

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PRÓPOLIS NA PRODUÇÃO DE CACHAÇA ORGÂNICA DE
QUALIDADE**

Nayara Abrão Montijo

Tecnóloga em Produção Sucroalcooleira

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PRÓPOLIS NA PRODUÇÃO DE CACHAÇA ORGÂNICA DE
QUALIDADE**

Nayara Abrão Montijo

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton

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

2014

M792p Montijo, Nayara Abrão
Própolis na produção de cachaça orgânica de qualidade / Nayara
Abrão Montijo. – – Jaboticabal, 2014
vii, 65 p. 1 il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014

Orientadora: Márcia Justino Rossini Mutton

Banca examinadora: Maria das Graças Cardoso, Francisco

Vicente Gaiotto Cleto

Bibliografia

1. Componentes secundários da cachaça. 2. Própolis marrom. 3.
Própolis verde. Levedura CA-11. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 663.241

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

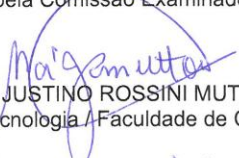
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

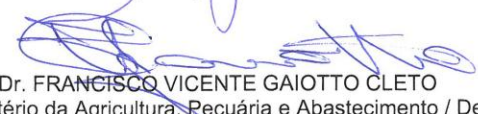
TÍTULO: PRÓPOLIS NA PRODUÇÃO DE CACHAÇA ORGÂNICA DE QUALIDADE

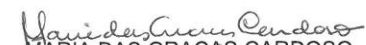
AUTORA: NAYARA ABRÃO MONTIJO

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. MARCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON
Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. FRANCISCO VICENTE GAIOTTO CLETO
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento / Delegacia de Ribeirão Preto/SP


Profa. Dra. MARIA DAS GRAÇAS CARDOSO
Universidade Federal de Lavras / Lavras/MG

Data da realização: 03 de julho de 2014.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

NAYARA ABRÃO MONTIJO – Nasceu aos 6 de maio de 1990, na cidade de Campo Belo, estado de Minas Gerais. Em janeiro de 2009 ingressou no curso Superior de Tecnologia em Produção Sucroalcooleira na Universidade do Estado de Minas Gerais – UEMG, Campus de Frutal, recebendo o título de Tecnóloga em Produção Sucroalcooleira em 2011. Durante o curso de Graduação foi bolsista do programa PAEX/UEMG. Em março de 2012 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária da FCAV-UNESP Jaboticabal, SP, obtendo o título de Mestre em junho de 2014.

Epígrafe

Que nosso conhecimento não nos impeça de sermos humildes, reconhecendo, em cada momento, que jamais estaremos sozinhos.

Fernanda Tavares

Aos meus pais, João e Francis, e irmãos
Alessandro e Fernanda, pelo amor, e apoio
incondicional.

Dedico.

A Profa. Dra. Márcia Justino Rossini
Mutton, exemplo de profissional, meus
sinceros agradecimentos. Alicerce dessa
conquista.

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

“Ao Deus da minha vida, que me compreendeu sem nenhuma explicação”;

Aos meus pais e irmãos pelo carinho, incentivo, credibilidade e compreensão nas horas mais difíceis;

À Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton e ao Prof. Dr. Miguel Angelo Mutton, pela acolhida, orientação, ensinamentos, paciência, oportunidade e confiança;

Ao Programa de Microbiologia Agropecuária- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV/UNESP) pela oportunidade de realização do curso e aprimoramento profissional;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo;

Ao Sr. Eduardo Garcia pelo fornecimento da cana orgânica; primordial para realização desse trabalho;

À Osania Emerenciano Ferreira, pela orientação, conselhos e amizade;

À Aline Ferreira e Gustavo Gravatim pela importante parceria, comprometimento e dedicação exclusiva com este trabalho;

A todos do Laboratório de Tecnologia do Açúcar e do Alcool, pelos bons momentos de aprendizado, de alegria e pela colaboração: Cristhyane, Igor, Jorge, Juliana Roviero, Juliana Stracieri, Lidyane, Marcel, Marcelo, Nayara Silvano, Rita, Sílvia, Sérgio Luís Nobukuni, Vitor;

Aos membros da banca examinadora, Francisco Gaiotto Cleto e Maria das Graças Cardoso, pela participação e considerações;

Ao Prof. Dr. Ricardo Orsi e Me. Edilson Souza - Núcleo de Ensino, Ciência e Tecnologia em Apicultura Racional (NECTAR), FMVZ / UNESP- Botucatu, pela caracterização dos extratos de própolis;

COPACESP- Cooperativa dos Produtores de Cana, Aguardente, Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo pela colaboração nas análises físico-químicas e cromatográficas das cachaças;

A todos que de uma maneira ou de outra, contribuíram para a concretização desse estudo.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA FIGURAS	v
LISTA TABELAS	vi
LISTA SIGLAS	vii
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1. Histórico	10
2.2. Legislação e mercado	10
2.3. Produtos orgânicos	12
2.4. Matéria-prima	13
2.5. Tratamento do caldo e preparo do mosto	14
2.6. Fermentação alcoólica	15
2.7. Controle de contaminantes	19
2.8. Antimicrobianos naturais	19
2.9. Destilação	21
2.10. Componentes secundários e Qualidade da Cachaça	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Delineamento experimental.....	24
3.2. Matéria-prima	24
3.3. Preparo dos antimicrobianos.....	25
3.3.1. Monensina sódica	25
3.3.2. Própolis	25
3.4. Preparo dos mostos	26
3.5. Levedura	27
3.5.4. Destilação do vinho.....	29
3.5.5. Destilação para obtenção da cachaça	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. Caracterização físico-química dos Extratos Etanólicos de Própolis	31
4.2. Matéria-prima e mosto	31

4.3. Processo fermentativo.....	33
4.4 Características dos vinhos	38
4.4.1 pH e acidez total	38
4.5 Glicerol e Teor alcoólico.....	40
4.6 Avaliações microbiológicas.....	42
4.7 Componentes secundários da cachaça	48
5. CONCLUSÕES	51
6. REFERÊNCIAS	52
APÊNDICE	62

PRÓPOLIS NA PRODUÇÃO DE CACHAÇA ORGÂNICA DE QUALIDADE

RESUMO - Legislações mundiais estão sendo criadas a fim de reduzir a presença de resíduos de antimicrobianos em alimentos e bebidas. Com destaque para as bebidas alcoólicas destiladas, em que micro-organismos inerentes ao processo fermentativo infectam e resultam em decréscimo da qualidade do produto. Objetivou-se avaliar o efeito dos extratos de própolis, antimicrobiano sintético à base de monensina e o prévio tratamento físico-químico do caldo de cana, para o controle de contaminantes no processo fermentativo, destinado à produção de cachaça. Avaliaram-se os efeitos sobre a atividade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CA-11, sobre os compostos secundários e sobre a qualidade do destilado final. Adotou-se o delineamento em parcelas subdivididas com três repetições, empregando-se 5 tratamentos principais (biocidas) e 5 tratamentos secundários (ciclos de fermentação). Os tratamentos principais foram constituídos de Controle (caldo sem tratamento); antimicrobiano sintético (Monensina sódica); extrato etanólico de própolis verde (EEPV), extrato etanólico de própolis marrom (EPPM), tratamento físico-químico do caldo (TFQ). O tratamento secundário foi constituído por cinco ciclos fermentativos. Avaliou-se a viabilidade das células e brotos, assim como o índice de brotamento ao longo da fermentação. Para o vinho, determinou-se pH, acidez total, glicerol e teor alcoólico. A composição do destilado (acroleína, acidez volátil, acetaldeído, carbamato de etila, ésteres, metanol, alcoóis superiores, propílico, isobutílico, isoamílico) foi determinada por cromatografia. Os teores de etanol produzidos pela levedura CA-11 foram entre 6 a 7%, sendo não significativos para todos os tratamentos avaliados. Todos os tratamentos contribuíram para melhorar os parâmetros físico-químicos e a qualidade dos vinhos obtidos. Avaliações microbiológicas indicaram que a matéria-prima empregada, apresentava-se com excelente qualidade demonstrando baixo número de contaminantes no caldo extraído e mosto. As concentrações dos componentes secundários das cachaças apresentaram-se expressivamente abaixo dos limites permitidos pela legislação brasileira. Os resultados obtidos comprovam a eficácia dos antimicrobianos à base de própolis, em processos fermentativos para cachaça, e possivelmente dentre outras bebidas destiladas por *S. cerevisiae* em substituição aos convencionais.

Palavras-chave: componentes secundários da cachaça, própolis marrom, própolis verde, levedura CA-11.

PRÓPOLIS IN QUALITY ORGANIC CACHAÇA

ABSTRACT- Regulations are being created worldwide to reduce the amount of antimicrobial residues in food and beverages, especially distilled alcoholic beverages, because contaminant microorganisms from fermentation process may infect and depreciate the product quality. This study aimed to evaluate the effect of propolis extracts, monensin-based synthetic antimicrobial and previous physical-chemical treatment of the broth to control contaminants in the fermentation process for the production of cachaça. We studied the effects on the activity of the *Saccharomyces cerevisiae* CA-11 and the composition of secondary metabolites and quality of the final distillate. The experiment was arranged in a completely randomized design in split plots with three replications, using main treatments (five antimicrobials) and secondary treatments (fermentation cycles). The main treatments were: control (untreated juice); sodium monensin; green propolis ethanolic extract (GPEE); brown propolis ethanolic extract (BPEE); physical-chemical juice treatment (PCT). Secondary treatments corresponded to five fermentation cycles. The amount of yeast cell and bud viability, and yeast bud rate during the fermentation were evaluated. The wines were analyzed for pH, total acidity, glycerol and alcohol content. Microbiological evaluations indicated that the sugarcane source used, presented with excellent quality, showing low number of contaminants in juice and wine. The compounds of cachaça quantified by gas chromatography were (acetaldehyde, acrolein, esters, ethyl carbamate, higher alcohols, isobutyl, isoamyl, methanol, propyl, volatile acidity). Ethanol levels produced by the yeast strain 'CA-11' in the fermentation were found to be around 6 to 7%, which are not statistically significant among treatments. The concentrations of the secondary compounds were met significantly below the limits of the Brazilian legislation. Results indicate great potential for the use of propolis as antimicrobial in *S. cerevisiae* fermentation process for cachaça and other distilled beverages. More studies are fundamental to investigate its effects on technological and microbiological parameters.

Index terms: brown propolis, green propolis, secondary compounds, strain CA-11.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aspecto da característica floculante da levedura CA-11	27
Figura 2: Desdobramento da interação entre tratamentos e ciclos para viabilidade de brotos da levedura CA-11 na fase inicial e final do processo fermentativo. Jaboticabal-SP, Safra 2013/2014.....	34
Figura 3: Desdobramento da interação entre tratamentos e ciclos para brotamento de células da levedura CA-11 na fase inicial e final processo fermentativo. Jaboticabal-SP, Safra 2013/2014.....	36
Figura 4: Desdobramento da interação entre tratamentos e ciclos para pH e acidez total dos vinhos. Jaboticabal-SP, Safra 2013/2014	39
Figura 5: Desdobramento da interação entre biocidas e ciclos para contagem de bactérias lácticas em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) no A- Pé-de-Cuba (PDC); B-Início; C-Final da fermentação. Letras maiúsculas comparam médias entre ciclos com mesmo tratamento.....	45
Figura 6: Desdobramento da interação entre biocidas e ciclos para contagem de leveduras em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) no A- Pé-de-Cuba (PDC); B-Início; C-Final da fermentação. Letras maiúsculas comparam médias entre ciclos com mesmo tratamento.....	46
Figura 7: Desdobramento da interação entre biocidas e ciclos para contagem de micro-organismos totais em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) no A- Pé-de-Cuba (PDC); B-Início; C-Final da fermentação. Letras maiúsculas comparam médias entre ciclos com mesmo tratamento.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Limites dos componentes secundários e contaminantes orgânicos na cachaça, em mg 100 mL ⁻¹ de álcool anidro.	22
Tabela 2: Caracterização físico-química dos extratos etanólicos de própolis realizado no Núcleo de Ciência e Tecnologia em Apicultura Racional (NECTAR), FMVZ / UNESP- Botucatu.....	31
Tabela 3: Resultados médios obtidos para Acidez Total de mosto original (1) e clarificado (2), utilizados nos ciclos fermentativos.....	32
Tabela 4: Valores médios obtidos para viabilidade de brotos no início e final dos ciclos fermentativos. Jaboticabal-SP. Safra 2013/2014.	37
Tabela 5: Valores médios e resultados da análise de variância para características químico-tecnológicas do vinho quanto à produção de glicerol.	41
Tabela 6: Valores médios obtidos para contagem de bactérias lácticas (MRS ⁺), micro-organismos totais (PCA) e leveduras (WLN+) em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) nos caldo referentes aos ciclos fermentativos 1, 3 e 5.	42
Tabela 7: Valores médios obtidos para contagem de bactérias lácticas (MRS ⁺), micro-organismos totais (PCA) e leveduras (WLN) em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) no mosto referente aos ciclos fermentativos 1, 3 e 5.	43
Tabela 8: Concentração de componentes secundários em amostras de cachaça produzidas com diferentes tratamentos.	50

LISTA DE SIGLAS

ABRABE	Associação Brasileira de Bebidas
AMPAQ	Associação Mineira dos Produtores de Cachaça de Qualidade
ART	Açúcares Redutores Totais
AR	Açúcares Redutores
CG	Cromatografia gasosa
CTC	Centro de Tecnologia Canavieira
EEPV	Extrato Etanólico de Própolis Verde
EEPM	Extrato Etanólico de Própolis Marrom
FSS	Food Surveillance System
IBRAC	Instituto Brasileiro da Cachaça
IPD	Instituto de Promoção do Desenvolvimento
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MRS	Man Rogosa e Sharpe
PCA	Plate Count Agar
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
TFQ	Tratamento Físico Químico do caldo
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
WLN	Wallerstein Laboratories Nutrient

1. INTRODUÇÃO

Com a crescente exigência do mercado consumidor por produtos de melhor qualidade, intensificou-se a busca por aprimoramento em relação ao avanço do conhecimento técnico-científico. Assim como em relação à produção de cachaça, uma vez que todas as etapas da cadeia produtiva de bebidas fermento-destilladas são importantes. Visando assim, garantir o cumprimento dos requisitos mínimos de qualidade e segurança alimentar tanto no âmbito nacional quanto internacional.

A produção de aguardente de cana, popularmente e mundialmente reconhecida como cachaça, encontra-se em franca expansão no Brasil. Atualmente é a segunda bebida alcoólica mais consumida no país, e que vem apresentando grandes perspectivas de expansão no mercado externo, sendo o terceiro destilado mais consumido do mundo (ABRABE, 2014).

Um dos interferentes na qualidade da bebida é a microbiota contaminante que naturalmente se instala ao longo do processo produtivo. Afeta diretamente a bioquímica fermentativa, originando fermentações indesejáveis, contribuindo para menores rendimentos em etanol, além de interferir na formação de metabólitos que influenciam diretamente nas características sensoriais e na formação de compostos químicos que qualificam a bebida.

No controle das contaminações, são comumente utilizados antissépticos e antimicrobianos sintéticos que atuam de forma diferente, agindo sobre um ou mais grupos de micro-organismos. O uso contínuo pode levar ao desenvolvimento de linhagens resistentes, as quais se tornam cada vez menos sensíveis à sua ação, além do alto custo (RODRIGUES; DANTAS; FINZER, 2009). Deve-se considerar ainda a exigência cada vez maior, a nível nacional e internacional, limitando o uso de insumos sintéticos, muitas vezes em desacordo com as orientações estabelecidas pelos órgãos regulamentadores de alimentos e bebidas. Fato semelhante é observado quando se considera as exigências em relação à redução de resíduo nos destilados obtidos, assim como para a levedura ao final do processo fermentativo (FSS, 2011).

