 10^{-6} antes do tratamento com biocidas. Letras maiúsculas comparam médias entre épocas com mesmo tratamento. Letras minúsculas comparam médias entre os tratamentos de cada época.

Da interação tratamentos e ciclos (Figura 6), ao final dos ciclos fermentativos, os tratamentos com extrato de própolis verde e ampicilina apresentaram menores números de UFC mL^{-1} , contribuindo para a manutenção de células viáveis durante o processo fermentativo, favorecendo a competição das leveduras pelos nutrientes e açúcares, assim como, menor excreção de metabólitos tóxicos pelas bactérias. A própolis dos arbustos do alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*), conhecida também como própolis verde, é altamente eficaz no combate de uma série de microrganismos (BASTOS, 2001; MARCUCCI et al., 2001; PINTO, et al., 2001;

LEITÃO, et al., 2004; INOKUCHI, et al., 2006). Geralmente, a atividade antibacteriana da própolis está associada ao alto conteúdo de flavonóides e compostos fenólicos presentes na resina (GRANGE & DAVEY, 1990; BANKOVA, et al., 1995). No entanto, a própolis verde possui um teor relativamente baixo de flavonóides (PEREIRA, et al., 1999), sendo apontados os compostos fenólicos e os terpenos como os principais constituintes desta (BASTOS, 2001). Provavelmente, essa característica proporcionou maior eficiência biocida deste extrato.

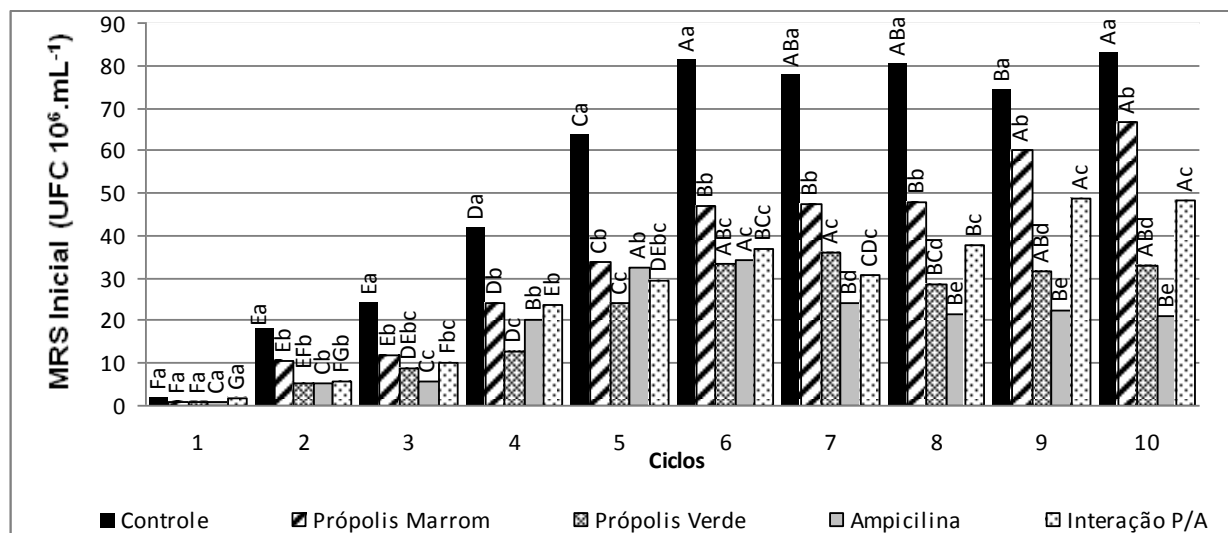


Figura 6: Desdobramento da interação entre tratamentos e ciclos para contagem de bactérias lácticas em pé-de-cuba diluído a 10^6 antes do tratamento com biocidas. Letras maiúsculas comparam médias entre ciclos com mesmo tratamento. Letras minúsculas comparam médias entre os tratamentos de cada ciclo.

BANKOVA et al., (2000), identificaram mais de 300 constituintes em diferentes amostras de própolis. Estes componentes podem variar em função do período, da região geográfica e do tipo de material coletado pelas abelhas, interferindo de maneira substancial na concentração de compostos bioativos, influenciando assim, a atividade antibacteriana (KUJUMGIEV, et al., 1999; FERNANDES Jr., et al., 2006; NASCIMENTO, et al., 2008). As características do ambiente de coleta da própolis também contribuem para explicar o melhor desempenho do extrato de própolis verde no controle de microrganismos contaminantes da fermentação, evidenciando que o local da coleta possui uma forte correlação com a atividade deste extrato.

Do ponto de vista industrial, é extremamente importante a etapa de recuperação do fermento, chamado “pé-de-cuba”, do qual dependerá o novo ciclo de fermentação.

Quando este inóculo apresenta-se inadequado, todo o processo fermentativo da unidade produtora pode ser comprometido (GONÇALVES, 2003).

Para pé-de-cuba diluído a 10^{-7} e plaqueado em meio WLN, próprio para o crescimento de leveduras, a análise de variância do número UFC.mL⁻¹ revelou a existência de diferenças significativas para épocas e ciclos e para a interação entre eles ($p < 0,01$) em pé-de-cuba analisados antes e após tratamento com biocidas (Tabela 6).

Tabela 6: Resultados da análise de variância do número de UFC/mL em placas de WLN de pé-de-cuba diluído a 10^{-7} em amostragens feitas antes e após tratamento do pé-de-cuba com biocidas.

<i>Causas de Variação</i>	<i>UFC mL⁻¹ em WLN (valores de F)</i>	
	Início Safra	Final Safra
Biocidas (A)	1,31 ^{ns}	1,63 ^{ns}
Épocas (B)	11,56 ^{**}	20,64 ^{**}
Ciclos (C)	162,78 ^{**}	101,73 ^{**}
AxB	0,06 ^{ns}	0,09 ^{ns}
AxC	1,02 ^{ns}	0,92 ^{ns}
BxC	8,07 ^{**}	5,19 ^{**}
AxBxC	1,16 ^{ns}	1,01 ^{ns}

ns = não significativo, * = significativo ao nível de 5% e ** = significativo ao nível de 1%

Da interação entre ciclos e épocas (Figura 7) observou-se que a concentração de leveduras em meio WLN foi superior ao início da safra. Tal fato era esperado pois as condições oferecidas pelos vinhos neste período eram mais favoráveis ao desenvolvimento das mesmas. O maior comprometimento da matéria-prima, ocasionou uma maior competição entre células de leveduras e bactérias pelos nutrientes e açúcares do meio. A maior concentração de bactérias lácticas no pé-de-cuba no final da safra, pode ter ocasionado estresse das leveduras, pela presença de seus metabólitos tóxicos, reduzindo o número de células viáveis de leveduras neste período.