Neste contexto, o uso da própolis no processo de fermentação alcoólica, apresenta-se como alternativa economicamente viável, sendo opção no controle microbiológico, objetivando a obtenção de produtos e subprodutos livres de resíduos químicos.

A presente pesquisa objetivou avaliar a utilização de extratos de própolis verde e marrom, comparado ao tratamento físico-químico do caldo e emprego de antimicrobiano sintético, para o controle de contaminantes no processo fermentativo, destinado à produção de cachaça. Estudou-se ainda os efeitos sobre a atividade da levedura CA-11, e composição dos componentes e qualidade do destilado final.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico

A cachaça foi a primeira bebida destilada produzida na América Latina. Descoberta no século XVI, em decorrência da implantação da indústria açucareira pelos colonizadores portugueses (SILVA; AZEVEDO, 2009). Nos engenhos descobriram o vinho da cana conhecido como “garapa azeda”, que era o líquido resultante dos tachos de rapadura e servia de alimento para os animais. Os escravos passaram a tomar esta bebida inicialmente fermentada e posterior destilação do líquido, chamado de cagaça e, finalmente *cachaça* (SANTOS, 2013). Entre inúmeras origens da palavra “cachaça”, tem-se a atividade frequente na época de amaciar a carne de cachaço (nome dado aos porcos) com o destilado de cana.

Com a abolição da escravatura, o surgimento da economia cafeeira e a proclamação da República inicia-se uma fase de declínio para o prestígio dessa bebida, com hábitos fortemente associados aos valores vindos da Europa, atribuindo à cachaça a imagem de produto de baixa qualidade, destinada ao consumo das classes menos privilegiadas (SEBRAE, 2014). Entretanto, hoje, é destaque no Brasil e no mundo, em resposta a normas e padrões de qualidade e identidade inexistentes até então, contribuições indispensáveis ao fortalecimento da bebida.

Na produção de cachaça a qualidade deve estar presente desde cuidados com o solo e o plantio da variedade apropriada de cana-de-açúcar, passando por todas as etapas de fabricação até a comercialização do produto final (VILELA, 2005).

2.2. Legislação e mercado

De acordo com Decreto nº 4851/03, cachaça, é a *denominação típica e exclusiva da Aguardente de Cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 % vol (trinta e oito por cento em volume) a 48% vol (quarenta e oito por cento em*

volume) a 20°C (vinte graus Celsius), obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g L⁻¹ (seis gramas por litro), expressos em sacarose (BRASIL, 2005). É constituída principalmente de etanol e água, além de outros componentes ou cöngeneres (ácidos orgânicos, ésteres, aldeídos e alcoóis superiores) oriundos principalmente de reações metabólicas envolvidas na bioquímica fermentativa. Estes, mesmo minoritários, porém extremamente diversificados, são os principais responsáveis pelo sabor e aroma da bebida (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2008).

Segundo o Instituto Brasileiro da Cachaça (IBRAC), o país produz em média 700 milhões de litros de cachaça por ano, com capacidade instalada de produção estimada em 1,2 bilhão de litros, contudo exporta-se menos de 1% do total produzido (SEBRAE 2014). Em setembro de 2013, foram apuradas mais de 4 mil marcas registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, com cerca de 40 mil produtores em todo o país, sendo 99% caracterizados como micro e pequenos empreendedores.

Atualmente é segunda bebida mais consumida no mercado brasileiro (volume que corresponde a 50% do volume do segmento de destilados), e o terceiro maior destilado do mundo. O faturamento do setor alcançou R\$ 5,95 bilhões em 2013, incluindo a produção da bebida (511,54 milhões de litros), fornecimento de insumos e comercialização do produto (ABRABE, 2014).

É encontrada em todo o território nacional, e produzida principalmente nos estados de São Paulo, Pernambuco, Ceará, Rio de Janeiro, Goiás e Minas Gerais, sendo o último, o principal centro produtor da cachaça de alambique. Estado de Minas Gerais produz 240 milhões de litros de cachaça por ano, dos quais 11 milhões são exportados por 180 empresas, com 1.010 marcas registradas legalmente e em torno de 5.000 alambiques (AMPAQ, 2014).

Entre as tendências e oportunidades, destacam-se os grandes eventos desportivos, Copa do Mundo FIFA 2014 e Olimpíadas de 2016, com a atração para o Brasil de um grande fluxo de recursos e expectativa de expressiva presença de turistas ávidos a conhecer características específicas do país (SEBRAE, 2014). Para tanto, fica claro a necessidade de investimento em pesquisas e projetos, bem como

meios efetivos de controle sobre todo o processo produtivo, de forma a atender a demanda cada vez maior do mercado interno e externo (ALVARENGA, 2011).

No cenário atual o agronegócio da bebida caracteriza-se por uma busca incessante de pesquisas e projetos seguindo a tendência dos consumidores em busca de produtos saudáveis e seguros, objetivando, portanto, a padronização e melhorias de qualidade nos diferentes aspectos físico-químicos e sensoriais da bebida, considerando questões relacionadas aos efeitos diretos e indiretos sobre a saúde do consumidor como também incremento financeiro ao produtor (MUTTON; MUTTON, 2010).

2.3. Produtos orgânicos

A procura, cada vez maior dos consumidores, por produtos de base orgânica e sustentável, em toda a cadeia produtiva, tem incentivado a produção mundial fazendo do mercado orgânico uma excelente oportunidade de negócio. Estima-se que em 2013, o mercado global dessa categoria de produtos, tenha faturado US\$ 60 bilhões, com a adoção de importantes medidas para o setor como convênios de equivalência de certificações entre os mercados europeu e americano, e a partir de 2014, entre o Japão e Estados Unidos (IPD, 2014).

Os alimentos orgânicos ou “naturais” conferem ao produtor maior retorno financeiro principalmente quando se trabalha visando o mercado externo, conhecidamente exigente em qualidade. A cachaça quando produzida no sistema de produção orgânico, isenta de qualquer tipo de agroquímico em toda operação agrícola, industrial e comercial, destaca-se pelo alto padrão de qualidade inerente ao processo. Com este processo, ocorre uma nova oportunidade de agregar valor como um todo, processo industrial de modo geral define aceitação, além de potencializar vendas no mercado externo.

O processo de produção da cachaça envolve várias etapas, podendo ser resumido no preparo da matéria prima (corte, despalha e transporte da cana-de-açúcar), moagem, tratamento do caldo, preparo do mosto e fermentação, destilação, envelhecimento, envase e rotulagem. Em cada uma delas há pontos críticos que

podem ser decisivos, uma vez que defeitos de natureza química, física, microbiológica podem comprometer a saúde do consumidor e ocasionar a perda da qualidade e da integridade econômica do produto (BORTOLETTO, 2013).

2.4. Matéria-prima

A eficiência do processo industrial junto a obtenção de um produto de qualidade e economicamente viável, depende do estado matéria-prima entregue na unidade industrial. Sendo esta influente nas características físico-químicas e microbiológicas que mais tarde acarretarão alterações no desempenho das operações de extração, fermentação e destilação. Todas as etapas são importantes para obtenção de altos rendimentos e da qualidade do produto final como um todo (STUPIELLO, 1992).

Segundo Mutton (1998), *“qualidade pode ser definida como resultado final da conjugação de diferentes fatores inter-relacionados, que conferem determinadas características à matéria-prima, modo a promover ganhos no rendimento agroindustrial, possibilitando a obtenção de produtos de qualidade, sem aumento significativo de custos, resultando em melhor eficiência e lucratividade”*.

Na produção de cachaça, a matéria-prima que interessa são os colmos de cana-de-açúcar, com composição tecnológica constituída por fase insolúvel e solúvel. Estes são representados por um complexo composto de celulose, lignina e pentosanas, chamada de fibra (8-18%), e caldo propriamente dito (82-92%), composto por 75-82% de água e 18-25% de sólidos solúveis (Brix) respectivamente. Os sólidos solúveis são formados por açúcares (15,5-24%), sacarose, glicose e frutose; e por não açúcares (1-2,5%) como aminoácidos, ácidos, ceras, gorduras, corantes e sais inorgânicos (SiO_2 , K_2O , CaO , MgO , entre outros) (SEGATO et al., 2006).

A produção de cachaça sem o devido controle das características das matérias primas, assim como das fases do processo produtivo, resulta num produto com qualidade instável e com eventuais contaminações (SEBRAE, 2014). Logo a cana-de-açúcar utilizada precisa atender a uma série de parâmetros tecnológicos e

microbiológicos como: variedade, riqueza em açúcares, % de fibra, teor de matéria estranha (palmito, palha, folha, terra), fatores de estresse como seca, geada, irrigação, doenças, pragas, danos físicos, e estado de deterioração (MUTTON; MUTTON, 2010).

Para se evitar contaminações e deteriorações, recomenda-se que a cana deve ser processada em um prazo máximo de 24 a 36 horas após a colheita (CARDOSO, 2013).

Assim o manejo da cultura deve ser realizado da melhor forma possível objetivando reduzir impactos que possam a vir interferir negativamente na qualidade da matéria-prima, e demais etapas do processo, a fim de gerar lucros tanto para o setor agrícola quanto para o industrial (COSTA, 2013). Uma vez que as técnicas empregadas na fabricação da cachaça não oferecem recursos para minimizar os efeitos causados por uma matéria-prima de baixa qualidade e produtividade (MUTTON, 1998).

2.5. Tratamento do caldo e preparo do mosto

A indústria utiliza processos físico-químicos de tratamento do caldo objetivando a máxima remoção de impurezas e materiais contaminantes (terra, compostos fenólicos, ácidos, aminoácidos, proteínas, corantes), de fundamental importância para a qualidade do mosto a ser fermentado. Etapa imprescindível, que pode atuar como precursora da formação de interferentes na qualidade do produto final. É a filtragem de bagacilhos, ricos em substâncias pécticas possuindo unidades metoxilas, que quando liberadas pelas enzimas das leveduras fermentativas, dão origem ao metanol, produto indesejável (CLETO, 1997).

O tratamento inicia-se com a peneiragem do caldo em peneiras de malha fina, para retenção de elementos em suspensão (bagacilhos). Seguido do processo de clarificação que se dá a partir de reações químicas entre fosfatos dissolvidos na matéria-prima e cálcio/enxofre adicionados, que vão promover a coagulação de proteínas e arraste de impurezas para o fundo do decantador, de modo a remover materiais insolúveis e demais substâncias dissolvidas indesejáveis (DOHERTY;

RACKEMANN, 2009). Objetivando acelerar a velocidade de sedimentação dos flocos, é adicionado ao caldo, polieletrólitos de origem sintética, de elevado custo e além de entrar em desacordo com o modelo de produção orgânica. Neste contexto, a utilização de produtos originados de fontes naturais como extratos de folha de moringa (*Moringa oleífera* Lam) como potencial alternativa aos processos convencionais (COSTA, 2013).

No contexto de tecnologia, utiliza-se o termo mosto para definir todo líquido suscetível a ser fermentado, cujo preparo consiste em uma série de medidas a serem tomadas para que o ambiente fermentativo seja favorável exclusivamente às exigências da levedura e contrária ao desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis (SANTOS, 2010). Dentre elas citam-se: o fornecimento de quantidade ideal de açúcares fermentescíveis; menor contaminação inicial possível; pH ideal, e nutrientes (Valsechi, 1960). Os teores de açúcar devem estar entre 14 e 16° Brix, pois concentrações acima podem acarretar em fermentações mais lentas e frequentemente incompletas (Cardoso, 2013). Temperatura e acidez são outros fatores que afetam a atividade microbiana e, conseqüentemente, a eficiência e produtividade do processo de fermentação satisfatório (Bregagnoli, 2006).

2.6. Fermentação alcoólica

2.6.1. Propagação do fermento

Para que se tenha garantia de uma fermentação sadia, regular e de alto rendimento, torna-se necessário introduzir no mosto, uma população vigorosa de leveduras, capaz de conduzir o processo fermentativo de forma o mais eficientemente possível (Mutton e Mutton, 1992; Cardoso, 2013).

O desempenho do processo fermentativo é significativamente afetado pela linhagem da levedura (Basso, 1996). Estas podem ser caracterizadas de acordo com a maneira como são multiplicadas ou preparadas para o início do processo fermentativo. Os principais tipos de fermento utilizados para se preparar um pé-de-

cuba são o natural ou “caipira”, o prensado (leveduras de panificação) e as leveduras selecionadas (VILELA, 2005).

O tipo de fermento adotado pela fábrica de cachaça depende da estratégia e técnica de cada unidade, fundamentalmente importante, uma vez que são as leveduras as principais responsáveis pela definição do perfil dos compostos voláteis desejáveis, que caracterizam a bebida (SERAFIM et al., 2011).

A indústria de cachaça comumente, principalmente as pequenas com produção artesanal, adotam-se de praticas de fermentações espontâneas, utilizando fermento natural. A ocorrência de diferentes espécies e linhagens de leveduras pode interferir negativamente na qualidade do produto final, ao proporcionar fermentações totalmente aleatórias, dificultando o controle operacional.

Nas fermentações inoculadas, uma cultura *starter* é adicionada, sendo esta dominante em relação às outras espécies naturalmente presentes no mosto. A utilização de linhagens selecionadas acelera o processo de preparação do fermento, sendo introduzida nas dornas em altas populações, diminui-se a interferência de leveduras selvagens que muitas vezes, não são adequadas ao processo (GOMES et al., 2010).

A seleção e utilização de leveduras selecionadas de *S.cerevisiae* como iniciadoras do processo fermentativo para produção de cachaça, tem se mostrado como proposta bastante promissora e essencialmente importante para a obtenção de um produto com um padrão de qualidade reprodutível (CANUTO, 2013).

As leveduras selecionadas apresentam características desejáveis ao processo e ao produto, o que têm aumentado a produtividade e contribuído para melhoria da qualidade da bebida em muitas unidades produtoras (MONTEIRO, 2010). A habilidade de flocular e de produzir ou não certos componentes do aroma das bebidas e a propriedade de produzir metabólitos anti-contaminantes (toxinas "killer") são constantes fontes de interesse (RIBEIRO; HORI, 1999).

Segundo Soares, Silva e Schwan (2011), linhagens selecionadas de *S.cerevisiae* quando introduzidas nas dornas, tem se destacado, são competitivas, e aceleram a multiplicação celular e o início do processo fermentativo assim como bem adaptadas ao ambiente industrial. Ao diminuir a interferência de leveduras selvagens que muitas vezes, não são adequadas ao processo. Desse modo vem a

solucionar o problema da heterogeneidade, e garantir que a qualidade do produto final apresente características organolépticas superiores e constantes ao longo das safras (CAMPOS et al., 2010; GOMES et al., 2010).

Atualmente, a levedura selecionada *S. cerevisiae* CA-11 de característica floculante, é disponibilizada no Brasil em sua forma desidratada ativa, podendo ser utilizada prontamente para fermentação. Dados obtidos em alambiques que fazem uso dessa levedura, têm demonstrado um aumento significativo no rendimento, e melhorias nos teores de compostos aromáticos desejáveis (CARDOSO, 2013).

As leveduras com capacidade floculante (cresce de maneira agrupada, formando flocos ou aglomerados de tamanho variável), é uma estratégia de redução de custos operacionais. Apresentam como principal vantagem sobre as tradicionalmente empegadas, dispensar o uso de centrifugas para separação das leveduras (VASCONCELOS, 2007). Bem como a maioria dos produtores de cachaça encontra grande dificuldade para a realização correta deste processo, principalmente onde as cepas não apresentam propriedades floculantes (CARDOSO, 2013).

2.6.2. Processo fermentativo

Dentre as diversas etapas, a fermentação alcoólica é considerada o ponto crítico do processo industrial de fabricação de cachaça. Uma vez que as atividades direta e indireta, tanto da levedura alcoólica (fermento) como de outros micro-organismos (bactérias) atuantes nessa fase; são responsáveis pela formação dos principais compostos químicos e formadores do aroma da bebida (MUTTON e MUTTON, 1992).