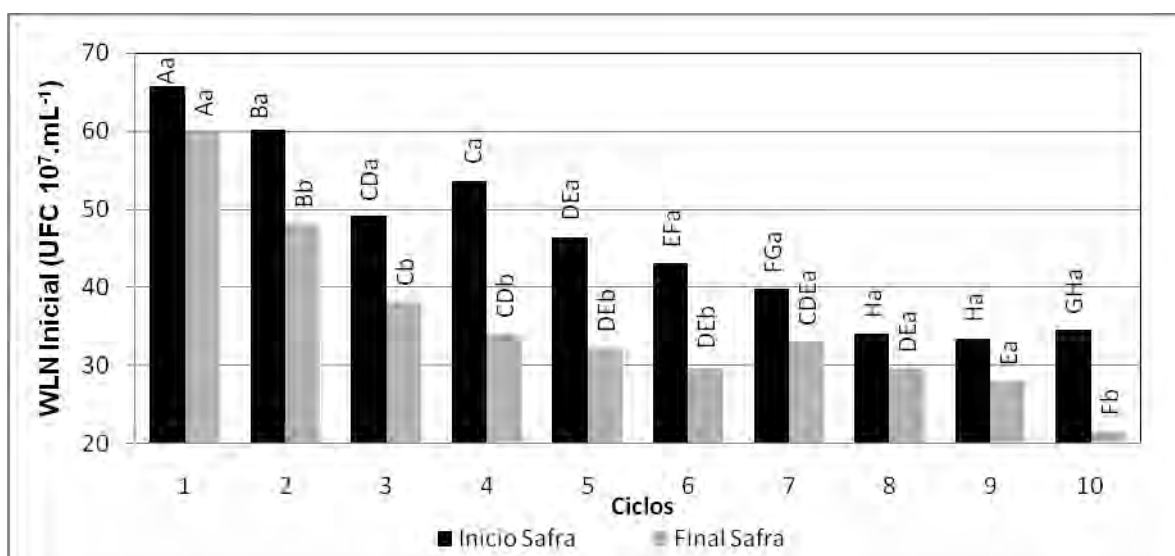


Figura 7: Desdobramento da interação entre tratamentos e ciclos para contagem de leveduras em pé-de-cuba diluído a 10^{-7} antes do tratamento com biocidas. Letras maiúsculas comparam médias entre os ciclos da mesma época. Letras minúsculas comparam médias entre épocas no mesmo ciclo.

Os resultados da análise de variância para o plaqueamento do pé-de-cuba diluído para 10^{-7} em meio PCA (Tabela 7) mostraram haver diferenças significativas para biocidas, épocas e ciclos ($p < 0,01$) e interação entre eles, em plaqueamento realizado tanto antes como após tratamento do pé-de-cuba com biocidas.

Tabela 7: Resultados da análise de variância do número de UFC/mL em placas de PCA de pé-de-cuba diluído a 10^{-7} em amostragens feitas antes e após tratamento do pé-de-cuba com biocidas.

Causas de Variação	UFC mL⁻¹ em PCA (valores de F)	
	Início Safra	Final Safra
Biocidas (A)	7,38**	30,69**
Épocas (B)	34,91**	211,10**
Ciclos (C)	67,32**	160,98**
AxB	3,80*	12,51**
AxC	4,10**	8,86**
BxC	93,92**	258,19**
AxBxC	2,44**	6,96**

ns = não significativo, * = significativo ao nível de 5% e ** = significativo ao nível de 1%

Analisando-se a interação entre tratamentos e épocas após tratamento do pé-de-cuba com biocidas (Figura 8), observa-se maior número de UFC mL⁻¹ no início da safra, sendo que o tratamento testemunha apresentou maior concentração, diferindo significativamente dos demais.

O meio PCA, é rico e completo, e proporciona o desenvolvimento dos microrganismos em temperaturas adequadas, uma vez que a cultura de cana-de-açúcar abriga uma grande diversidade de microrganismos próprios (leveduras, fungos e bactérias).

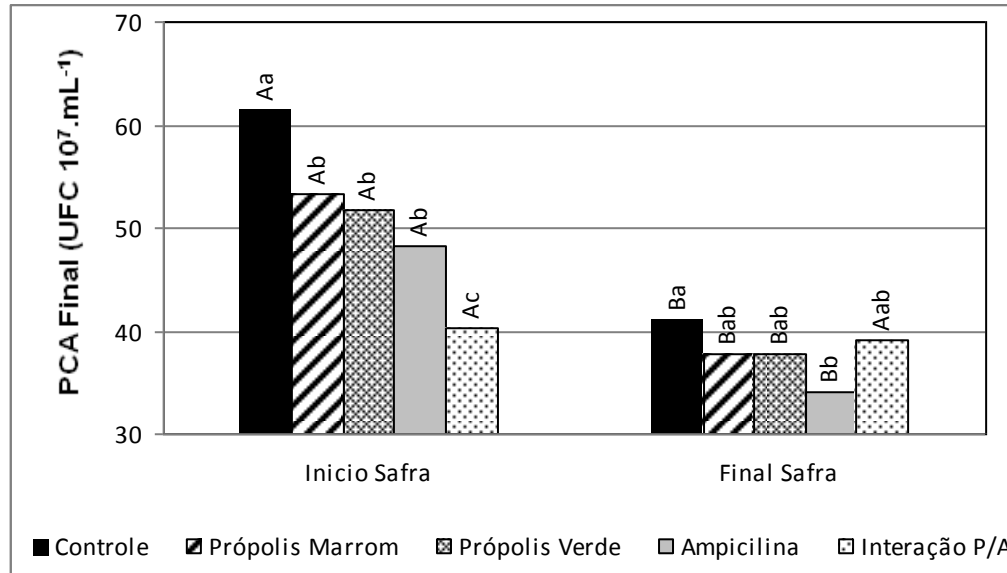


Figura 8: Desdobramento da interação entre tratamentos e épocas para contagem de microrganismos totais em pé-de-cuba diluído à 10^{-7} após tratamento com biocidas. Letras maiúsculas comparam médias entre tratamentos na mesma época. Letras minúsculas comparam médias entre épocas com mesmo tratamento.

Da interação entre tratamentos e ciclos (Figura 9) observou-se que para pé-de-cuba inoculados em meio de cultura PCA, houveram diferenças significativas entre os tratamentos quanto ao número de $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ principalmente no final dos ciclos fermentativos. O maior número de $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ foi observado no tratamento controle, mostrando que neste tratamento a flora microbiana foi bem superior. Quando os biocidas foram empregados, a carga microbiana total foi reduzida. Este fato auxilia na menor competição entre a flora microbiana natural do caldo e as leveduras fermentativas pelos nutrientes e açúcares do meio, uma vez que, não afetou o desempenho da microbiota fermentativa do processo. Pode-se considerar, que a redução na população de microrganismos totais pelos extratos de própolis e ampicilina, proporcionam um ambiente fermentativo mais favorável a levedura, garantindo a menor excreção de metabólitos oriundos das atividades fisiológicas da população microbiana do meio, proporcionando maiores concentrações de substrato disponíveis ao desenvolvimento das leveduras fermentativas.