A fermentação alcoólica é processo de oxidação anaeróbica parcial da glicose, pela ação das leveduras principalmente, em etanol, CO₂ e componentes secundários por meio de reações químicas mediadas por enzimas (LEHNINGER, 2000). Em nível citoplasmático, com o objetivo de produzir energia, destinada à realização de suas atividades fisiológicas, crescimento e reprodução, sendo, o

etanol, tão somente, um subproduto desse processo (URBANO, 2012). Os processos biotecnológicos dos quais as leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* participam são os mais difundidos mundialmente, sendo responsáveis por grande parte da produção industrial de alimentos, bebidas alcoólicas e de bioetanol do mundo (PEREIRA, 2007).

Para que a levedura desenvolva suas atividades metabólicas de maneira adequada, diversos aspectos e condições devem ser levados em consideração como: temperatura, acidez, qualidade da cana, higiene, preparo de pé-de-cuba e do mosto que quando impróprios, acarretarão em sérios prejuízos (OLIVEIRA-FREGUGLIA e HORI, 1998).

Durante o processo fermentativo, normalmente se desenvolvem fermentações secundárias, oriundas das atividades de outros micro-organismos (bactérias e fungos), que, frequentemente aparecem no processo acompanhando a matéria-prima vinda do campo (ANTONANGELO et al., 2013). São responsáveis por apresentar ação indesejável sobre a bioquímica fermentativa, levando a alterações na composição dos mostos e dos vinhos produzidos. Influenciando diretamente na multiplicação e no crescimento celular de leveduras, ocasionando reduções no rendimento alcoólico, retorno econômico da unidade produtiva e principalmente depreciação na qualidade do produto final (NOBRE et al., 2007; RAVANELI, 2010).

Segundo Santos Júnior (1998), das 180 espécies de bactérias identificadas na fermentação alcoólica para produção de cachaça, a maior porcentagem foi de Gram-positivas, sendo 30% pertencentes ao gênero *Bacillus*.

Portanto ressalta-se a importância de práticas de assepsia nos diferentes compartimentos assim como limpeza das moendas, tubulações, além do descarte de fundo de dorna, returbação do fermento e tratamento ácido. Porém, o eficiente controle está associado principalmente ao uso de antimicrobianos adequados e na dosagem correta, pois a aplicação racional desses produtos deve visar apenas a população de bactérias e não a de leveduras (RODRIGUES; DANTAS; FINZER, 2009).

2.7. Controle de contaminantes

A manutenção do fermentador livre de micro-organismos indesejáveis é especialmente importante. O processo fermentativo não ocorre sem o devido controle desses contaminantes, sendo necessário manter o equilíbrio entre as populações microbianas, em meio favorável às leveduras.

Como medidas preventivas de controle, são amplamente utilizados nas indústrias de fermentações alcoólicas, insumos como ácido sulfúrico e antimicrobianos que são adicionados ao mosto ou ao levedo alcoólico (VENTURI-FILHO e NOGUEIRA, 2013).

As unidades produtoras normalmente fazem uso de antimicrobianos sintéticos para combater a contaminação bacteriana, porém pode acarretar a seleção de bactérias resistentes e consequente surgimento de nova população de contaminantes. Além de onerar significativamente o processo, estima-se que, para cada metro cúbico de etanol produzido, são gastos de US\$ 3,00 a US\$ 5,00, em média, com antibióticos nas usinas (SCHENBERG, 2010).

Neste sentido, existe uma demanda por produtos antimicrobianos naturais em substituição total ou parcial aos atualmente utilizados pela indústria, os quais deixam traços remanescentes do produto nas células de leveduras e destilados.

2.8. Antimicrobianos naturais

A própolis é produto natural, economicamente viável, livre de resíduos químicos prejudiciais, tem se tornado uma opção diferenciada no controle microbiológico, num processo produtivo sustentável (RODRIGUES; DANTAS; FINZER, 2009). Por estas características, tem sido extensivamente empregada desde os tempos antigos, como antisséptico, agente cicatrizante, remédio popular, disponível no estado puro ou combinado com outros produtos naturais em cosméticos e como componente de alimentos (SFORCIN, 2010).

Conforme Instrução Normativa Nº 3, Anexo VI, *entende-se por Própolis, o produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas, de brotos, flores e exsudados de plantas, nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para elaboração final do produto* (BRASIL, 2001).

Algumas são fibrosas e firmes, enquanto outras são gomosas e maleáveis, variando de acordo com a origem botânica dos exudatos coletados pelas abelhas e com as condições sazonais. A própolis é produzida em qualquer época do ano sendo utilizada pelas abelhas com o intuito mecânico de vedar e calafetar a colméia, atuando como um agente termorregulador, evitando a exposição da colônia a correntes de ar e infestação por elementos estranhos (FREITAS; BARTH; LUZ, 2010).

Apresentam coloração dependente de sua procedência, assim pode ser desde o marrom escuro passando a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado, dependendo do tipo de própolis e idade (MARCUCCI, 1996). Esta variação é resultante da grande biodiversidade da flora típica regional e da habilidade bioquímica das abelhas em alterar a composição nativa ou adicionar componentes próprios à própolis (PEREIRA; SEIXAS; NETO, 2002).

As inúmeras atividades biológicas da própolis são essencialmente atribuídas à sua composição química. É considerada uma das misturas mais heterogêneas e complexas encontradas em fontes naturais; atualmente mais de 300 constituintes já foram identificados e/ou caracterizados em diferentes amostras de própolis. O maior grupo de compostos isolados são os flavonóides, encontrados em todas as partes do reino vegetal, os quais junto com os ácidos carboxílicos modificados são componentes estratégicos na própolis, sendo responsáveis pela bioatividade contra vários micro-organismos patogênicos (BURDOCK, 1998). Além destes, citam-se os ácidos aromáticos, terpenóides, fenilpropanóides e ácidos graxos (LUSTOSA, 2008).

Bispo Junior et al. (2012), relatam que a atividade antibacteriana da própolis pode estar relacionada diretamente ao teor de flavonóides e à atividade antioxidante da mesma, onde a maior concentração desses compostos bioativos determina maior atividade antibacteriana.

2.9. Destilação

A destilação é uma das etapas finais de produção das cachaças, que deve ser efetuada de forma que o destilado tenha aroma e sabor dos elementos naturais voláteis contidos no mosto fermentado, ou formados durante a destilação (BREGAGNOLI, 2006). Estando esta não sujeita somente à sua composição qualitativa em ésteres, ácidos, álcoois e aldeídos, mas principalmente pela participação quantitativa destes elementos que condicionam o aroma e sabor típico das cachaças. Além de outras variáveis, como natureza e composição dos vinhos, do tipo de aparelho de destilação e da condução operacional (MUTTON e MUTTON, 1992).

Concluída a fermentação, processa-se a destilação do vinho, produto com composição complexa e variável de substâncias gasosas, sólidas e líquidas (CARDOSO, 2013). Este é então encaminhado aos aparelhos de destilação (colunas ou alambiques de cobre) para que seja separada, selecionada e concentrada pelo uso do calor, a fração dos componentes oriundos da fermentação do mosto e obtenção da bebida destilada.

2.10. Componentes secundários e Qualidade da Cachaça

O conceito de qualidade engloba aspectos responsáveis por satisfazer as expectativas do consumidor e não oferecer riscos à saúde. Os componentes da cachaça classificados como secundários constituem um grupo de produtos minoritários oriundos de reações provenientes dos processos de destilação, envelhecimento e principalmente na fermentação (CARDOSO, 2013).

Estes componentes são essencialmente importantes, por conferirem cheiro, gosto e “bouquet” especiais, definindo as características químico-sensoriais à bebida. Na ausência destes compostos o destilado seria simplesmente uma solução hidro-alcóolica com gosto e cheiro típicos de álcool (Valsechi, 1960). Podem

proporcionar ao destilado aromas delicados ou agressivos, resultando em qualidade desejável ou não. (CARDOSO, 2013). Assim sendo, a legislação brasileira pela da Normativa nº13/2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (Tabela 1), estabelece os limites de cada composto na bebida, proporcionando harmonia ao destilado e segurança ao consumidor.

Tabela 1: Limites dos componentes secundários e contaminantes orgânicos na cachaça, em mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro.

Componentes	Limite	
	Mínimo	Máximo
Acidez volátil, expressos em ácido acético	-	150,00
Ésteres, expressos em acetato de etila	-	200,00
Aldeídos totais, expressos em acetaldeído	-	30,00
Álcoois superiores*	-	360,00
Congêneres**	200,00	650,00
Metanol	-	20
Álcool sec-butílico (sec-butanol)	-	10,00
Álcool n-butílico (n-butanol)	-	3,00
Acroleína (2-propenal)	-	5,00

*Álcoois superiores: isobutílico + isoamílico + propílico

**Congêneres: acidez volátil + ésteres + aldeídos + furfural + álcoois superiores

Fonte: MAPA. Instrução Normativa nº 13, de 30/06/2005.

Entre os ácidos, produtos secundários da fermentação alcoólica, o ácido acético tem sido quantitativamente o principal componente da fração ácida das cachaças expresso em acidez volátil. A acidez de uma cachaça é de grande importância, constituindo um fator de qualidade, uma vez que, durante sua produção, os ácidos reagem com os álcoois presentes, aumentando a formação dos ésteres. Entretanto, o excesso de acidez promove sabor indesejado e ligeiramente “agressivo”, depreciando a sua qualidade (FRANÇA et al., 2010).

Ésteres, como o acetato de etila, têm aroma peculiar de frutas e de modo geral, são desejáveis nas cachaças, pois quando em excesso, participam de forma negativa na qualidade do produto final (CANUTO, 2013). A quantidade e proporção dos diferentes ésteres influenciam a percepção de sabores e aromas, sendo essas características dependentes de fatores como o tipo e a quantidade do fermento, temperatura, aeração e agitação na fermentação e qualidade do caldo (CARDOSO, 2013).

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 (OLIVEIRA FILHO, 2010).

Os álcoois superiores são álcoois com mais de dois átomos de carbono formados durante o processo oxidativo ou a partir do metabolismo dos aminoácidos pelas leveduras. Aqueles com até cinco átomos de carbono apresentam odores característicos, sendo compostos importantíssimos na definição do sabor e do aroma de bebidas destiladas, destacando-se os álcoois amílico e propílico, e seus respectivos isômeros (LIMA, 2012). As quantidades produzidas variam com as condições de fermentação do gênero, espécie e, provavelmente, com a cepa utilizada (SOARES et al., 2011). Além das condições do meio de fermentação, quantidade e viabilidade do inóculo, temperatura, teor alcoólico final do vinho, entre outros fatores (MONTEIRO, 2010).

Os aldeídos estão presentes na cachaça, sendo a maioria indesejável do ponto de vista toxicológico. Trata-se de compostos muito voláteis, de odor penetrante, que afetam o aroma das bebidas alcoólicas (CARDOSO, 2013). São resultantes da oxidação parcial ou desidrogenação de alcoóis primários, podendo ser considerados intermediários na formação dos ácidos ou alcoóis superiores. O principal aldeído associado à fermentação alcoólica é o acetaldeído, importante na composição do aroma e sabor do produto (CLETO, 1997).

O metanol é produzido devido à degradação da pectina, polissacarídeo presente na cana-de-açúcar por enzimas microbianas ou pelos ácidos do mosto. A molécula de pectina é um composto formado pela associação de centenas de moléculas de ácido galacturônico, que possuem fragmentos de moléculas de metanol, as quais são liberadas durante o processo de fermentação. É um álcool particularmente indesejável na cachaça, pois, sua ingestão mesmo que em quantidades reduzidas, por longos períodos de consumo, pode ocasionar cegueira e morte (CARDOSO, 2013). Portanto, ressalta-se a importância do preparo do caldo de cana, através da retirada de impurezas, com sistemas de filtração e decantação, a fim de evitar a presença de bagacilhos no material a ser fermentado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Tecnologia do Açúcar e do Alcool e Microbiologia das Fermentações - FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal-SP, na safra 2013/2014.

3.1. Delineamento experimental

Adotou-se o delineamento em parcelas subdivididas com três repetições, empregando-se 5 tratamentos principais (Biocidas): Controle (caldo sem tratamento); antimicrobiano sintético (monensina sódica); extrato etanólico de própolis verde (EPPV), extrato etanólico de própolis marrom (EPPM), Tratamento Físico-Químico do caldo (TFQ). O tratamento secundário foi constituído por cinco ciclos fermentativos.

Os resultados foram submetidos a análise de variância pelo teste F e as médias comparadas segundo teste de Tukey (5%), utilizando-se o programa ASSISTAT versão 7.7 beta.

3.2. Matéria-prima

Utilizaram-se colmos de cana recém cortados, da variedade RB867515, 3º corte, provenientes da Fazenda São José - Paulo Garcia, unidade produtora devidamente certificada como orgânica, localizada do município de Jaboticabal-SP. A colheita foi realizada manualmente, com desponte no ponto natural de quebra, sem queima prévia da palha. A adubação e nutrição do canavial foram realizadas com o emprego de compostos orgânicos proveniente de esterco bovino produzido na propriedade. Durante a condução da cultura realizou-se o manejo biológico de pragas utilizando-se inimigos naturais através da aplicação de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Cotesia flavipes*.

3.3. Preparo dos antimicrobianos

3.3.1. Monensina sódica

O antimicrobiano sintético a base de monensina sódica foi preparado a partir de diluição direta em solução de 50% de etanol, aplicado na concentração de 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, de acordo com orientação do fabricante (QUÍMICA REAL, 2013).

3.3.2. Própolis

As amostras de própolis bruta do tipo verde e marrom foram cedidas pela Cooperativa Nacional dos Apicultores do Brasil (CONABRA) - Bebedouro- SP e Apiário Campo Alegre - Formiga- MG, respectivamente.

3.3.3. Extrato etanólico de Própolis (E E P)

Para a obtenção dos extratos, as amostras de própolis foram inicialmente trituradas em liquidificador convencional e em seguida maceradas. Estes foram preparados na proporção de 30% (30 g de própolis, completando o volume para 100 mL de álcool etílico p.a 70%). As soluções foram mantidas em temperatura ambiente por 7 dias, sob agitação periódica. Em seguida, foram submetidas à centrifugação a 8800 g mantendo-se a temperatura a 20°C por 20 minutos e acondicionadas em frascos âmbar em temperatura ambiente (MELLO; PETRUS; HUBINGER, 2010).

O perfil físico-químico dos extratos foi preliminarmente determinado através do pH, solubilidade em acetato de chumbo e solubilidade ao hidróxido de sódio, atividade antioxidante, % extrato seco, teor de flavonóides totais. As análises foram realizadas pelo Núcleo de Ensino, Ciência e Tecnologia em Apicultura Racional

(NECTAR), na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, FMVZ/UNESP-Câmpus de Botucatu.

Os ajustes de doses foram estabelecidos a partir da realização de ensaios preliminares, avaliando-se diferentes concentrações dos extratos, sendo posteriormente definido $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ em relação ao volume de capacidade útil da dorna para Extrato Etanólico de Própolis Verde (EEPV) e $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ para Extrato Etanólico de Própolis Marrom (EEMP).

3.4. Preparo dos mostos

Os colmos foram submetidos ao processo de extração em moenda, sendo o caldo extraído filtrado em tela de 60 *mesh*, para remoção de impurezas grosseiras (bagacilho, terra). Este foi padronizado em 16°Brix à temperatura ajustada para 28 a 32°C, originando o Mosto 1.

Para o preparo dos dois mostos não houve correção do pH. Utilizou-se o mosto considerando apenas o pH natural do caldo de cana, atendendo à recomendação técnica para emprego da levedura CA-11.

Para obtenção do Mosto 2, o caldo padronizado para 16°Brix, recebeu adição de hidróxido de cálcio 6°Bé até atingir pH 6,0. A seguir foi aquecido até a fervura possibilitando a reação entre o cálcio e o fósforo presente na solução (ALBUQUERQUE, 2011). O caldo aquecido foi transferido para um decantador de inox, com prévia adição de extrato de folhas de *Moringa oleífera* Lamarck, preparado conforme Ghasi, Nwobodo e Ofili, 2000 na dosagem de 5 mg L^{-1} (COSTA et al., 2014), para auxiliar a sedimentação dos flocos formados. Após 1 hora em repouso, o sobrenadante foi sifonado, originando o TFQ, que foi resfriado a temperatura ambiente.

As características químico-tecnológicas dos caldos e mostos foram determinadas através das análises de pH, açúcares redutores totais (ART) (Lane e Eynon, 1934) e acidez total (CTC, 2005).

3.5. Levedura

Utilizou-se levedura *S. cerevisiae* CA-11, de alta capacidade floculante, recomendada para produção de cachaça (Figura 1).



Figura 1: Aspecto da característica floculante da levedura CA-11

3.5.1. Preparo do inóculo

A etapa de multiplicação, adaptação e ativação das células, ocorreu a partir de 30 g L⁻¹ do fermento seco. Procedeu-se à hidratação prévia do mesmo com 600 mL de água potável. Após 30 minutos realizou-se à primeira alimentação com 3,0 L de caldo estéril a 10°Brix, seguida da adição dos 6,0 L de caldo restante, quando se verificou a redução do Brix do mosto para 2°. Este processo era repetido até a obtenção da massa de células necessária para compor o pé-de-cuba.

3.5.2. Processo fermentativo

As fermentações foram conduzidas em dornas de aço inoxidável de fundo cônico, com capacidade útil de 6 L, através do sistema de batelada alimentada, com recuperação do fermento por sedimentação.

Para o 1° ciclo de cada repetição, o “pé-de-cuba”, foi preparado a partir da adição de 7,5% de fermento ativado, previamente diluído em 1,5 L de mosto a 6°Brix. Foram realizadas duas alimentações sendo a primeira de 2,0 L de mosto e a

segunda de 2,5 L de mosto a 16°Brix, em intervalos de 30 minutos e 90 minutos, respectivamente.

O final da fermentação foi estabelecido quando o Brix do vinho apresentava-se menor ou igual a 1. Após o término, 2/3 da dorna era sifonado pela abertura lateral, retirando-se o vinho, que era enviado para o processo de destilação.

Do 2º ao 5º ciclo, as células de leveduras que permaneceram no 1/3 inferior da dorna receberam a adição de 700 mL de solução salina 0,75%, objetivando a redução dos teores de elementos tóxicos para a levedura, tais como álcool e ácidos. Após 1 hora em repouso, sifonou-se o excedente, aplicando-se a seguir os biocidas. O tratamento em que não se aplicou biocida adicionou-se volume similar de solução salina. Após 1 hora de tratamento, realizavam-se novas alimentações, iniciando-se um novo ciclo fermentativo.

No 3º e 5º ciclo realizava-se a limpeza de fundo de dorna para retirada de aproximadamente 5% de material inerte e células mortas.

3.5.3. Determinações tecnológicas e microbiológicas

Foram retiradas alíquotas no início e final de cada ciclo fermentativo, para análises físico-químicas (pH e °Brix) e desempenho fisiológico da levedura, através de contagem direta por microscopia (viabilidade celular, de brotos e taxa de brotamento) segundo Lee, Robinson e Wong (1981).

Para realização do plaqueamento (método indireto) foram coletadas amostras do caldo extraído, mosto, pé-de-cuba, após 1 hora da aplicação dos biocidas e 40 minutos da segunda alimentação e ao final da fermentação. As amostras foram inoculadas em meios seletivos para contagem de micro-organismos totais- PCA (PLATE COUNT AGAR, USFDA, 1995); bactérias lácticas - MRS⁺ Agar (MAN, ROGOSA; SHARPE, 1960) com adição de cicloheximida (100 mg.L⁻¹) e de leveduras totais - WLN (OLIVEIRA; PAGNOCA, 1988) com adição de ampicilina e ácido nalidíxico, ambos na dosagem de 500 mg.L⁻¹.

Para os 3 meios utilizou-se 2 placas, com 2 repetições correspondentes a cada diluição seriada. As placas foram incubadas para o crescimento a 32 °C por 24

horas para o meio PCA e 72 horas para MRS⁺ e WLN⁺ e posterior contagem das colônias.

3.5.4. Destilação do vinho

Para realização das análises dos vinhos objetivando sua caracterização, realizou-se a centrifugação a 1650 x g, 25°C, por 5 minutos (centrífuga HIMAC CR 21G), obtendo-se o vinho centrifugado para as seguintes determinações: acidez total (CTC, 2005), pH (leitura direta em potenciômetro digital) e glicerol (MACGOWAN et al., 1993).

Os vinhos dos mesmos tratamentos (repetições) foram destilados em microdestilador de álcool modelo TE-012 Tecnal, com um volume de 60 mL recuperando 20 mL com concentração de 3 vezes para a quantificação do teor alcoólico em densímetro automatizado (Anton Paar DMA-48).

3.5.5. Destilação para obtenção da cachaça

Ao final das fermentações, os vinhos separados por tratamento e repetições foram destilados em alambique de cobre com capacidade total de 10 litros, aquecido através de fogo direto. As destilações foram conduzidas separando-se as frações de cabeça, coração e cauda, sendo coletado apenas o coração, correspondente a 80% (volume) do destilado com graduação alcoólica de 38 a 40% a 20°C.

3.5.5.1. Componentes secundários da cachaça

As cachaças produzidas foram submetidas à análise cromatográfica no Laboratório da Cooperativa dos Produtores de Aguardente de Cana e Álcool do Estado de São Paulo – COPACESP, Barrinha-SP, para a verificação da adequação aos parâmetros da legislação do Padrão de Qualidade da cachaça ou aguardente de cana-de-açúcar (BRASIL, 2005).

Foram identificados e quantificados os teores de acroleína, acidez volátil, acetaldeído, ésteres, metanol, alcoóis superiores, propílico, isobutílico, isoamílico em cromatógrafo gasoso GC Varian 3900, acoplado com software Galaxie Chromatography, coluna Varian Capillary Column, CP – Wax 52 CB, 30m 0.53mm 1um #CP8738. Injetou-se 1µL de cada amostra nas seguintes condições: temperatura do injetor: 175°C, temperatura do detector: 210°C, empregando-se como gás de arraste: ar sintético.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização físico-química dos EEPs

Foram determinados constituintes presentes nos extratos etanólicos de própolis, que são apontados como indicadores de qualidade (Tabela 2). Os resultados demonstram que os EEPs estão em conformidade com normas presentes no “Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Própolis” (Brasil, 2001), o qual estabelece atividade máxima de oxidação de 22 segundos, teor de flavonoides totais mínimo de 0,25% (m/m), e resultado positivo para variável Solubilidade ao Acetato de chumbo e ao Hidróxido de Sódio.

Tabela 2: Caracterização físico-química dos extratos etanólicos de própolis realizado no Núcleo de Ciência e Tecnologia em Apicultura Racional (NECTAR), FMVZ / UNESP- Botucatu.

Perfil físico-químico	EEPV	EEPM
Solubilidade ao Acetato de Chumbo	Positivo	Positivo
Solubilidade ao Hidróxido de Sódio	Positivo	Positivo
Atividade antioxidante em segundos	22	13
Teor de Flavonoides totais (%)	0,48%	0,70%

4.2. Matéria-prima e mosto

A matéria-prima utilizada para realização deste estudo, em todos os ciclos fermentativos apresentou características tecnológicas ideais ao processamento, com valores médios de °Brix próximos a 22,2, pureza acima de 90%, ART da ordem de 18,9%, AR de 0,55%, acidez total próxima a 0,8 g L⁻¹ H₂SO₄ e pH de 5,3, conforme recomendado por Ripoli e Ripoli (2009).

Após caracterização da matéria-prima, os caldos extraídos foram padronizados quanto ao teor de sólidos solúveis (mosto), realizando-se, ou não, prévio tratamento físico-químico (TFQ). Após este procedimento, verificou-se decréscimo de 26% para os ART presentes no material a ser fermentado em

comparação ao caldo original, fato este decorrente da diluição do mesmo. Contudo, estes valores foram suficientes para que a levedura ativasse seu metabolismo anaeróbio realizando o processo fermentativo através do efeito Crabtree, o qual induz este micro-organismo a fermentação alcoólica em substratos com teores de açúcares acima de 6% (VENTURINI FILHO; NOGUEIRA, 2013).

A determinação do pH dos mostos, apontou valores médios da ordem de 5,2 para o mosto 1 e de 5,9 para o mosto 2. Esta diferença era esperada uma vez que se realizou o tratamento do caldo, elevando-se o pH a 6,0 para o mosto 2. Deve-se ressaltar que não foi efetuada correção de pH dos mostos antecedendo à inoculação com a levedura CA-11, objetivando anteceder suas exigências metabólicas.

A quantificação dos teores de ácidos totais presentes nos mostos 1 e 2, indicaram valores médios de $0,6 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ para o primeiro, e de $0,24$ a $0,41 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ para o segundo, ao longo dos cinco ciclos fermentativos (Tabela 3). A diferença de acidez entre os mostos foi decorrente do tratamento prévio físico-químico do caldo, que promoveu a remoção de ácidos através de adsorção/arraste pelos fosfatos de cálcio formados no meio (ALBUQUERQUE, 2011). Deve-se ressaltar que elevadas quantidades desses compostos, impactam negativamente na fisiologia da levedura em fermentação, reduzindo a quantidade de células vivas (DORTA et al., 2006). Segundo Maiorella et al. (1983), teores de 4% de ácidos orgânicos na fermentação foram suficiente para reduzir a viabilidade de células de levedura em até 80%.

Tabela 3: Resultados médios obtidos para Acidez Total de mosto original (1) e clarificado (2), utilizados nos ciclos fermentativos.

Ciclos	Mosto 1 Acidez Total ($\text{g L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$)	Mosto 2 Acidez Total ($\text{g L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$)
1	0,73 A	0,41 A
2	0,61 A	0,24 B
3	0,58 A	0,31 AB
4	0,54 A	0,30 AB
5	0,58 A	0,30 AB
Teste F	0,97 ns	4,58 *
DMS	0,35	0,13
CV	21,40	15,81

*significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 < p < 0,05$); ns=não significativo; CV = Coeficiente de variação em % ; DMS = Diferença mínima significativa.

4.3. Processo fermentativo

Durante o desenvolvimento do processo fermentativo, avaliou-se a viabilidade celular e de brotos do inóculo (pé-de-cuba), (Quadro 1 do apêndice). Da sua análise verificaram-se valores médios superiores a 90% de viabilidade celular e índice de brotamento próximos a 19%.

Para a viabilidade celular no início do processo fermentativo (Figura 2A), observou-se que o tratamento controle apresentou decréscimo de células viáveis ao longo dos ciclos, sendo esse comportamento mais acentuado no 4° e 5° ciclo. Fermentações desenvolvidas a partir de mostos tratados com monensina sódica e EEPM, a porcentagem de fermento ao longo dos ciclos se manteve em crescimento. Os resultados corroboram com Oliveira Filho (2010), que trabalhando com fermento comercial prensado, relatou manutenção da quantidade de células vivas ao longo de 5 ciclos de fermentação quando aplicou EEPM e redução para o tratamento controle.

A utilização de EEPV promoveu redução de 8% de células viáveis, na fase inicial da fermentação (Figura 2A), quando se avaliou o 4° ciclo. No entanto, esse valor foi da ordem de 82%, comportamento esperado. De acordo com Amorim, Basso e Alves (1996), para que uma fermentação seja eficiente, as estirpes deve apresentar viabilidade de 80 a 90% de células viáveis. Assim como para os demais tratamentos, o TFQ proporcionou elevado número de células viáveis, da ordem de 87% a 100%.

A viabilidade celular na fase final (Figura 2B) aumentou para todos os tratamentos utilizados do 1° ao 4° ciclo. Para o 5° ciclo as reduções foram da ordem de 84% para o controle, 81% para monensina sódica, 86% para EEPV, 74% para EEPM e 75% para o TFQ. Esses resultados confrontam os de (BREGAGNOLI, 2006) e (OLIVEIRA FILHO, 2010), que verificaram índices de viabilidade celulares elevados apenas para os tratamentos com o antimicrobiano sintético. Essa divergência pode ser decorrente das cepas de leveduras empregadas, ou ainda à condição ambiental durante o ensaio. (MENDES, et al., 2013) citam que ao término de uma fermentação alcoólica é comum observar-se queda da viabilidade celular, frequentemente atribuída a fatores intrínsecos do meio, concentração de metabólitos

inibidores do processo (etanol, ácidos, temperatura). Este fato não foi observado neste estudo, confirmando que a levedura CA-11 apresentou-se adaptada às condições de processo, favorecendo a manutenção de sua atividade metabólica.