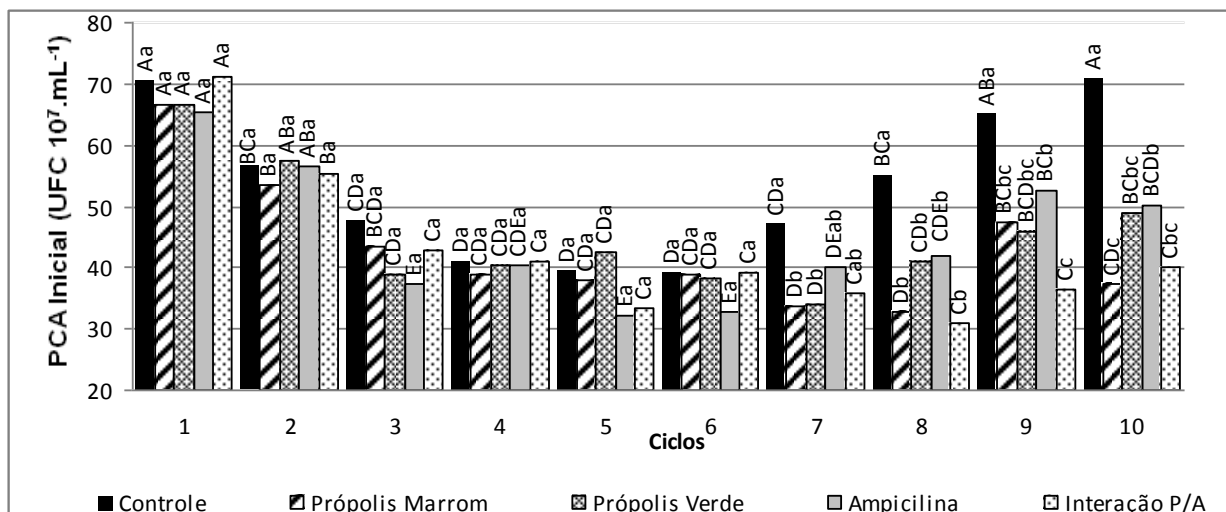


Figura 9: Desdobramento da interação entre tratamentos e ciclos para contagem de microrganismos totais em pé-de-cuba diluído a 10^{-7} antes do tratamento com biocidas. Letras maiúsculas comparam médias entre tratamentos no mesmo ciclo. Letras minúsculas comparam médias entre ciclos com mesmo tratamento.

4.3 Acidez Total

De acordo como o quadro de análise de variância, pode-se observar que houveram diferenças significativas nos teores de acidez total dos vinhos para biocidas, épocas e ciclos ($p < 0,01$) (Tabela 8).

Tabela 8: Resultados da análise de variância para acidez total ($\text{gH}_2\text{SO}_4/\text{mL}^{-1}$) dos vinhos de mosto de caldo-de-cana.

Causas de Variação	Acidez Total (valores de F)
Biocidas (A)	68,39**
Épocas (B)	1115,33**
Ciclos (C)	120,11**
AxB	12,53**
AxC	5,18**
BxC	52,87**
AxBxC	2,84**

ns = não significativo, * = significativo ao nível de 5% e ** = significativo ao nível de 1%

Quanto à acidez dos vinhos (Figura 10), analisando-se a interação entre tratamentos e ciclos, pode-se observar que os maiores valores foram obtidos para o tratamento controle seguidos da própolis marrom. Os vinhos tratados com extrato de própolis verde, ampicilina e interação P/A, apresentaram menores valores de acidez,

inferiores a 3g.L^{-1} , fato correlacionado a menor atividade bacteriana no meio, proporcionada pelo controle eficiente destes biocidas.

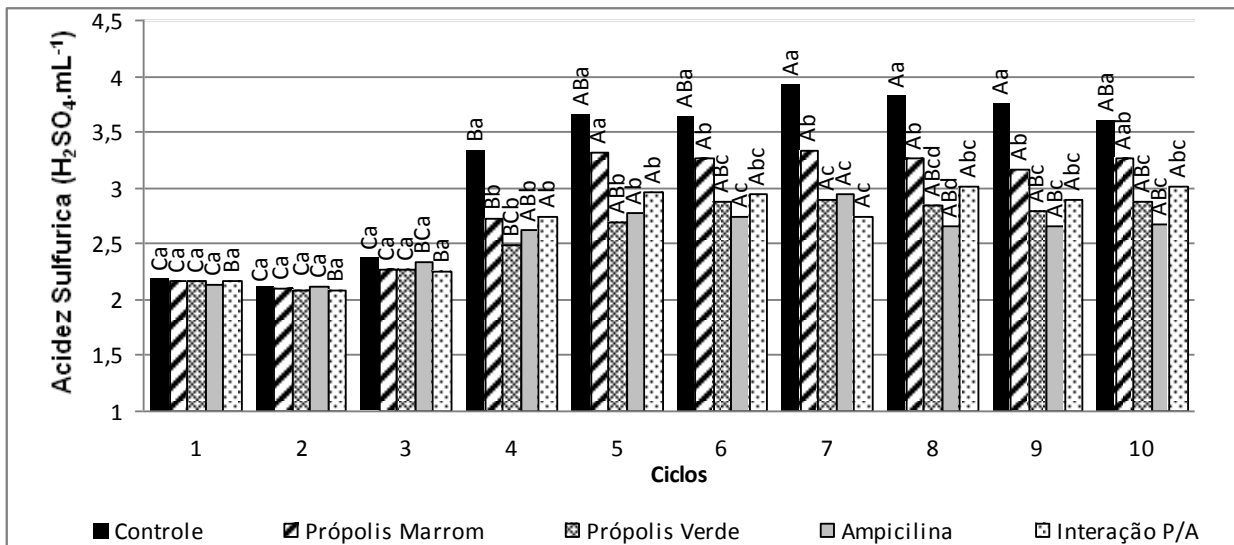


Figura 10: Desdobramento da interação entre tratamentos e ciclos para acidez total dos vinhos. Letras maiúsculas comparam médias entre tratamentos no mesmo ciclo. Letras minúsculas comparam médias entre ciclos com mesmo tratamento.

Da interação tratamento e épocas (Figura 11), observou-se que os maiores valores ocorreram no tratamento controle em ambas as épocas; contudo no início da safra produziram-se vinhos com menor acidez em todos os tratamentos.

As bactérias contaminantes do processo fermentativo provocam um aumento na acidez do meio, devido a maior produção dos ácidos fixos voláteis (AMORIM & OLIVEIRA, 1982). Pode-se constatar que o ligeiro aumento da acidez evidenciado no tratamento controle, principalmente no final da safra, foi decorrente da ação do maior número de contaminantes neste período, assim como o aumento progressivo ao longo dos ciclos fermentativos.