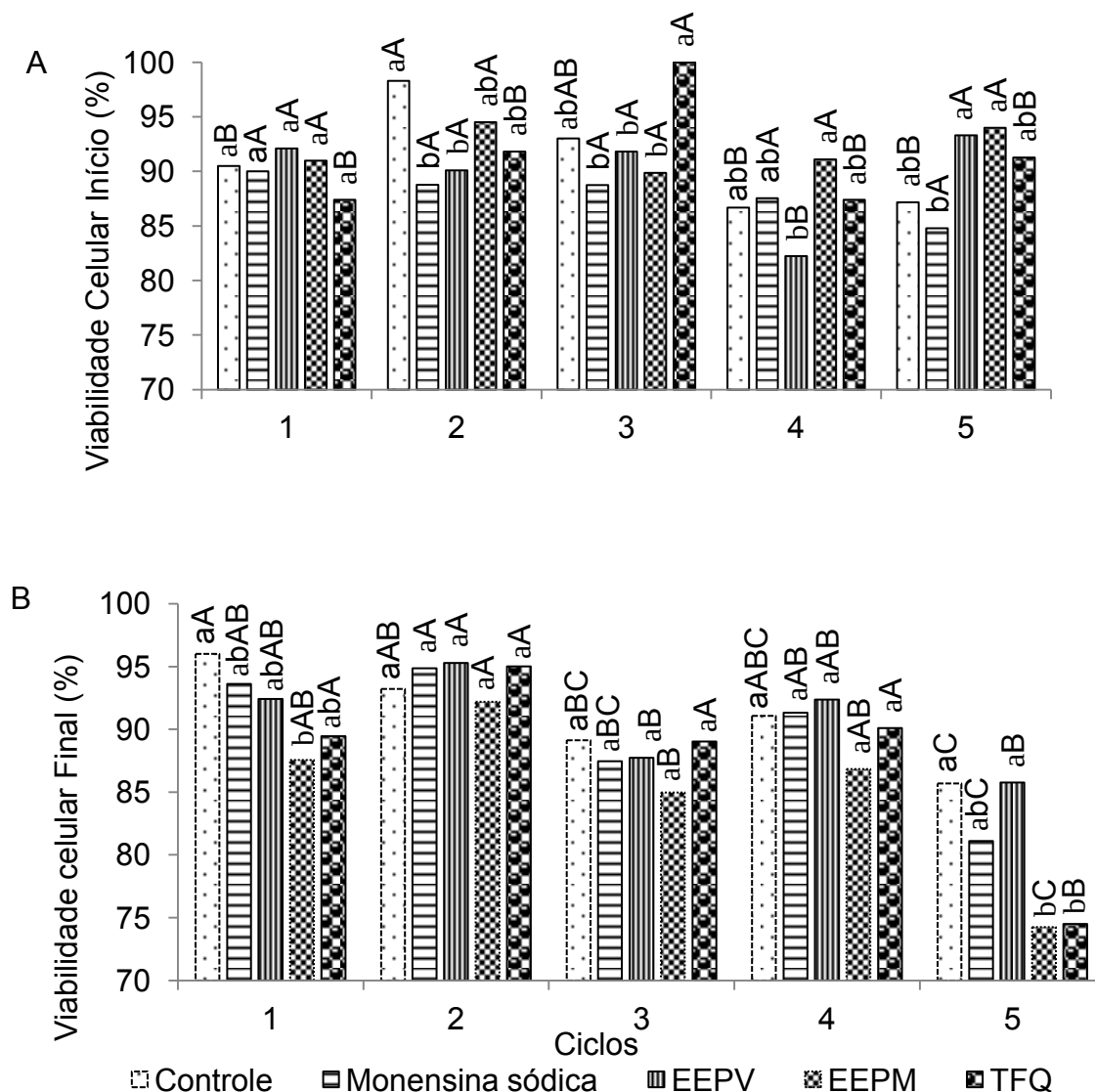


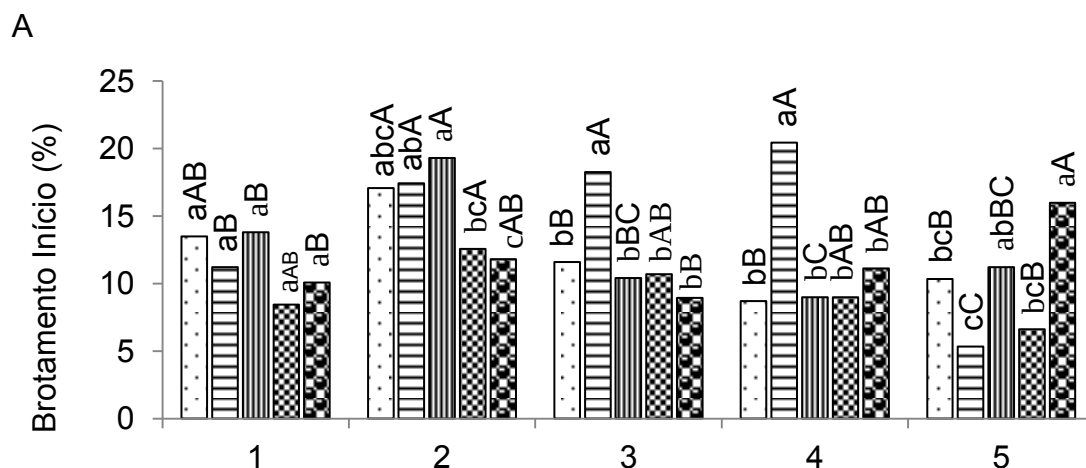
Figura 2: Desdobramento da interação entre tratamentos e ciclos para viabilidade de brotos da levedura CA-11 na fase inicial e final do processo fermentativo. Jaboticabal-SP, Safra 2013/2014. Letras maiúsculas comparam médias entre ciclos com mesmo tratamento. Letras minúsculas comparam médias entre os tratamentos de cada ciclo.

Na figura 3 estão representados os índices de brotamento de células na fase inicial (3A) e final (3B) da fermentação. Sendo os valores da ordem de 5 a 20%

durante os ciclos no período inicial e final da fermentação. Estes estão de acordo com os determinados por Amorim, Basso e Alves (1996), os quais relatam que a porcentagem ideal de brotamentos em um processo fermentativo deve variar entre 5 a 15%.

A utilização de EEPV e o TFQ (Figura 3A e 3B) promoveram acréscimos dos índices de brotamentos no decorrer dos ciclos, enquanto que para o EEPM, manteve-se estável na fase final do processo fermentativo.

A alta taxa de brotamentos pode justificar a facilidade de adaptação da levedura em diversas condições do substrato, favorecendo a manutenção da viabilidade celular. Entretanto o açúcar metabolizado pelas leveduras é direcionado ou para a produção de etanol, glicerol ou produção de ATP e biomassa, ou seja, um elevado índice de brotamento na fermentação etanólica pode promover baixos índices de etanol e consequente baixa eficiência fermentativa (Lima et al., 2001).



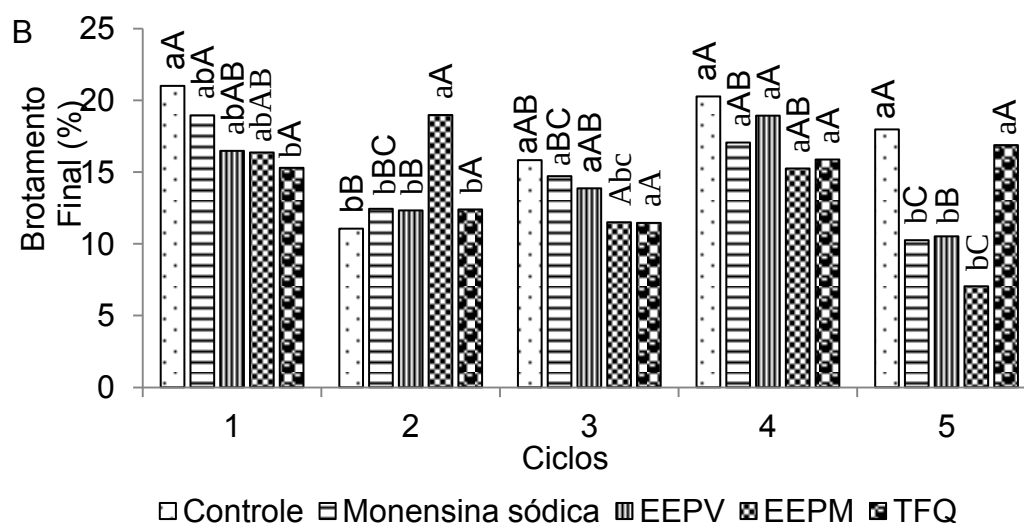


Figura 3: Desdobramento da interação entre tratamentos e ciclos para brotamento de células da levedura CA-11 na fase inicial e final processo fermentativo. Jaboticabal-SP, Safra 2013/2014. Letras maiúsculas comparam médias entre ciclos com mesmo tratamento. Letras minúsculas comparam médias entre os tratamentos de cada ciclo.

Na Tabela 4 estão apresentados os valores de viabilidade de brotos para o início e final da fermentação. Para o início do processo fermentativo comparando-se os tratamentos com extratos de própolis, verificou-se maior quantidade de brotos vivos. Estes resultados diferem dos obtidos por Oliveira Filho (2010) e Halabi (2010), trabalhando com leveduras PE-2, CAT-1 e fermento prensado comercial, para os quais relataram valores de viabilidade de brotos igual entre própolis, antimicrobiano sintético e controle. Neste contexto pode-se destacar a resposta positiva da levedura CA-11 em meios contendo os EEPs.

Analisando-se este parâmetro sobre os ciclos fermentativos observou-se ligeira redução no segundo ciclo, provavelmente associado a menor quantidade de energia, produzida nesse momento, contribuindo para a redução da taxa de multiplicação celular. Entretanto os valores para índice de viabilidade de brotos ($p < 0,05$) foram superiores a 88%, que podem ser considerado excelente. A taxa de células e brotos viáveis é importante para manutenção dos níveis de população de leveduras, uma vez que serão reutilizadas nos ciclos fermentativos posteriores, podendo refletir sobre o rendimento da fermentação (RAVANELL et al., 2006).

Considerando-se a quantidade de brotos vivos no final do processo fermentativo, verificou-se os menores valores para o tratamento em que se aplicou EEPM. Confrontando os valores obtidos aos de Oliveira Filho (2010), não se constatou redução na viabilidade de brotos nesta etapa fermentativa, que se equivaleram aos relatados por Halabi (2010).

Tabela 4: Valores médios obtidos para viabilidade de brotos no início e final dos ciclos fermentativos. Jaboticabal-SP. Safra 2013/2014.

	Viabilidade de brotos início (%)	Viabilidade de brotos final (%)
Tratamentos (B)		
Controle	88,60 B	96,26 A
Monensina sódica	89,40 B	89,74 AB
EEPV	93,56 AB	94,62 A
EEPM	95,97 A	84,94 B
TFQ	91,70 AB	96,55 A
Teste F	5,80*	5,92 *
DMS	5,84	9,55
CV	5,29	8,59
Ciclos (C)		
1	91,86 AB	91,47 AB
2	88,62 B	96,96 A
3	92,68 AB	89,78 AB
4	90,07 AB	95,56 AB
5	96,00 A	88,32 B
Teste F	3,54*	3,67 *
DMS	6,02	7,82
CV	6,28	8,11
Interação BxC	1,67 ns	1,12 ns

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 < p < 0,05$); ns=não significativo; CV = Coeficiente de variação em % ; DMS = Diferença mínima significativa.

4.4 Caracterização dos vinhos

4.4.1 pH e acidez total

Analisando os resultados de acidez e pH obtidos nas três repetições durante os cinco ciclos fermentativos (Figura 4A), verificou-se que os tratamentos com antimicrobiano sintético, EEPV, EEPM e TFQ resultaram em menores valores para acidez total e apresentaram valores mais elevados de pH (Figura 4B). Apontando-se que este comportamento foi observado a partir do segundo ciclo. Estes resultados corroboram com Bregagnoli (2006) e Oliveira Filho (2010) que também constataram redução de ácidos totais quando se empregou algum controle antimicrobiano.

De acordo com Amorim e Oliveira (1982), os micro-organismos contaminantes do processo fermentativo provocam um aumento da acidez do meio, devido à maior produção dos ácidos fixos e voláteis produzidos pelas bactérias.

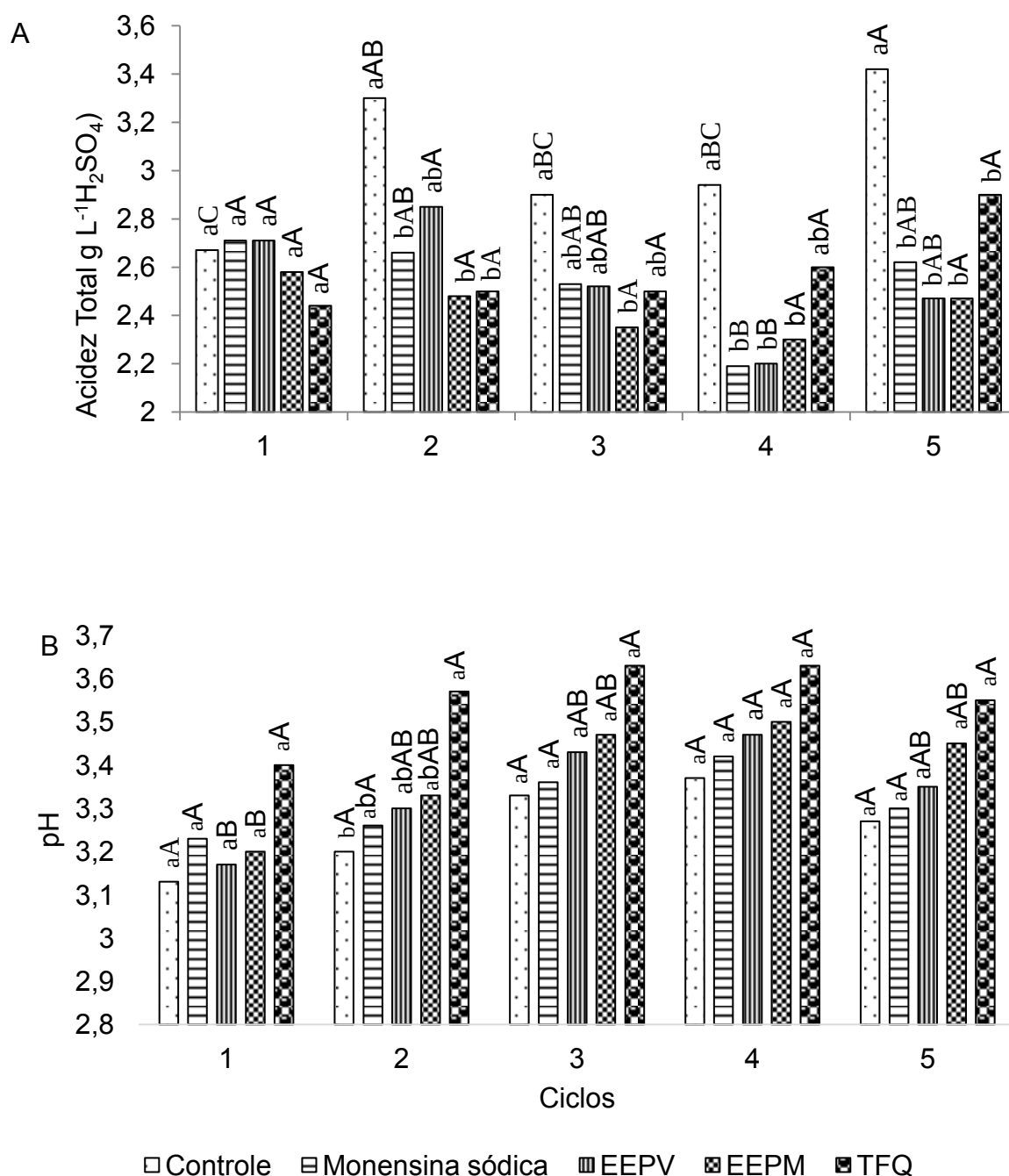


Figura 4: Desdobramento da interação entre tratamentos e ciclos para pH e acidez total dos vinhos. Jaboticabal-SP, Safra 2013/2014. Letras maiúsculas comparam médias entre ciclos com mesmo tratamento. Letras minúsculas comparam médias entre os tratamentos de cada ciclo.

4.5 Glicerol e Teor alcoólico

Na Tabela 5 estão representados os valores obtidos para teor de glicerol em vinhos obtidos através de fermentação provenientes de diferentes biocidas.

O glicerol é uma molécula sintetizada pela levedura a fim de manter equilíbrio redox celular, o qual é alterado quando da formação de ácidos orgânicos e biomassa (Lima et al., 2001). Neste contexto, observou-se o controle bacteriano resultou em menor produção de ácidos e, conseqüentemente, menores teores deste composto.

Ressalta-se que este comportamento foi mais acentuado para os vinhos tratados EEPM, com redução de 0,21% em relação ao tratamento controle (Tabela 5).

Estes resultados são superiores aos obtidos por Ferrari (2014), que trabalhando com processo fermentativo visando produção de etanol em escala industrial, obteve resultados que variaram de 0,23 a 0,40% de glicerol. Entretanto inferiores aos obtidos por Balli et al., (2003), que em fermentação de sacarose a 33°C verificaram valores da ordem de 1,10%.

O glicerol é formado na mesma via de síntese do etanol, que por um desvio, em função da competição pela utilização do poder redutor (NADH), motivo pelo qual a síntese deste composto é inversamente proporcional à do etanol. Portanto sua formação pode interferir no processo fermentativo de forma desfavorável (WANG et al., 2001). Ingledew (1999) relata que a formação de glicerol é comum até em concentrações de 1% no processo para produção de etanol.

Tabela 5: Valores médios e resultados da análise de variância para características químico-tecnológicas do vinho quanto à produção de glicerol.

	Glicerol (%)
Tratamentos (B)	
Controle	0,69 A
Monensina sódica	0,59 B
Própolis Verde	0,59 AB
Própolis Marrom	0,48 C
TFQ	0,63 AB
Teste F	12,71**
DMS	0,10
CV	14,09
Ciclos (C)	
1	0,58 A
2	0,57 A
3	0,58 A
4	0,62 A
5	0,62 A
Teste F	1,09 ns
DMS	0,09
CV	15,63
Interação BxC	1,88 ns

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 < p < 0,05$); ns=não significativo; CV = Coeficiente de variação em % ; DMS = Diferença mínima significativa.

No quadro 2 do apêndice, estão apresentados os resultados obtidos para os teores de etanol produzidos nos diferentes tratamentos. Os valores variaram de 6 a 7%. Da sua análise verifica-se que não houve influência significativa destes sobre o teor alcoólico dos vinhos. Resultados semelhantes foram relatados Bregagnoli (2006) e Oliveira Filho (2010) que observaram teores entre 6 e 7% em fermentação com fermento comercial prensado. Comportamento semelhante foi relatado por Bergamo e Uribe (2013) em fermentação com levedura CA-11 para produção de etanol.

4.6 Avaliações microbiológicas

A população microbiana natural do caldo de cana é composta por bactérias e leveduras que interagem no decorrer da fermentação. Uma alta população bacteriana pode interferir na produção dos compostos responsáveis pelo sabor e aroma da bebida (ANJOS et al., 2006).

Os resultados obtidos para as avaliações microbiológicas indicaram que a matéria-prima empregada neste estudo, apresentava-se com excelente qualidade demonstrando baixo número de contaminantes no caldo extraído e mosto (Tabelas 6 e 7). Este desempenho é o resultado do manejo adequado dos colmos, que eram cortados manualmente, sem queima prévia da palha, sendo imediatamente enviado para a extração do caldo e processamento. Neste sentido, os micro-organismos identificados através dos meios de cultura específicos, correspondem à microbiota natural presente no ecossistema produtivo, sendo da ordem de 10^6 UFC mL⁻¹, o que representa níveis aceitáveis e normais de contaminantes. Para o mosto, observou-se ligeira tendência de aumento de contaminantes no decorrer dos ciclos. Embora, tenha sido significativa para bactérias e para micro-organismos totais, os valores também se mantiveram da ordem de 10^6 . De acordo com a literatura, quando a contaminação bacteriana atinge níveis superiores a 10^8 células mL⁻¹ de mosto, pode ocorrer uma significativa queda no rendimento alcoólico (AMORIM; OLIVEIRA, 1982).

Tabela 6: Valores médios obtidos para contagem de bactérias lácticas (MRS+), micro-organismos totais (PCA) e leveduras (WLN+) em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) nos caldo referentes aos ciclos fermentativos 1, 3 e 5.

Ciclos	Bactérias Lácticas (UFC mL ⁻¹ x 10 ⁶)	Micro-organismos Totais (UFC mL ⁻¹ x 10 ⁶)	Leveduras (UFC mL ⁻¹ x 10 ⁶)
1	0,20 C	1,68 C	0,20 A
3	0,67 B	3,35 B	0,45 A
5	1,40 A	4,30 A	0,35 A
Teste F	1753,00 **	83,80 **	1,90 ns
DMS	0,08	0,85	0,54
CV	2,69	6,57	38,73

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); ns=não significativo; CV = Coeficiente de variação em %; DMS = Diferença mínima significativa. Letras minúsculas comparam valores na coluna.

Tabela 7: Valores médios obtidos para contagem de bactérias lácticas (MRS+), micro-organismos totais (PCA) e leveduras (WLN+) em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) no mosto referente aos ciclos fermentativos 1, 3 e 5.

Ciclos	Bactérias Lácticas (UFC mL ⁻¹ x 10 ⁶)	Micro-organismos Totais (UFC mL ⁻¹ x 10 ⁶)	Leveduras (UFC mL ⁻¹ x 10 ⁶)
1	0,53 A	2,30 AB	0,54 AB
3	0,29 C	6,00 A	0,17 B
5	0,45 B	1,01 B	1,00 A
Teste F	1713,00**	9,87 *	10,40 *
DMS	0,02	4,85	0,75
CV	0,96	37,56	31,60

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 < p < 0,05$); ns=não significativo; CV = Coeficiente de variação em % ; DMS = Diferença mínima significativa. Letras minúsculas comparam valores na coluna.

Os valores médios obtidos para a população de bactérias lácticas, micro-organismos totais e leveduras coletadas nas diferentes fases do processo: pé-de-cuba, início e final estão apresentados nos Quadros 3, 4 e 5, do apêndice, respectivamente.

Da interação entre biocidas e ciclos para a população de bactérias lácticas (Figuras 5A, B e C), avaliando-se o desempenho dos tratamentos estudados, verifica-se para o pé-de-cuba, comportamento semelhante para o primeiro e terceiro ciclos de fermentação, com baixo número de contaminantes. Para o quinto ciclo houve aumento desproporcional de bactérias para o tratamento físico químico (TFQ). Este não era o resultado esperado, uma vez que este tratamento de modo geral contribui de modo significativo para a redução de contaminantes nos mostos. Portanto, pode-se dizer que apesar de todos os cuidados tomados durante os procedimentos de análise, algum erro experimental pode ter ocorrido, resultando em aumento significativo dos contaminantes, embora ainda em 10⁶ UFC mL⁻¹.

Com relação aos valores determinados para o início e final da fermentação (Figuras 5B e C), verifica-se que estes se apresentaram um pouco superiores, entretanto ainda da ordem de 10⁶ UFC mL⁻¹. Este fato pode estar relacionado à utilização do mosto sem ajuste dos valores de pH. Assim, com pHs da ordem de 5,5 pode ter favorecido o desenvolvimento destas bactérias.

Considerando-se a população de leveduras presentes, observou-se que, no pé-de-cuba havia maiores quantidades destes micro-organismos em relação aos demais tempos amostrados (Figura 6A). Este resultado era esperado, uma vez que ao final do processo fermentativo, as células de leveduras sedimentaram, sendo, reutilizadas posteriormente. Desta maneira a concentração de leveduras por mililitro aumentou. Comparando-se os tratamentos, verificou-se que, de modo geral, a aplicação de biocidas e o TFQ do caldo, não resultaram em decréscimo da quantidade de leveduras durante os três diferentes tempos amostrados (Figura 6A, B e C) em comparação com o tratamento controle. Tais resultados também foram observados por Oliveira Filho (2010). Cabe destacar ainda que durante os 5 ciclos fermentativos a população de leveduras, nos tratamentos em que se utilizaram biocidas, permaneceu constante para os três tempos amostrados. Todavia, observaram-se ligeiros acréscimos de colônias no final do 5º ciclo para os tratamentos controle e TFQ (Figura 5C); provavelmente estes resultados são decorrentes de erros experimentais ocorridos durante a amostragem previamente a inoculação no meio de cultura.

Avaliando-se a concentração de micro-organismos totais para todos os tratamentos estudados, (Figura 7A, B e C), nos três diferentes tempos de amostragens, durante os 5 ciclos fermentativos, verificou-se população de micro-organismos da ordem de 10^9 UFC mL⁻¹, comportamento similar aos apresentados no meios de cultura WLN.

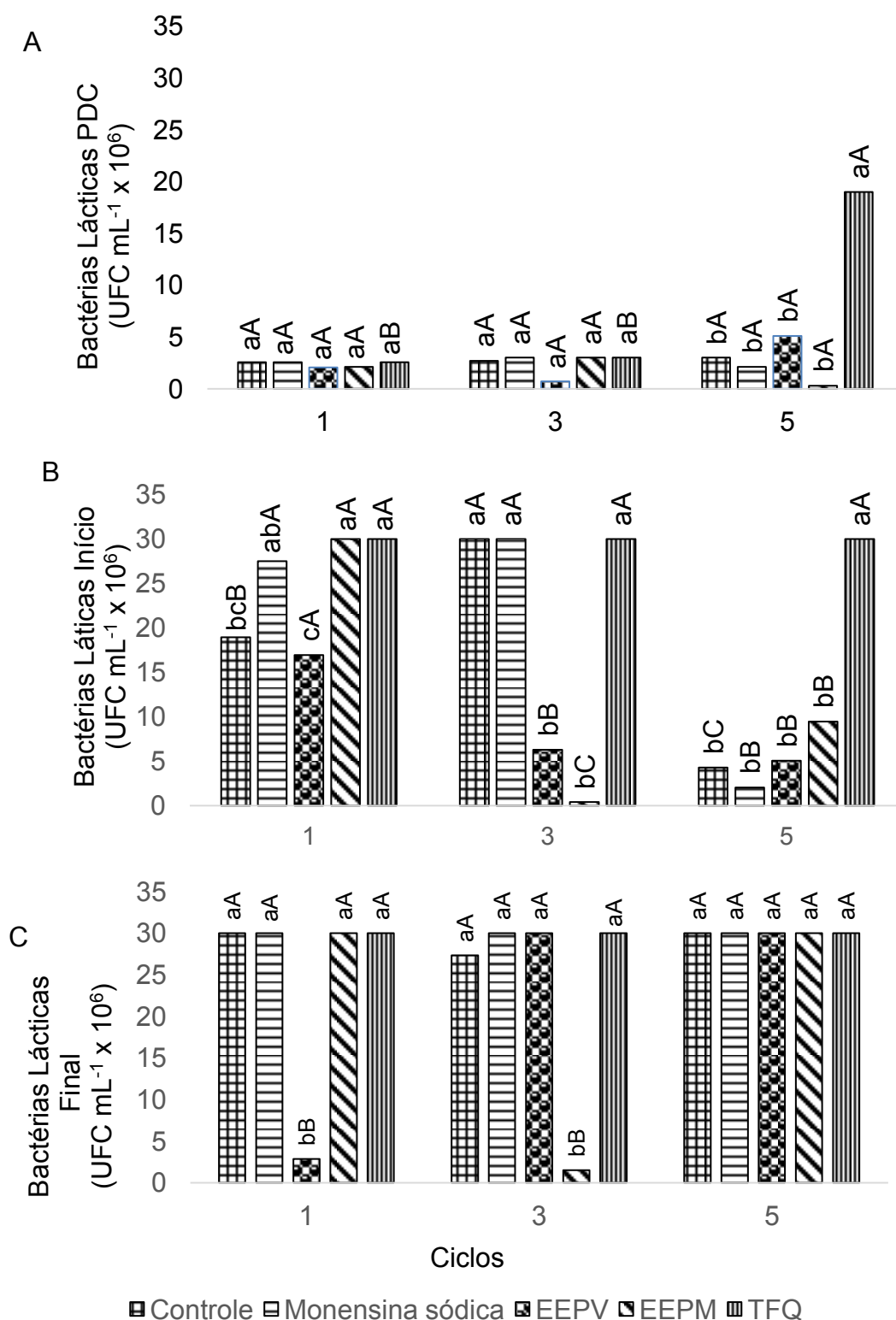


Figura 5: Desdobramento da interação entre biocidas e ciclos para contagem de bactérias lácticas em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) no A- Pé-de-Cuba (PDC); B-Início; C-Final da fermentação. Letras maiúsculas comparam médias entre ciclos com mesmo tratamento. Letras minúsculas comparam médias entre os tratamentos de cada ciclo.

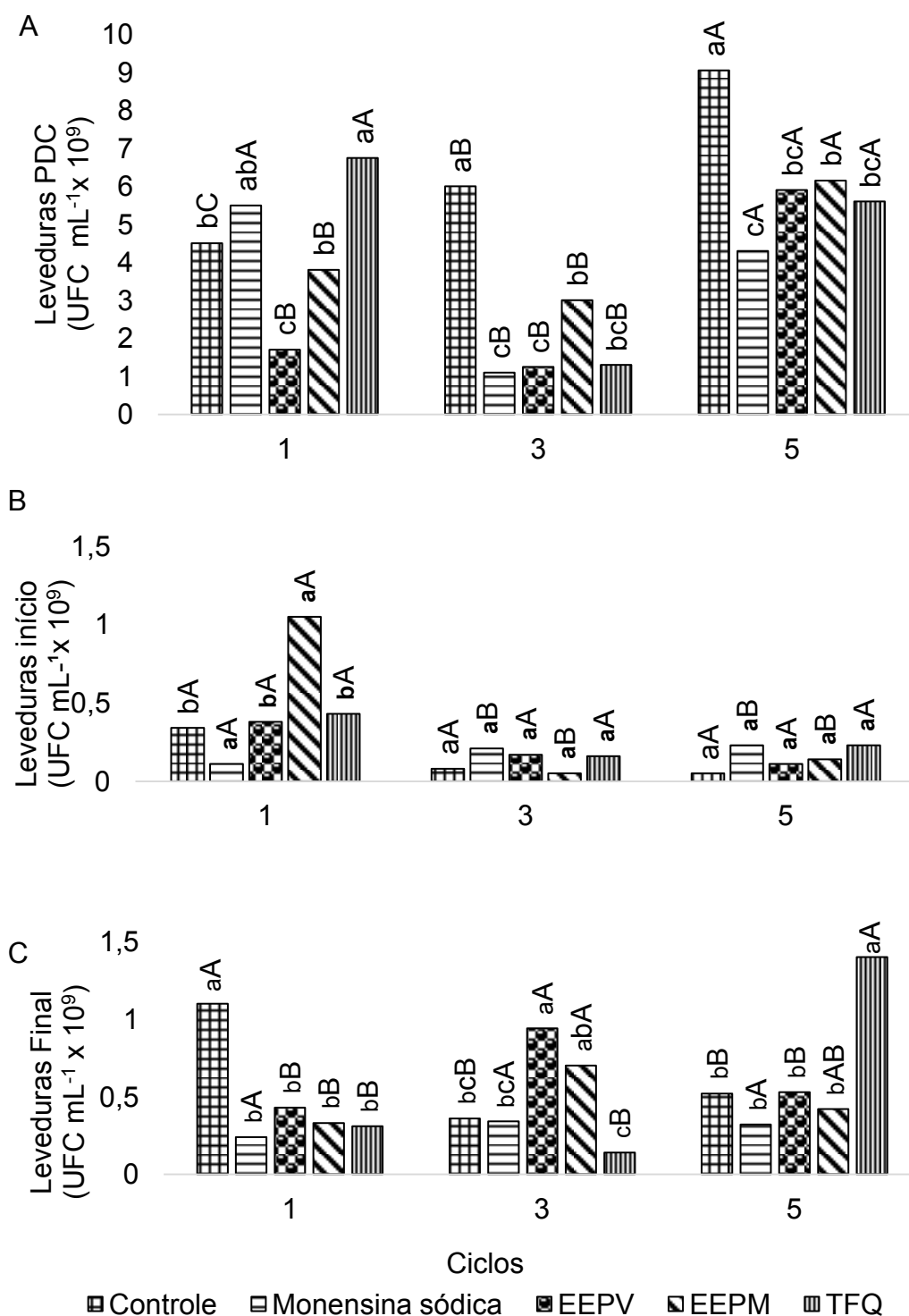


Figura 6: Desdobramento da interação entre biocidas e ciclos para contagem de leveduras em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) no A- Pé-de-Cuba (PDC); B- Início; C-Final da fermentação. Letras maiúsculas comparam médias entre ciclos com mesmo tratamento. Letras minúsculas comparam médias entre os tratamentos de cada ciclo.