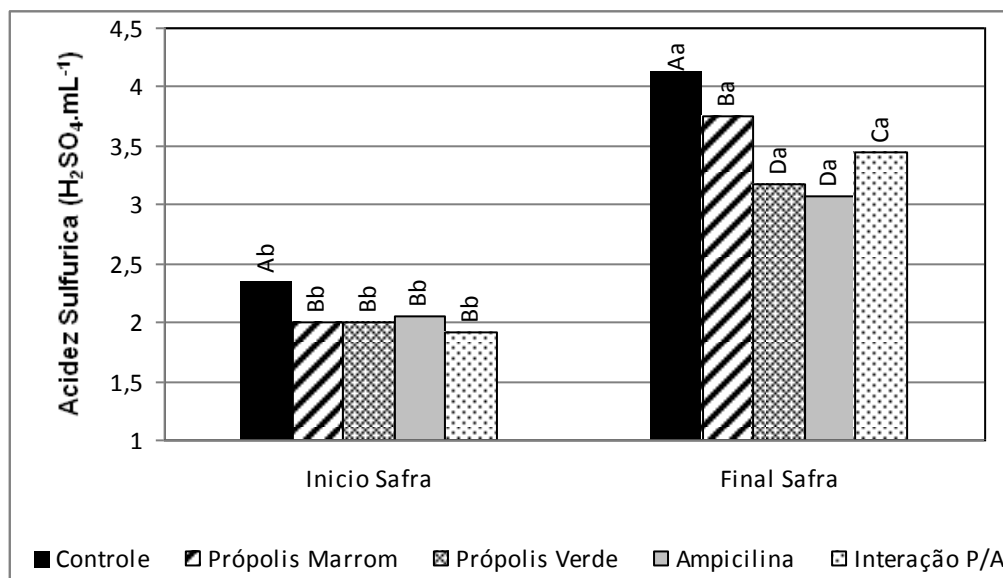


Figura 11: Desdobramento da interação entre tratamentos e época para acidez total dos vinhos. Letras maiúsculas comparam médias entre tratamentos na mesma época. Letras minúsculas comparam médias entre épocas com mesmo tratamento.

4.4 Glicerol

De acordo com o quadro da análise de variância, pode-se observar que houve diferenças significativas na produção de glicerol para épocas e ciclos e para a interação entre eles ($p < 0,01$) (Tabela 9).

Tabela 9: Resultados da análise de variância dos valores de glicerol ($\text{mg} \cdot 100\text{mL}^{-1}$) dos vinhos de mosto de caldo-de-cana.

Causas de Variação	Glicerol (valores de F)
Biocidas (A)	2,29 ^{ns}
Épocas (B)	9,76*
Ciclos (C)	6,47*
AxB	0,75 ^{ns}
AxC	1,04 ^{ns}
BxC	4,69**
AxBxC	1,19 ^{ns}

ns = não significativo, * = significativo ao nível de 5% e ** = significativo ao nível de 1%

Os maiores teores de glicerol foram obtidos no final da safra nos ciclos 1, 2, 3 e 10 (Figura 11). A variação entre safra era esperada, pois, a presença de bactérias contaminantes e seus metabólitos podem intensificar a produção de glicerol. Este estudo demonstra que o aumento da concentração de bactérias no final da safra

proporcionou uma elevação nos teores de glicerol em alguns ciclos fermentativos, estando relacionados com a qualidade inferior da matéria-prima neste período.

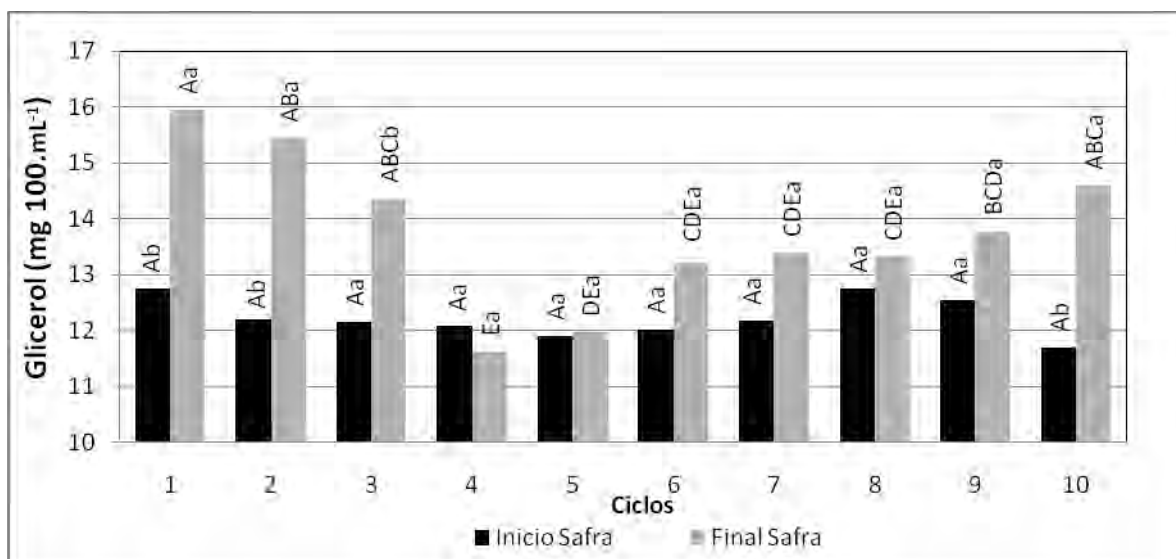


Figura 12: Desdobramento da interação entre tratamentos e época para produção de glicerol ($\text{mg} \cdot 100\text{mL}^{-1}$) nos vinhos. Letras maiúsculas comparam médias entre tratamentos na mesma época. Letras minúsculas comparam médias entre épocas com mesmo tratamento.

O glicerol forma-se na mesma via de síntese do etanol, como um desvio, competindo com este pela utilização do poder redutor (NADH), motivo pelo qual a síntese deste composto é inversamente proporcional à do etanol (BASSO, et al., 1996). Cronwright, et al. (2002) enfatizou que as células de leveduras produzem glicerol para manter o redox citosólico para conduzir o catabolismo glicolítico, especialmente em condições de anaerobiose e repressão da glicose. Neste estudo, não se verificou relação entre os teores de ARRT e glicerol, entretanto, o teor alcoólico apresentou redução ao longo dos ciclos no final da safra.

4.5 Teor Alcoólico

A análise de variância dos valores médios para o teor alcoólico dos vinhos indica diferenças significativas para biocidas, épocas e ciclos ($p < 0,01$) (Tabela 10). Comparando-se os tratamentos estudados, observou-se que os menores teores de álcool ocorreram para o tratamento controle (Figura 12).

Tabela 10: Resultados da análise de variância dos valores álcool (v.v⁻¹) dos vinhos de mosto de caldo-de-cana.

Causas de Variação	Teor Alcoólico (valores de F)
Biocidas (A)	11,56**
Épocas (B)	441,08**
Ciclos (C)	8,09**
AxB	2,45 ^{ns}
AxC	1,14 ^{ns}
BxC	4,40**
AxBxC	1,16 ^{ns}

ns = não significativo, * = significativo ao nível de 5% e ** = significativo ao nível de 1%

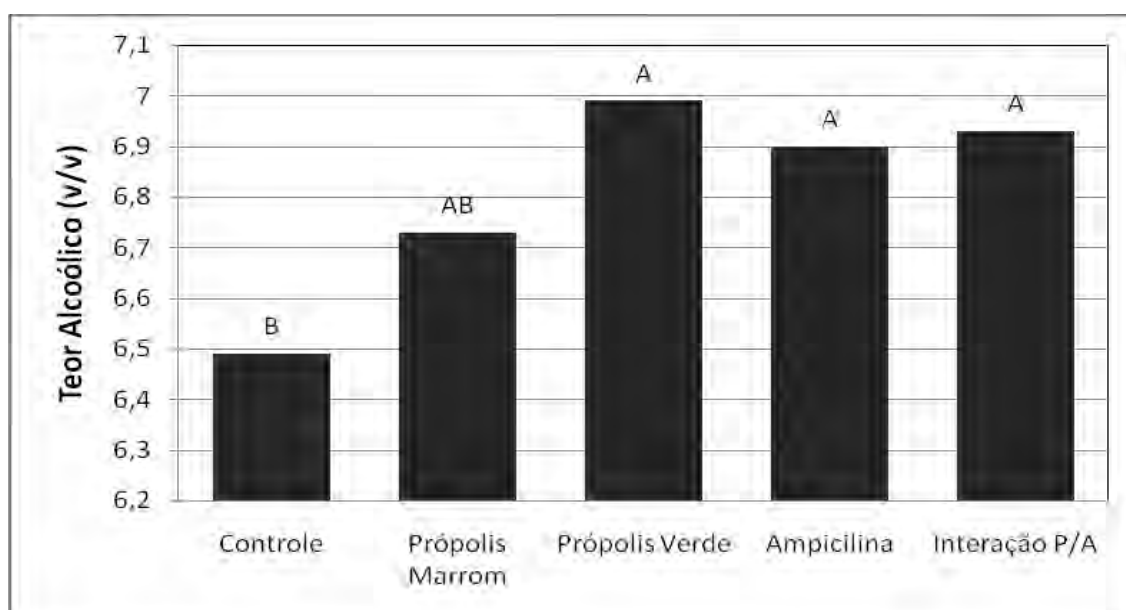


Figura 13: Valores médios do teor alcoólico (v/v) dos vinhos para os tratamentos com biocidas, safra 2009/2010.

Como consequência do número elevado de contaminantes e aumento da acidez total, houve redução significativa no teor alcoólico dos vinhos (Figura 12) para o tratamento controle, indicando que as bactérias contaminantes influenciam negativamente o desempenho da microbiota fermentativa, quando presentes em maiores concentrações. A redução no teor alcoólico do vinho para o tratamento controle foi de 7% em relação ao tratamento onde se empregou o extrato de própolis verde, evidenciando os impactos negativos das bactérias contaminantes sobre o desempenho do processo fermentativo. De acordo com Narendranath, et al. (1997), a presença de linhagens de *Lactobacillus* durante a fermentação de um preparado de trigo ocasionou redução na taxa de crescimento da levedura e diminuição na concentração final de etanol e no número de células viáveis. Uma contaminação

bacteriana de 10^6 UFC/mL levou a uma perda de 2% na produção de etanol, enquanto em níveis maiores (10^9 UFC/mL), ocorreu redução de 7% do rendimento em álcool.

Para a interação tratamentos e épocas para o teor alcoólico dos vinhos (Figura 13), podemos observar que no final da safra ocorreu menor produção de álcool nos vinhos. Este fato correlaciona-se com as condições do meio menos favorável neste período, principalmente devido o aumento na carga de bactérias contaminantes, que possivelmente proporcionaram um maior estresse as leveduras, refletindo em maior produção de glicerol, ocasionando redução no teor alcoólico dos vinhos no final da safra.

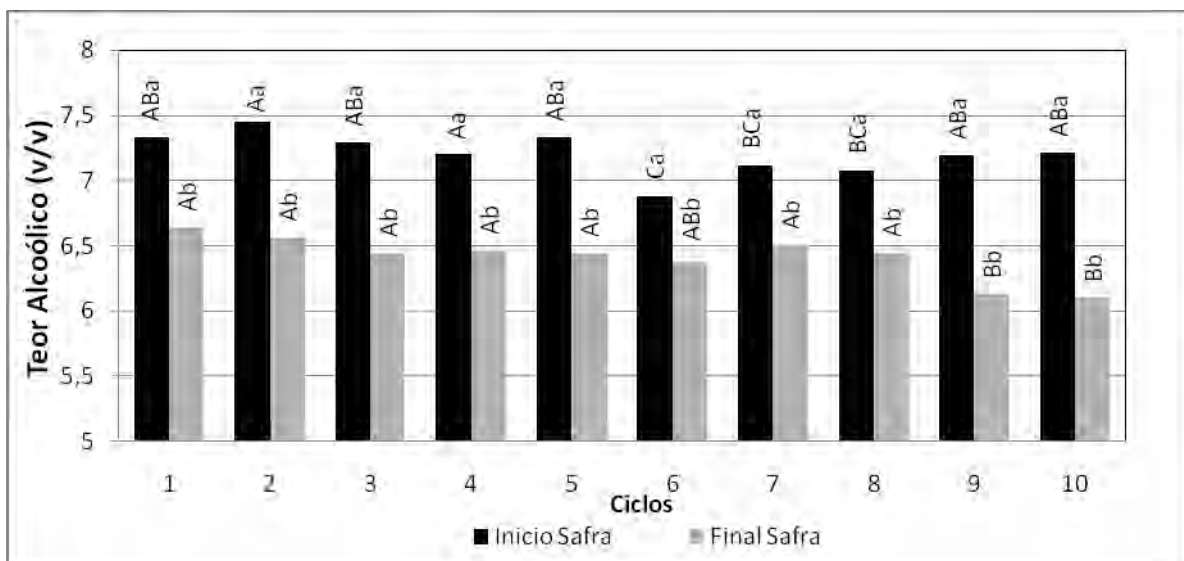


Figura 14: Desdobramento da interação entre tratamentos e época para produção de glicerol nos vinhos. Letras maiúsculas comparam médias entre tratamentos na mesma época. Letras minúsculas comparam médias entre épocas com mesmo tratamento.

Não foi observada diferença significativa para os valores de açúcares redutores residuais totais nos vinhos, indicando que os extratos de própolis e sua interação com ampicilina, não limitaram o desdobramento dos açúcares durante os ciclos fermentativos.

4.6 Componentes Secundários

Os teores de aldeídos totais expressos em acetaldeído (Tabela 11) estão em conformidade com a legislação vigente (BRASIL, 2005), para compostos secundários da cachaça. De modo geral, os aldeídos com até 8 átomos de carbono têm aroma, penetrante e geralmente enjoativos, sendo considerados indesejáveis sua presença na bebida. O acetaldeído é o principal aldeído associado à fermentação alcoólica, e a sua concentração pode ser minimizada evitando-se a aeração no final da fermentação (MAIA, 1994).