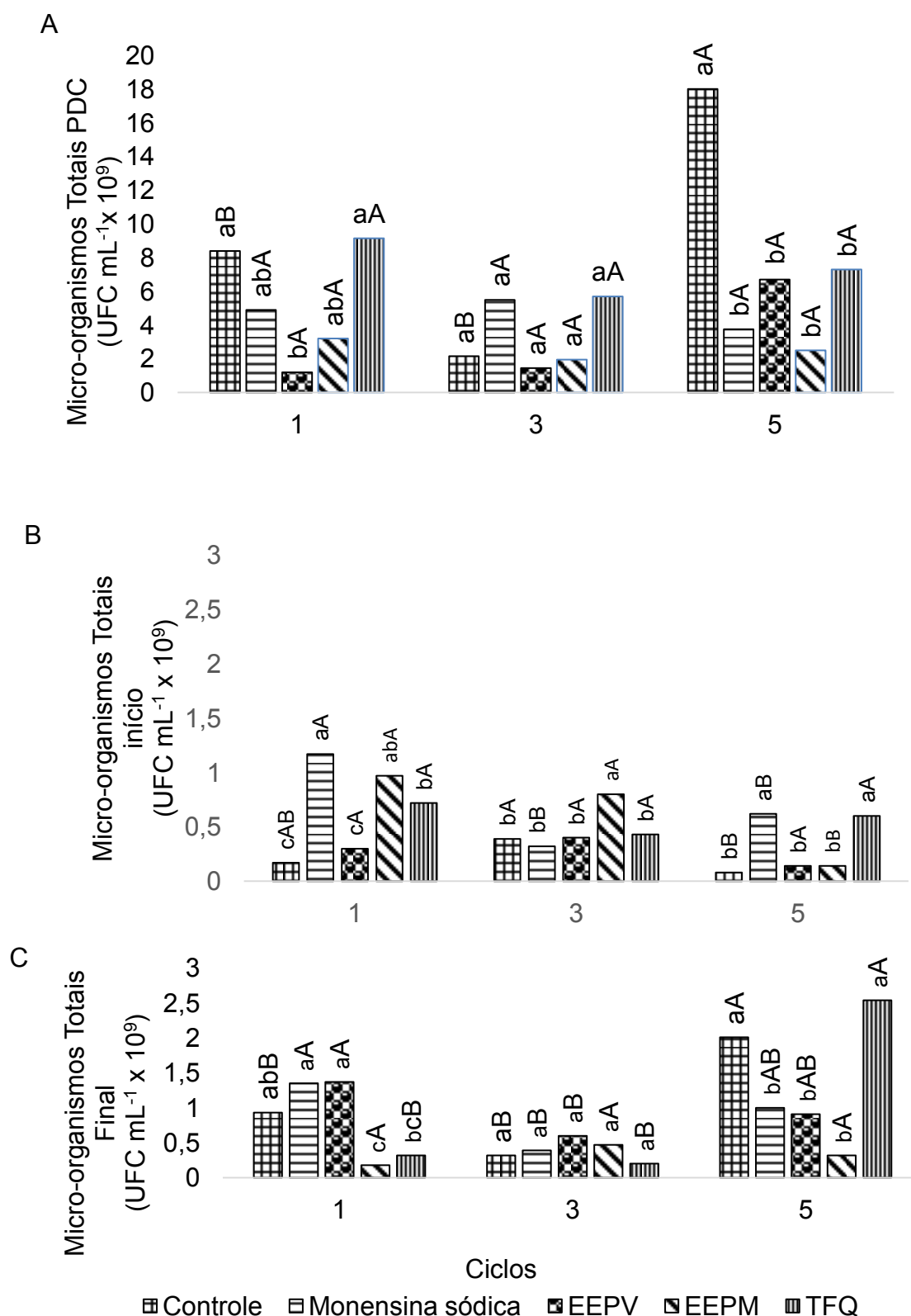


Figura 7: Desdobramento da interação entre biocidas e ciclos para contagem de micro-organismos totais em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) no A- Pé-de-Cuba (PDC); B-Início; C-Final da fermentação. Letras maiúsculas comparam médias entre ciclos com mesmo tratamento. Letras minúsculas comparam médias entre os tratamentos de cada ciclo.

4.7 Componentes secundários da cachaça

Os resultados para componentes secundários das cachaças estão apresentados na Tabela 8. Verificou-se ausência de acroleína e carbamato de etila nas amostras analisadas.

Para a acidez volátil, as cachaças provenientes dos tratamentos com EEPM, EEPV e monensina, apresentaram os menores valores em relação aos demais tratamentos, podendo atribuir este fato à baixa atividade bacteriana no meio, proporcionada pelo controle eficiente destes antimicrobianos.

Em relação ao acetato de etila, principal éster encontrado na cachaça, os maiores teores foram quantificados com a aplicação dos extratos de própolis verde e marrom. Este composto, quando presente em porções adequadas contribui de forma marcante para o aroma agradável de frutas na bebida. No entanto, de modo semelhante, os aldeídos, produtos considerados intermediários na formação dos ácidos ou alcoóis superiores, apresentaram concentrações que variaram de (22,0 e 18,00 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro). Resultados concordantes foram observados por Oliveira Filho (2010), em que para o tratamento em onde se empregou extrato de própolis verde foram produzidos maiores teores de acetaldeído ao longo dos ciclos fermentativos. Entretanto relativamente inferiores ao valor de 28,72 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro, apresentado por Alcarde, Monteiro e Belluco (2012), em aguardente bi-destilada, fermentada por levedura CA-11.

A menor concentração de metanol (3,6 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro), álcool particularmente indesejável na bebida, proveniente da atividade de enzimas pécicas, foi encontrada para o TFQ, valor próximo aos obtidos de Bregagnoli (2006) que variaram de (2 e 3 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro). Este resultado reforça a importância do preparo do caldo de cana, com sistemas de filtração e decantação, a fim de promover máxima remoção de bagacilhos e demais impurezas para compor o material a ser fermentado.

Os alcoóis superiores, em especial aqueles com até cinco átomos de carbono apresentam odores característicos, sendo compostos importantíssimos na definição

do sabor e do aroma de bebidas destiladas, destacando-se os álcoois amílico e propílico, e seus respectivos isômeros (LIMA, 2012 e MONTEIRO, 2010).

As cachaça para os diferentes tratamentos apresentaram concentração de álcool isoamílico entre 68,7 a 90,2 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro, o que representa 55,4% a 54,83% da fração dos alcoóis superiores. Considerado dentro do esperado, uma vez que segundo Cardoso (2013), entre os principais alcoóis superiores encontrados nas bebidas alcoólicas, o isoamílico é o principal álcool superior formado durante a fermentação e, pode perfazer 40-70% desse composto secundário. Entretanto foram valores em torno de 20% inferior aos 74,2% representados pela concentração de 141,31 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro, para o isoamílico segundo Alcarde, Monteiro e Belluco (2012), em aguardente bi-destilada, fermentada por levedura CA-11. Nesse mesmo contexto, os EEPs marrom e verde resultaram em maiores concentrações de álcool propílico, representando 27% do total de alcoóis superiores, frente aos 7,7% desses mesmos autores mencionados.

Os valores obtidos para n-butanol foram de 0,6 ±1 para todos os tratamentos, podendo dizer que os mesmos não influenciaram na concentração deste componente na bebida. Estes valores corroboram com aqueles apresentados por Bregagnoli (2006), (0,4 a 0,6 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro), os quais não diferiram entre os biocidas utilizados. Da análise dos alcoóis superiores, foram obtidos para o EEPV, EEPM teores de 164, 5, 152,1, respectivamente, sendo pouco superiores aos valores médios obtidos por Oliveira Filho (2010), de 150,0 e 123,0 mg 100 mL⁻¹ de álcool utilizando os mesmos tipos de extratos em 10 ciclos fermentativos.

Deve-se ressaltar que apesar da pequena variação nas concentrações dos componentes secundários avaliados entre os tratamentos utilizados, todos se mostraram com teores expressivamente abaixo dos limites permitidos pelo MAPA. Portanto, pode se dizer que é plenamente possível a produção de uma cachaça de excelência.

Tabela 8: Concentração de componentes secundários em amostras de cachaça produzidas com diferentes tratamentos.

Tratamentos	Acidez volátil (ácido acético)	Ésteres (acetato de etila)	Aldeído (acetaldeído)	Metanol	Isoamí -lico	Propí- lico	Isobutí -lico	**Álc. superiores	n- butanol	sec-butanol
(mg. 100 mL ⁻¹ de álcool anidro)										
Controle	15,0	15,0	17,4	5,2	88,5	36,0	30,1	155,4	0,6	1,7
Monensina										
sódica	13,0	13,8	14,1	4,2	77,8	35,4	28,0	141,2	0,6	1,6
EEPv	13,0	17,6	22,0	5,1	90,2	43,6	30,7	164,5	0,7	1,5
EEPM	11,5	17,3	18,5	4,8	82,1	42,0	28,8	152,1	0,6	1,5
TFQ	18,7	11,7	10,3	3,6	68,7	30,6	24,6	123,9	0,6	1,3
PADRÃO										
MAPA*	150,0	200,0	30,0	20,0		---		360,0	3,0	10,0

**Álcoois superiores: isobutílico + isoamílico + propílico

*MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. BRASIL (2005).

5. CONCLUSÕES

- Os extratos de própolis verde e marrom, e o tratamento físico-químico do caldo, foram efetivos no controle de contaminantes.
- A viabilidade celular durante todos os ciclos fermentativos foi superior a 85%.
- A *S. cerevisiae* CA-11 apresentou performance excelente para a produção de cachaça.
- A composição do destilado obtido apresentou baixos teores de componentes secundários caracterizando produto de qualidade.

6. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, F. M. **Processo de Fabricação de Açúcar**. 3 ed., UFPE: Recife, Brasil, 2011. 447 p.

ALCARDE, A. R.; MONTEIRO, B. M. S.; BELLUCO, A. E. S. Composição química de aguardentes de cana-de-açúcar fermentadas por diferentes cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 8, p. 1612-1618, 2012.

ALVARENGA, R. M. Avaliação de parâmetros da fermentação e da destilação para adequação dos teores de compostos secundários em aguardente de banana. 2011. 157 f. Tese (Doutorado Ciências de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Belo Horizonte, 2011.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; ALVES, D. G. **Processos de produção de álcool: controle e monitoramento**. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, 1996. 93 p.

AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. Infecção na fermentação: como evitá-la. *Álcool e Açúcar*, v. 2, n. 5, p. 12-18, 1982.

ANJOS, J. P. dos; CARDOSO, M. das G.; SCHWAN, R. F.; VIEIRA, J. P. F. Avaliação físico-química de cachaças produzidas com diferentes interações entre a levedura *S. cerevisiae* (CA 116) e bactérias. In: REUNIÃO ANIAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, [29., 2006, Águas de Lindóia. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2006]. Disponível em: <<http://sec.s bq.org.br/cdrom/30ra/resumos/T1700-1.pdf>>. Acesso em: 25 mai 2012.

ANTONANGELO, A. T. B. F.; ALONSO, D. P.; RIBOLLA, P.E. M.; COLOMBI, D. Microsatellite marker-based assessment of the biodiversity of native bioethanol yeast strains. **Yeast**, v. 30, p. 307–317, 2013. Disponível em: < doi: 10.1002/yea.2964> Acesso em 12 set. 2013.

ASSOCIACAO BRASILEIRA DE BEBIDA (ABRABE). **Destilados**. São Paulo, [2014?]. Disponível em: <<http://www.abrabe.org.br/categorias/>>. Acesso em: 30 abr. 2014.

ASSOCIAÇÃO MINEIRA DOS PRODUTORES DE CACHAÇA DE QUALIDADE (AMPAQ). Belo Horizonte, [2014?]. Disponível em: <http://www.ampaq.com.br/index.php?op=conteudo&id=128&pag=3&menuId=146>. Acesso em: 06 jun. 2014.

BALLI D, D.; FLARI, V.; SAKELLARAKI, V.; Schonja, M.; Iconomopoulou , M.; Bekatorou, A. Effect of yeast cell immobilization and temperature on glycerol content

in alcoholic fermentation with respect to wine making. *Process. Biochemistry*, v. 39, n. 4, p. 39:499-506, 2003. Disponível em: <DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00133-X>.

BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo. *Processo de produção de álcool: controle e monitoramento*. 2. ed. Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ, 1996. p. 38- 84.

BISPO JÚNIOR, W.; MIRANDA, E. A.; ALVINO, V.; ARAUJO, B.; SILVA, D. W., PORFIRIO, Z. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 3-10, 2012. Disponível em: <DOI: 10.5433/1679-0367.2012v33n1p03>.

BORTOLETTO, A. M. **Composição química de cachaça maturada com lascas tostadas de madeira de carvalho proveniente de diferentes florestas francesas**. 2013. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 jan. 2001. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/60/normas.htm>>. Acesso em: 24 jul. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 30 jun. 2005, Seção 1.

BERGAMO, A. R, URIBE, R. A. M. Desenvolvimento e otimização de produção de etanol por processo fermentativo com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* em substrato de melaço de cana-de-açúcar. In: VII WORKSHOP AGROENERGIA., 2013, Ribeirão Preto. Disponível em [http:// <http://www.infobibos.com/agroenergia/cd/Resumos/ResumoAgroenergia_2013_012.pdf>](http://www.infobibos.com/agroenergia/cd/Resumos/ResumoAgroenergia_2013_012.pdf). Acesso em 22 jan. 2014.

BREGAGNOLI, F. C. R. **Comportamento fisiológico de microrganismos submetidos a biocidas convencional e natural na produção de cachaça orgânica**. 2006. 80 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006.

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

CAETANO, A. C. G.; MADALENO, L. L. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. **Ciência e Tecnologia: FATEC-JB**, Jaboticabal, v. 2, n. 1, p. 27-37, 2011.

CAMPOS, C. R.; SILVA, C. F.; DIAS, D. R.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; SCHWAN, R. F. Features of *Saccharomyces cerevisiae* as a culture starter for the production of the distilled sugar cane beverage, cachaca in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v. 108, n. 6, p. 1871-1879, 2010.

CANUTO, M. H. **Influência de alguns parâmetros na produção de cachaça: linhagem de levedura, temperatura de fermentação e corte do destilado**. 2013. 119 f. Tese (Doutorado Ciências) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

CARDOSO, M. das G. **Produção de aguardente de cana**. 3. ed. Lavras: Editora UFLA, 2013. 340 p.

CARNEIRO, J. D. S. **Estudo dos fatores da embalagem e rótulo de cachaça no comportamento dos consumidores**. 2007. 125 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

CARUSO, M. S. F. Benzo(a)pireno, carbamato de etila e metanol em cachaças. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 9, p. 1973-1976, 2010.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, J. B. A. Cinética da fermentação e balanço de massa da produção de cachaça artesanal. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, p. 4-8, dez. 2008. VIIBMCFB. Disponível em: <<http://pt.slideshare.net/AndriaAnschau/19505534-cineticadafermentacaoebalancodemassadaproducaodecachacaartesanal>>. Acesso em: 06 jun. 2014

CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA (CTC). **Manual de métodos de análises para açúcar**. Piracicaba, 2005. 1 CD-ROM.

CLETO, F. V. G. **Ação da lecitina no processo fermentativo, rendimento e composição das aguardentes em mostos de cana-de-açúcar, laranja e uva**. 2000. 75 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2000.

CLETO, F. V. G. **Influência da adição de ácido sulfúrico e de fubá de milho no processo fermentativo, rendimento e composição da aguardente de cana**. 1997. 109 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 1997.

CLETO, F. V. G.; MUTTON, M. J. R. Influência de dois tipos de leveduras, do tratamento ácido e da adição do fubá de milho sobre o desenvolvimento do processo fermentativo e qualidade final do destilado. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 13 n. 3, p. 28-30, 1995.

COPERSUCAR. **Manual de controle químico da fermentação**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 1988. 46 p.

COSTA, G. H. G. **Emprego do extrato de moringa (*Moringa oleífera* Lamarck) na clarificação do caldo de cana para produção de açúcar**. 2013. 115 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

COSTA, H. G. C, MASSON, I. S, FREITA, L. A, ROVIEIRO, J. P. Use of Moringa Oleifera Lamarck Leaf Extract as Sugarcane Juice Clarifier: Reflects on Clarified Juice and Sugar. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 34, n.1, p. 204- 209, 2014.

DATO, M. C. F.; PIZAURO, 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**, Jaboticabal, v. 36, n. 1, p. 70-74, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822005000100014>>. Acesso em: 22 abr. 2012.

DOHERTY, W. O. S.; RACKEMANN, D. W. Some aspects of calcium phosphate chemistry in sugarcane clarification. **International Sugar Journal**, v.111, p. 448-455, 2009.

DORTA, C.; OLIVA NETO, P.; ABREU NETO, M. S.; NICOLAU JUNIOR, N.; NAGASHIMA, A. I. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 177–182, 2006. Disponível em: <DOI 10.1007/s11274-005-9016-1>. Acesso em: 12 mai. 2014.

FERRARI, F. C. S. **Fatores operacionais e cinética do processo fermentativo para otimização da produção de etanol**. 2014. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2014.

FOOD SURVEILLANCE SYSTEM (FSS). **Food sampling by district councils in Northern Ireland (2011)**. Northern Ireland, 2011. Disponível em: <www.derrycity.gov.uk/DerryCitySite/files/0e/0eae70b-0c9f-4acc-a08d-d8ae3356ec86.pdf>. Acesso em: 06 jun. 2014

FRANÇA, L. F. S.; OLIVEIRA, F. M.; FRANÇA-JÚNIOR.; GUIMARÃES-FILHO, O.; MEIRELES, W. A. Representação matemática da correlação entre acidez total no “vinho” e acidez volátil na cachaça. **Revista Agroambiental**, 2010.