Observando-se os dados, podemos constatar que a aplicação dos antimicrobianos não influenciou a produção de acetaldeído nas cachaças. No entanto, para o tratamento onde se empregou extrato de própolis verde foram produzidos maiores teores de acetaldeído ao longo dos ciclos fermentativos, sendo mais relevante no 10º ciclo. Esse fato pode ser atribuído ao maior teor alcoólico do vinho neste tratamento, intensificando a produção deste composto.

Tabela 11: Resultados obtidos para os teores de acetaldeídos nos destilados produzidos no início e final da safra 2009/2010 - Uberaba-MG.

Acetaldeído (mg/100 mL)					
Início da Safra					
CICLOS	TESTEMUNHA	PROPOLIS MARROM	PROPOLIS VERDE	AMPICILINA	INTERAÇÃO
1	2.51	2.95	3.88	1.81	2.64
4	1.62	3.29	6.45	2.69	3.96
7	1.39	3.71	2.14	1.78	2.55
10	0.73	5.38	10.86	2.49	7.14
Final da Safra					
CICLOS	TESTEMUNHA	PROPOLIS MARROM	PROPOLIS VERDE	AMPICILINA	INTERAÇÃO
1	10.57	4.34	7.12	10.02	11.66
4	3.84	2.33	6.7	0.84	3.74
7	4.54	3.33	4.96	2.82	2.33
10	3.69	2.14	2.68	3.48	1.29

Durante a fermentação alcoólica, uma pequena parte do etanol reage intracelularmente com o ácido acético, formando acetato de etila. Da mesma forma, outros alcoóis produzidos intracelularmente reagem, em parte, com o ácido acético, formando outros ésteres (ROSE, 1970; RIGOTT, 1989) citado por Maia,1994. Analisando os resultados (Tabela 12), pode-se observar que no final da safra os teores de acetato de etila na cachaça foram superiores ao início da safra. Este fato pode estar correlacionado a maior acidez dos vinhos neste período, favorecendo a reação entre alcoóis e ácidos, conseqüentemente aumentando a formação deste composto. Porém, os valores ainda se encontram dentro dos especificados pela legislação.

Tabela 12: Resultados obtidos para os teores de acetato de etila nos destilados produzidos no início e final da safra 2009/2010 - Uberaba-MG.

Acetato de Etila (mg/100 mL)					
Início da Safra					
CICLOS	TESTEMUNHA	PROPOLIS MARROM	PROPOLIS VERDE	AMPICILINA	INTERAÇÃO
1	9.04	7.51	9.93	4.34	7.52
4	14.61	8.65	13.04	6.44	7.59
7	10.29	8.01	3.99	3.03	4.93
10	3.06	20.88	21.43	13.15	17.24
Final da Safra					
CICLOS	TESTEMUNHA	PRÓPOLIS MARROM	PRÓPOLIS VERDE	AMPICILINA	INTERAÇÃO
1	16.06	6.15	4.92	8.28	11.39
4	71.78	9.73	18.29	5.87	9.17
7	53.35	12.51	39.44	30.15	23.43
10	121.42	48.28	97.59	47.96	127.08

Verifica-se que a produção de alcoóis superiores (Tabela 13) foi semelhante para ambos os tratamentos no início e final da safra, e se encontram dentro dos padrões exigidos pela legislação. Os álcoois superiores com até cinco átomos de carbono, apresentam odores característicos, tradicionalmente associados com a bebida, enquanto que acima de cinco átomos, estes alcoóis possuem características oleosas. Portanto, se torna necessário realizar corretamente a separação das frações evitando a sua presença no destilado, sendo que este composto se encontram consideravelmente em maior proporção na fração cauda.

Tabela 13: Resultados obtidos para os teores de alcoóis superiores nos destilados produzidos no início e final da safra 2009/2010 - Uberaba-MG.

Alcoóis Superiores (mg/100 mL)					
Início da Safra					
CICLOS	TESTEMUNHA	PRÓPOLIS MARROM	PRÓPOLIS VERDE	AMPICILINA	INTERAÇÃO
1	141.34	133.07	147.47	123.09	135.04
4	65.33	119.12	170.86	118.55	133.99
7	115.84	104.61	99.29	79.36	94.15
10	60.96	136.92	184.47	105.14	119.61
Final da Safra					
CICLOS	TESTEMUNHA	PRÓPOLIS MARROM	PRÓPOLIS VERDE	AMPICILINA	INTERAÇÃO
1	241.92	157.34	142.57	190.11	245.86
4	126.46	140.51	159.98	108.57	110
7	121.11	130.79	130.18	147.49	121.91
10	87.15	102.62	115.75	115.32	133.68

Composto como o metanol não foi observado nas amostras analisadas, podendo estar relacionado com o preparo do mosto, oportunidade em que se procedeu a coagem do caldo para retirada do bagacilho, sendo este, um dos responsáveis pela sua formação, devido a presença de pectina, que pode sofrer hidrólise ácida, produzindo metanol durante a fermentação

Desta forma, pode-se destacar a importância da utilização de antimicrobianos naturais no tratamento do fermento, possibilitando ciclos fermentativos mais saudáveis, contribuindo para a produção de uma bebida que atenda os padrões exigidos pela legislação, assim como, maior rendimento industrial.

V CONCLUSÕES

- O extrato de própolis e sua combinação com antimicrobianos sintéticos mostraram-se eficazes no controle das contaminações bacterianas do processo fermentativo para produção de cachaça.
- A alta atividade antimicrobiana dos biocidas naturais testados permite reduzir o uso de antimicrobianos convencionais.
- A utilização de antimicrobianos naturais não influenciaram negativamente a composição do destilado.
- Os extratos de própolis marrom e verde e a interação própolis/ampicilina, mostraram-se eficientes na produção de vinhos com maiores teores alcoólicos, resultando em maiores rendimentos em álcool.

VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRABE: Disponível em: <http://www.abrabe.org.br/cachaca.php>. Acesso em: 16 de agosto 2010.

ACKERMANN, T. Fast chromatography study of propolis crudes. **Food Chemistry**, Oxon, v.42, n.2, p.135-138, 1991.

AMORIM, H. F. Fermentação alcoólica: princípios e problemas. Piracicaba, 1977, 59p. Apostila.

AMORIM, H. V. **Métodos analíticos para o controle da produção de álcool e açúcar**. 2. ed. Piracicaba: FERMENTEC, 1996. 194 p.

AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. Infecção na fermentação: como evitá-la. **STAB - Álcool & Açúcar**, Piracicaba, v. 5, p. 12-18, 1982.

AMOROS, M.; SIMOES, C.M.O.; GIRRE, L.; SAUVAGER, F.; CORMIER, M. Synergistic effect of flavones and flavonols against Herpes simplex vírus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. **Journal of Natural Products**, v.55, p.1732-1740, 1992.

ANTONINI, S.R.C., “Métodos de Análises e Monitoramento Microbiológico em Laboratório de Destilaria”, apostila do curso de treinamento na usina de açúcar Santa Terezinha Ltda, Iguatemi – PR, 2004, 156p.

APEX-BRASIL: Disponível em: <http://www.apexbrasil.com.br>. Acesso em: 10 dez. 2007.

BANKOVA, V.; CRHISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C.; POPOV, S. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Brazilian propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences**, Tuhingen, v. 50, n.3-4, p. 167-172,1995.

BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3-15, 2000.

BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. *Experimentação agrícola*. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 237 p.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I.K.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A.A.G.; KADOTA, S. Cytotoxic hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal Ethnopharmacol.** v.72, p.239-246, 2000.

BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. Leveduras selecionadas: permanência no processo industrial monitorada pela técnica da cariotipagem. Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica, 16. p. 1 –51, 1996.

BASTOS, E.M.A.F. Origem botânica e indicadores de qualidade da “própolis verde” produzida no Estado de Minas Gerais, Brasil. Ribeirão Preto, 2001. 137p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo.

BAYER, A.S.; CHOW, A.W.; CONCEPTION, N.; GUZE, L.B. Susceptibility of 40 lactobacilli to six antimicrobial agents with broad Gram positive anaerobic spectra. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.14, p.720-722, 1978.

BORELLI, F.; MAFFIA, P.; PINTO, L.; LANARO, A.; RUSSO, A.; CAPASSO, F.; LATANTI, A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**, v.4, n.4, p. 150-157, 2002.

BOZA, Y.; OETTERER, M. Envelhecimento de Aguardente de Cana. SBCTA - extenso, Campinas, v.33, n. 1, p. 8-15, 1999.

BRASIL. Instrução Normativa nº3, de 29 de junho de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça. Publicado no Diário Oficial da União de 30/06/2005, Seção 1, Página 3. disponível em www.agricultura.gov.br.

BREGAGNOLI, F.C.R. Comportamento fisiológico de microrganismos submetidos à biocidas convencional e natural na produção de cachaça orgânica. Jaboticabal, 2006. 69p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

BURDOCK, C.A. Review of the biological properties and toxicity of bee própolis (própolis). **Food and Chemical Toxicology**, v.36, n.4, p.347-363, 1998.

CASTRO, M.L.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v.30, n.7, p.1512-1516, 2007.

CHANG, I.S.; KIM, B.H.; SHIN, P.K. Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol fermentation. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, n.1, p.1-6, 1997.

CHANG, I.S.; KIM, B.H.; SHIN, P.K.; LEE, W.K. Bacterial contamination and its effects on ethanol fermentation. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.5, n.6, p.309-314, 1995.

CHERUBIN, R. A. Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica. 124f. Piracicaba, 2003. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

COSTA, V.M. Perfil de metabólitos excretados por *Lactobacillus* isolados de processos industriais de produção de etanol, com ênfase nos isômeros óticos D(-) e L(+) do ácido láctico. Piracicaba, 2006, 65p. Dissertação (Mestre em Ciências), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

CRISAN, I.; ZAHARIA, C.N.; POPOVICI, F.; JUCU, V.; BELU, O.; DASCALU, C.; MUTIU, A.; PETRESCU, A. Natural propolis extract NIVCRISOL in the treatment of acute and chronic rhinopharyngitis in children. **Romanian Journal of Virology**. v.46, p.115-133, 1995.

CRONWRIGHT, G. R.; ROHWER, J. M.B.A. Metabolic control analysis of glycerol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 9, p. 4448-4456, 2002.

DATO, M.C.F.; PIZAURO JÚNIOR, J.M.; MUTTON, M.J.R. Analysis of the secondary compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* and wild yeast strains during the production of “cachaça”. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p. 70-74, 2005.

FERNANDES JR.; A. LOPES, M.M.R.; COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A.C.M.; VIEIRA, E.P. Atividade antimicrobiana de própolis *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.1, p.294-297, 2006.

GALLO, C.R. Identificação de bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **STAB- Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 10, n. 5, p. 30-34, 1992.

GALLO, C.R.; CANHOS, V.P. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica – revisão. **STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.9, p. 35-40, 1991.

GONÇALVES, T.D. Danos causados por *Mahanarva fimbriolata* em cana-de-açúcar: reflexos na qualidade da matéria-prima e fermentação etanólica. Jaboticabal, 2003. 51p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

GRANGE, J.M.; DAVEY, R.W. Antibacterial properties of própolis. **Journal of the Royal Society of Medicine**, London, v.83, p.159-160, 1990.

INOKUCHI, Y., SHIMAZAWA, M., NAKAJIMA, Y., SUEMORI, S., MISHIMA, S., HARA, H. Brazilian Green própolis protects against retinal damage in vitro and in vivo. **CAM Advance Access published**, v.3, p.71-77, 2006.

KARTAL, M.; YILDIZ, S.; KAYA, S.; KURUCU, S.; TOPÇU, G. Antimicrobial activity of própolis samples from two different regions of Anatolia. **Journal of Ethnopharmacology**, v.86, p.69-73, 2003.

KELSALL, D. R.; LYONS, T. P. Practical management of yeast: conversion of sugar to ethanol. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed). The alcohol textbook. 4th ed. Nottingham: N. University Press. 2003. p. 121-133.

KOO, H. Estudo dos flavonóides da própolis de *Apis mellifera* africanizada provenientes de diversas regiões do Brasil. Campinas, 1996. 67f. Tese (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of própolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, p.235-240, 1999.

LANE, J.H.; EYNON, I. **Determination of reducing sugars by Fehling solution with methylene blue indicator**. London: Norman Roger, 8p. 1934.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. Biotechnology And Bioengineering Symposium, New York, v. 11, p. 641-, 1981.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M.M. Principios de Bioquímica. 2^o ed. São Paulo: Sarvier, 2000.

LEITÃO, D.P.S.; SILVA FILHO, A.A.; POLIZELLO, A.C.M.; BASTOS, J.K.; SPADARO, A.C.C. Comparative evaluation of in vitro effects of brazilian Green propolis and *baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v.27, p.1834-1839, 2004.

LIMA NETO, B.S.; FRANCO, D.W. A aguardente e o controle químico de sua qualidade. *Engarrafador Moderno*, São Caetano do Sul, v.4, n.33, p.5-8, 1994.

LUDWING, K.M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D.F. Quantificação da flocculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.1, p.63-68, 2001.

MACGOWAN, M. W.; ARISS, J. D.; STRANBERGH, D. R.; ZAK, B. A. Peroxidase – coupled method for colorimetric determination of serum glicerides. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 29, p. 538-542, 1993.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. São Paulo: Prentice Hall. 10 ed. 2004. 608 p.