FREITAS, A. S.; BARTH, O. M.; LUZ, C. F. P. Própolis marrom da vertente atlântica do Estado do Rio de Janeiro, Brasil: uma avaliação palinológica. **Revista Brasileira de Botânica**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 2, p. 343-354, 2010.

GHASI, S.; NWOBODO, E.; OFILI, J. O. Hypcholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet fed wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 21-25, 2000. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00106-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00106-3)>. Acesso em: 5 mai. 2013.

GOMES, F. C. O.; SILVA, C. L. S.; VIANNA, C. R.; LACERDA, I. C. A.; BORELLI, B. M.; NUNES, A. C.; FRANCO, G. R.; MOURÃO, M. M.; ROSA, C. A. Identification of lactic acid bacteria associated with traditional cachaça fermentations. **Brazilian Journal of Microbiology**, Belo Horizonte, v. 41, n. 2, p. 486-492, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822010000200031>>. Acesso em: 22 abr. 2013.

HALABI, A. F. **Efeito do extrato de própolis sobre a composição e a qualidade do destilado alcoólico**. 2010. 74 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2010.

INGLEDEW, W. M. Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer, in the alcohol textbook. 3. ed. UK: Nottingham University Press, 1999.

INSTITUTO DE PROMOÇÃO DO DESENVOLVIMENTO (IPD). **Organics Brasil**. Curitiba, [2014?]. Disponível em: <<http://www.organicsbrasil.org/dnfile/vsgcv8s1d8gjgb3iqvuy/pdf/downloads/0/arquivo-vsgcv8s1d8gjgb3iqvuy.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2014.

LANE, J. H.; EYNON, L. Detemination of reducing sugars by fehling solution with methylene blue indicator. **Journal of the Society of Chemistry Industry**, London, v. 42, n. 6, p. 32-37, 1934.

LÉAUTÉ, R. Distillation in alembic. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 41, p. 90-103, 1990.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WONG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and bioengineering symposium**, Hoboken, v. 11, 1981.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biotechnologia industrial**: processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

LIMA, L. M. Z. **Influência da luz na composição fenólica, atividade antioxidante e concentração de carbamato de etila em aguardentes de cana/ cachaças envelhecidas em diferentes madeiras**. 2012. 219 f. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

- LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; NETO-PEDRO, J. R. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.18, n. 3, p. 447-454, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000300020>>. Acesso em: 22 abr. 2013.
- 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.
- MAIORELLA, B.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, n.1, p.103-121, 1983.
- MAN, J. D.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v. 23, n. 1, p. 130-135, 1960.
- MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 5, p. 529-535, 1996.
- MELLO, B. C. B. S.; PETRUS, J. C. C; HUBINGER, M. D. Desempenho do processo de concentração de extratos de própolis por nanofiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 166-172, jan.-mar. 2010.
- MENDES, T. A. O.; MENDES, L. M. P. S. O.; MALTA, H. L.; OLIVEIRA, E. S. Aumento na produção de biomassa de levedura em propagador aerado por processo descontínuo e semicontínuo para produção de cachaça. **Brazilian Journal Food Technology, Campinas**, v. 16, n. 2, p. 81-89, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1981-67232013005000012>>. Acesso em: 18 abr. 2013.
- MONTEIRO, B. M. S. **Composição química de aguardentes de cana-de-açúcar obtidas por fermentação com diferentes cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae***. 2010. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.
- MUTTON, M. J. R. **Avaliação da fermentação etanólica do caldo de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) tratadas com maturadores químicos**. 1998, 178 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 1998.
- MUTTON, M. J. R; MUTTON, M. A. Aguardente de cana. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Coord.). **Bebidas alcóolicas: ciência e tecnologia**. São Paulo: Editora Blucher, 2010. 461 p.
- MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. Maturadores químicos em cana-de-açúcar: III Efeitos na fermentação etanólica e microbiota do mosto. In: CONGRESSO

NACIONAL DA STAB, 8., 2002, Recife. **Anais...** Piracicaba: STAB, 2002. p. 452-457.

NOBRE, T. P.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 20-25, jan./mar. 2007.

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

OLIVEIRA, A. M. L. **O processo de produção da cachaça artesanal e sua importância comercial**. 2010. 55 f. Monografia (Especialização em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

OLIVEIRA FILHO, J. H. **Atividade antimicrobiana de própolis sobre contaminantes da fermentação alcoólica destinada a produção de cachaça**. 2010. 63 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2010.

OLIVEIRA FREGUGLIA, R. M.; HORII, J. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura mista com *Lactobacillus fermentum*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, n. 3, p. 520-827, 1998. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90161998000300022>>. Acesso em: 22 abr. 2012.

OLIVEIRA, M. C. F.; PAGNOCA, F. C. Aplicabilidade de meios seletivos empregados nas indústrias de cervejarias à detecção de leveduras selvagens em unidades sucro-alcooleiras. In: VII Sinaferm. 1988. **Anais**. São Lourenço-MG, p.78-81.

PEREIRA, A. F. Suplementação de nitrogênio sobre a fermentação alcoólica para produção de cachaça, cerveja e vinho. 2007. 113 f. Dissertação (*Magister Scientiae*) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas respectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

QUÍMICA REAL. **Produtos**. Belo Horizonte, [2013?] Disponível em <<http://www.quimicareal.com.br/index.php/pt-br/produtos/72-kamoran>>. Acesso em: 5 dez. 2013.

RAVANELI, GC, MADALENO, L. L, PRESOTTI, LE, MUTTON, MA.; MUTTON, MJR (2006). Spittlebug infestation in sugarcane affects ethanolic fermentation. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n.6, p. 543-546. Disponível em< <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162006000600004>>.

RIBEIRO, C. A. F.; HORII, J. Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana. **Scientia Agrícola**, v. 56, p. 255-263, 1999.

RIPOLI, T. C. C; RIPOLI, M. L. C. **Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente**. 2. ed. Piracicaba: Ed. dos Autores, 2009.

RODRIGUES, L. M.; DANTAS, R.; FINZER, J. R. D. Utilização de produto natural durante a fermentação alcoólica visando uma produção que se enquadre nos parâmetros de atividade sustentável. **FAZU em Revista**, Uberaba, n. 6, p. 53-82, 2009. Disponível em:

<http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCcQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.fazu.br%2Fojs%2Findex.php%2Ffazuemrevista%2Farticle%2Fdownload%2F21%2F15&ei=3ziSU5KqB4u9kAXhg4DoBQ&usg=AFQjCNH-I10N_9zs8vJ3ak6t-s727qO9Nw&sig2=7enJaCdUv-Fqz_lqXgAdvw&bvm=bv.68445247,d.dGI&cad=rja>. Acesso em: 06 jun. 2014.

SANTOS JUNIOR, J. J. Identificação de bactérias presentes na fermentação alcoólica para produção de aguardente. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS, 5.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS, 6., 1998, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: [s.n.], 1998.

SANTOS, T. M. **Avaliação da influência de bactérias lácticas isoladas da região de salinas/mg, em fermentações consorciadas com leveduras selecionadas, na composição físico-química e sensorial de cachaças**. 2013. 119 f. Tese (Doutorado Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

SANTOS, V. R. **Efeito da adição de açúcar na qualidade sensorial de amostras de cachaça obtida tradicionalmente e redestilada**. 2010. 70 f. Dissertação (Mestrado Ciência de Alimentos) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2010.

SEGATO, S. V.; PINTO, A. S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J. C. M. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2006.

SCHENBERG, A. C. G. Biotecnologia e desenvolvimento sustentável. **Estudos avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 7-17, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142010000300002>>. Acesso em: 19 mar. 2012.

SERAFIM, F. A. T.; BUCHVISER, S. F.; GALINARO, C. A.; FRANCO, D. W.; NOVAES, F. V. **Ácidos orgânicos em aguardentes produzidas em alambique e em coluna**, **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 28-32, 2011.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. (SEBRAE). **Processo produtivo de cachaça**. [S.l.], 2014. Disponível em:

<<http://www.sebraemg.com.br/atendimento/bibliotecadigital/documento/Cartilha-Manual-ou-Livro/Ideias-de-Negocio-para-2014>>. Acesso em: 06 jun. 2014

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, Botucatu, v. 133, n. 2, p. 253-260, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.032>>. Acesso em: 25 maio 2012

SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal components analysis in the software assistat-statistical attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7., 2009, Reno, NV. **Proceedings...** St. Joseph: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SOARES, T. L.; SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F. Acompanhamento do processo de fermentação para produção de cachaça através de métodos microbiológicos e físico-químicos com diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 1, p. 184-187, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612011000100027>>.

STUPIELLO, J. P. Produção de aguardente: qualidade da matéria-prima. In: MUTTON, M. J. R., MUTTON, M. A. **Aguardente de cana produção e qualidade**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. p. 9-21.

U.S. Food and Drug Administration. **Bacteriological analytical manual**. 8 ed. AOAC International. Gaithersburg, Maryland. 1995.

URBANO, L. H. **Fermentação etanólica em mostos de hidrolisados de amido de mandioca**. 2012. 78 f. Dissertação (Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2010.

VALSECHI, O. **Aguardente de cana-de-açúcar**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1960.120 p.

VASCONCELOS, Y. Fermentação vantajosa: uso de novas linhagens de levedura para produzir custo de produção das usinas de açúcar e álcool. Pesquisa FAPESP, São Paulo, n. 135, p. 67-69, maio 2007. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2007/05/66-69-fermentacao-135.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 2014.

VENTURI FILHO, W. G.; NOGUEIRA, A. M. P. **Aguardente e cachaça**. - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2013.

VILELA, A. F. **Estudo da adequação de critérios de Boas práticas de fabricação na Avaliação de fábricas de cachaça de Alambique**. 2005. 96 f. Dissertação (Ciência de Alimentos)- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

WANG, Z. X.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B. A. Glycerol production by microbial fermentation: a review. *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 201-223, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750\(01\)00060-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750(01)00060-X)>. Acesso em: 24 abr. 2013.

APÊNDICE

Quadro 1: Valores médios obtidos para viabilidade celular e brotamento no pé-de-cuba do processo fermentativo, durante 5 ciclos. Jaboticabal-SP, Safra 2013/2014.

	Viabilidade Celular (%)	Brotamento (%)
Tratamentos (B)		
Controle	91,23 A	20,47 A
Monensina sódica	90,42 A	22,00 A
EEPV	89,13 A	17,59 A
EETM	90,06 A	18,26 A
TFQ	88,79 A	17,94 A
Teste F	0,54 ns	0,63 ns
DMS	6,24	11,17
CV	5,76	48,21
Ciclos (C)		
1	90,89 A	17,59 A
2	89,71 A	22,98 A
3	88,42 A	17,21 A
4	89,78 A	17,02 A
5	90,82 A	21,45 A
Teste F	0,94 ns	1,42 ns
DMS	4,21	9,37
CV	4,49	46,64
Interação BxC	0,84 ns	0,72 ns

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); ns=não significativo; CV = Coeficiente de variação em % ; DMS = Diferença mínima significativa. Letras maiúsculas comparam valores na coluna.

Quadro 2: Resultados obtidos para o teor alcoólico do vinho nos diferentes tratamentos.

	Teor Alcoólico (%)
Tratamentos (B)	
Controle	7,03 A
Monensina sódica	6,83 A
EEPV	6,77 A
EEPM	6,17 A
TFQ	6,10 A
Teste F	2,78 ns
DMS	1,17
CV	6,64

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 < p < 0,05$); ns=não significativo; CV = Coeficiente de variação em % ; DMS = Diferença mínima significativa. Letras maiúsculas comparam valores na coluna.

Quadro 3: Valores médios obtidos para o número de colônias em placas para bactérias lácticas (MRS⁺), micro-organismos totais (PCA) e leveduras (WLN⁺) no pé-de-cuba do processo fermentativo, durante os ciclos 1, 3 e 5. Jaboticabal-SP, Safra 2013/2014.

	Bactérias Lácticas (UFC mL ⁻¹ x 10 ⁶)	Micro-organismos Totais (UFC mL ⁻¹ x 10 ⁹)	Leveduras (UFC mL ⁻¹ x 10 ⁹)
Tratamentos (B)			
Controle	2,75 Ab	9,85 A	6,52 A
Monensina sódica	2,55 B	4,72 B	3,63 BC
EEPV	2,62 B	3,11 B	2,95 C
EEPM	1,73 B	2,55 B	4,32 BC
TFQ	9,35 A	7,38 AB	4,55 B
Teste F	6,89 *	12,7051 **	29,13**
DMS	6,72	4,84	1,401
CV	76,82	38,08	13,86
Ciclos (C)			
1	2,36 B	5,37AB	4,45 B
3	2,48 B	3,35 B	2,53 C
5	6,56 A	7,85 A	6,20 A
Teste F	8,00 **	8,59**	118,37 **
DMS	3,28	2,98	0,65
CV	70,31	44,02	12,14
Interação BxC	7,61 **	5,15 **	19,69 **

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 < p < 0,05$); ns=não significativo; CV = Coeficiente de variação em % ; DMS = Diferença mínima significativa. Letras maiúsculas comparam valores na coluna.

Quadro 4: Valores médios obtidos para o número de colônias em placas para bactérias lácticas (MRS⁺), micro-organismos totais (PCA) e leveduras (WLN⁺) no início do processo fermentativo, nos ciclos 1, 3 e 5. Jaboticabal-SP, Safra 2013/2014.

	Bactérias Lácticas (UFC mL ⁻¹ x 10 ⁶)	Micro-organismos Totais (UFC mL ⁻¹ x 10 ⁹)	Leveduras (UFC mL ⁻¹ x 10 ⁹)
Tratamentos (B)			
Controle	17,75 B	0,20 B	0,17 A
Monensina sódica	19,85 B	0,71 A	0,52 A
EEPV	9,43 C	0,28 B	0,22 A
EETM	13,29 BC	0,64 A	0,42 A
TFQ	30,00 A	0,58 A	0,28 A
Teste F	36,90 **	23,17 **	3,48 ns
DMS	7,23	0,26	0,43
CV	17,40	23,90	59,93
Ciclos (C)			
1	24,68 A	0,66 A	0,66 A
3	19,34 B	0,46 B	0,13 B
5	10,17 C	0,31 C	0,15 B
Teste F	51,37**	24,70 **	34,26 **
DMS	3,97	0,14	0,19
CV	17,92	23,72	50,48
Interação BxC	19,49 **	10,82 **	3,49 *

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 < p < 0,05$); ns=não significativo; CV = Coeficiente de variação em % ; DMS = Diferença mínima significativa. Letras maiúsculas comparam valores na coluna.

Quadro 5: Valores médios obtidos para o número de colônias em placas para bactérias lácticas (MRS⁺), micro-organismos totais (PCA) e leveduras (WLN⁺) no final do processo fermentativo, durante os ciclos 1, 3 e 5. Jaboticabal-SP, Safra 2013/2014.

	Bactérias Lácticas (UFC mL ⁻¹ x 10 ⁶)	Micro-organismos Totais (UFC mL ⁻¹ x 10 ⁹)	Leveduras (UFC mL ⁻¹ x 10 ⁹)
Tratamentos (B)			
Controle	29,11 A	1,09 A	0,66 A
Monensina sódica	30,00 A	0,91 A	0,30 A
EEPV	20,95 B	0,96 A	0,64 A
EEPM	20,50 B	0,33 B	0,49 A
TFQ	30,00 A	1,02 A	0,68 A
Teste F	155,09 **	17,77 **	4,37 ns
DMS	2,23	0,40	0,43
CV	3,72	20,63	33,82
Ciclos (C)			
1	24,57 B	0,83 B	0,48 B
3	23,77 B	0,39 c	0,50 B
5	30,00 A	1,36 A	0,67 A
Teste F	121,97 **	33,77 **	6,50 *
DMS	1,19	0,32	0,16
CV	3,72	30,45	23,64
Interação BxC	244,88 **	12,45 **	23,86 **

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 < p < 0,05$); ns=não significativo; CV= Coeficiente de variação em % ; DMS = Diferença mínima significativa. Letras maiúsculas comparam valores na coluna.