MAIA, A.B. Componentes secundários da aguardente. *STAB – Açúcar, Álcool e Subprodutos*, v.12, n.6, p.29-34, 1994.

MARCUCCI, M.C.; BANKOVA, V.S. Chemical composition, plant origin and biological activity of brazilian propolis. **Currents Topics Phytochemistry**, v.2, p.15-23, 1999.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V.S.; De CASTRO, S.L.; DANTAS, A.P.; VALENTE, P.H.M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v.74. n.2, p.105-112, 2001.

MARQUES, T.A.; SERRA, G.E. Estudo da reciclagem de células na produção biológica de etanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.4, p.532-535, 2004.

MIRZOEVA, O.K.; GRISHANIN, R.N.; CALDER, P.C. Antimicrobial action of própolis and some of its components: the effects on growth, membrane potencial and motility of bacteria. **Microbiology Research**, v.152, n.3, p. 239-246, 1997.

MONICK, J.A. Alcohol- their chemistry, properties and manufacture. New York Reinhold Book, 1986, 576 p.

MUTTON, M. J. R. Avaliação da fermentação etanólica do caldo de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) tratadas com maturadores químicos. Jaboticabal, 1998. 178 p. Tese (Livre Docência). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

NARENDRANATH, N.V.; HYNES, S.H.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.11, p.4158-4163, 1997.

NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K.C.; INLGLEDEW, W.M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomuces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 26, p. 171-177. 2001.

NASCIMENTO, E.A.; CHANG, R.; MORAIS, S.A.L.; PILÓ-VELOSO, D.; REIS, D.C. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). *Revista Brasileira de Farmacologia*, v.18, p.379-386, 2008.

NOBRE, T.P. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. Piracicaba, 2005. 111p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

NOGUEIRA, A.M.P.; VENTURINI-FILHO, W.G. Aguardente de Cana. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 66p. 2005.

NOVAES, F.V. Matérias-primas para a produção de álcool. In: SEMINÁRIO SOBRE TECNOLOGIA E ECONOMIA DO ÁLCOOL, p.3-7, 1980. Piracicaba-SP.

NOVAES, F.V. Controle da destilaria de aguardente de cana. Piracicaba: ESALQ, 1988. 45p.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Evaluation of bacterial contamination in a fed-batch alcoholic fermentation process. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v.10, p.697-699, 1994.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Effects of nutritional factor son growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, p. 25-31, 1997.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria from de alcohol industry to several antimicrobial compounds. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 10-14, 2001.

OLIVEIRA, A.C.P.; SHINOBU, C.S.; LONGHINI, R.; FRANCO, S.L.; SVIDZINSKI, T.I.E. Antifungal activity of propolis extract against yeast isolated from onychomycosis lesions. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v.101, n.5, p.493-497, 2006.

ORSI, R.O.; SFORCIN, J.M.; FUNARI, S.R.C.; FERNANDES Jr, A.; BANKOVA, V. Synergistic effect of própolis and antibiotics on the *Salmonella typhi*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.108-112, 2006.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. In: 2nd International Eletronic Conference on Synthesis Organic Chemistry. 1998.

PEREIRA, A.S.; RAMOS, M.F.S.; POÇAS, E.S.C.; DIAS, P.C.M.; SANTOS, E.P.; SILVA, J.F.M.; CARDOSO, J.N.; NETO, F.R.A. Study of própolis by high temperature high resolution gas chromatography – Mass Spectrometry. **Zeitschrift Naturforsch**, v.54, p.395-400, 1999.

PINTO, M.S.; FARIA, J.E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S.T.A.; PEREIRA, C.S.; GIOSO, M.M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.38, p.278-283, 2001.

RANG, H. P.; RITTER, J M.; DALE, M. M. Farmacologia. 3ªed. Ed. Rio de Janeiro. p. 543-581. 1995.

REZENDE, G.P.S.R.; PIMENTA, F.C.; COSTA, L.R.R.S. Antimicrobial activity of two brazilian commercial própolis extracts. **Brazilian Journal Oral Science**, v.5, p.967-970, 2006

RODAS, F.G. Inovação na produção de cachaça de qualidade: estudo de caso Armazém Vieira. Florianópolis, 2005. 79p. Monografia (Graduação em Ciências Econômicas). Universidade Federal de Santa Catarina.

RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of própolis: role of caffeic acid phenethyl Ester and galangin. **Fitoterapia**, v.73, p.S21-S29, 2002.

SALOMÃO, K.; PEREIRA, P.R.S.; CAMPOS, L.C.; BORBA, C.M.; CABELLO, P.H.; MARCUCCI, M.C.; CASTRO, S.L. Brazilian Propolis: Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. **CAM Advance Access published**, v.5, n.3, p.317-324, 2008.

SCHNEIDER, F. (Ed.) **Sugar Analysis ICUMSA methods**. Peterborough:ICUMSA 1979. 265 p.

SEBRAE/MG. Simulação da produção de 60 mil litros de cachaça/safra. Belo Horizonte, 2005, 70p.

SILICI, S.; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region, **Journal of Ethnopharmacology**, v.99, p.69-73, 2005.

SILVA, M.L.; MALCATA, F.X.; REVEL de, G. Volatile contents of grape marcs in Portugal. **Journal of food composition and analysis**, v.9, p.72-80, 1996.

SILVA, R.A.; RODRIGUES, A.E; RIBEIRO, M.C.M.; CUSTÓDIO, A.R.; ANDRADE, N.E.D.; PEREIRA, W.E. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.36, n.6, p.1842-1848, 2006.

SKINNER, K.A.; LEATHERS, T.D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v.31, p.401-408, 2004.

STEPANOVIC, S.; ANTIC, N.; DAKIC, I.; SVABIC-VLAHOVIC, M. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propoli and antimicrobial drugs. **Microbiological Research**, v.158, p.353-357, 2003.

STUPIELLO, J.P.; HORII, L. Condução da fermentação alcoólica, **STAB – Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.17, p.43-46, 1981.

SWERTS, M.S.O.; FREITAS, E.; SILVA, D.S.; MALDONADO, D.V.; TOTTI DA CAOSTA, J.M.; MEDEIROS, U.V. Atividade antimicrobiana da própolis sobre bactérias bucais. **Jornal Brasileiro de Endodontia/Periodontal**, v.3, p.256-261, 2002.

TAKAISI-KIKUNI, N.B.; SCHILCHER, H. Electron microscopy and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. **Planta Medica**, v.60, p.222-227, 1994.

TÉO, D. Características físico-químicas de aguardentes envelhecidas em diferentes madeiras. Jaboticabal, 2003. 73p. Monografia (Graduação em Agronomia), Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi continuous alcoholic fermentation of corn mash. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p.819-828, 2001.

VENTURA, R. Quantificação do ácido láctico na fermentação etanólica como parâmetro de monitoramento do processo. Rio Claro. 2007. 102 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociência.

YOKOYA, F. Fabricação de aguardente de cana. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1995, 87p. (Série Fermentações Industriais).