

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

QUALIDADE DA MATÉRIA-PRIMA, MICROBIOTA
FERMENTATIVA E PRODUÇÃO DE ETANOL SOB ATAQUE DE
Mahanarva fimbriolata EM CANA-DE-AÇÚCAR.

Gisele Cristina Ravaneli
Engenheira Agrônoma

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro – 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

QUALIDADE DA MATÉRIA-PRIMA, MICROBIOTA
FERMENTATIVA E PRODUÇÃO DE ETANOL SOB ATAQUE DE
Mahanarva fimbriolata EM CANA-DE-AÇÚCAR.

Gisele Cristina Ravaneli

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton

Co-Orientador: Prof. Dr. José Paulo Stupiello

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2010

R252q Ravaneli, Gisele Cristina
Qualidade da matéria-prima, microbiota fermentativa e produção de etanol sob ataque de *Mahanarva fimbriolata* em cana-de-açúcar-
Gisele Cristina Ravaneli. – Jaboticabal, 2010.
iii, 90f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010.

Orientador: Márcia Justino Rossini Mutton

Co-Orientador: José Paulo Stupiello

Banca examinadora: Marco Antonio Castro e Souza, Octávio Antonio Valsechi, Ailton Antônio Casagrande e Odair Aparecido Fernandes

Bibliografia

1. *Saccharum* spp. 2. Cigarrinha-das-raízes. 3. Cana-de-Açúcar – fermentação. 4. Etanol - produção

Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.7:663.61

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

GISELE CRISTINA RAVANELI – nasceu aos 29 de janeiro de 1979, na cidade de Ribeirão Preto, estado de São Paulo. Em março de 1999 ingressou no curso de Agronomia da Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, recebendo o título de Engenheira Agrônoma em janeiro de 2004. Ingressou no curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia (Microbiologia Agropecuária) da FCAV – UNESP em março do mesmo ano, e obteve o título de mestre em Microbiologia (Microbiologia Agropecuária) em dezembro de 2005. Em março de 2006 ingressou no curso de Doutorado no mesmo Programa de Pós-Graduação, obtendo o título de Doutora em fevereiro de 2010.

“O limite do homem é o limite dos seus sonhos.”

(John Kennedy)

Aos meus pais João e Zilda,

Pelo infinito esforço para me proporcionar muito mais do que tiveram;

E fizeram de meus sonhos os seus. E me ensinaram a abraçar todas as oportunidades e valorizar todas as conquistas, sem perder a humildade.

Obrigada pelo incentivo, conselhos, compreensão e amor incondicional.

Ao meu irmão Paulo

Pela amizade, carinho, apoio e confiança.

Pela união em todos os momentos.

*“As palavras são anões; os exemplos são gigantes”
(Provérbio suíço)*

Ao meu amado marido Eduardo,

Por ter me escolhido para compartilhar a vida, e me fazer tão feliz

Por sua coragem e determinação, e apoio em todos os momentos

Por nosso amor, nossa história, nossos sonhos...

Pelo presente e pelo futuro que nos espera.

“O amor é quando a gente mora um no outro” (Mário Quintana)

Dedico

Aos meus cunhados Mariana, Alexandre e Arthur

Meus queridos irmãos, pelo apoio e carinho infinitos.

Aos meus tios Vitorio e Sônia, Marcus e Ana,

Isabel e Luis, às minhas avós Celina e Leonor e aos meus primos

Pelo carinho e apoio.

Às "Doutoras" Maria Lidia Marcolino (in memoriam) e

Marineide Justino Rossini (in memoriam)

Pelas grandes lições de vida.

"Cada pessoa que passa na nossa vida, passa sozinha, porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa pela nossa vida passa sozinha, mas não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso."

(Charles Chaplin)

Ofereço

*À família Rossini e agregados,
Que sempre me acolheu. Pela alegria
e união em todos os momentos.*

*Aos mestres Profa. Márcia Justino Rossini Mutton e
Prof. Dr. Miguel Angelo Mutton*

*Pelo exemplo de profissionalismo e caráter. Pela confiança
em mim depositada. Por me ensinar muito além do que
constam nos livros.*

*"Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes."
(Isaac Newton)*

*À doce Can Can,
Por trazer alegria em minha vida e me fazer
sentir especial, mesmo nos piores dias.*

Ofereço

AGRADECIMENTOS

- A Deus, inteligência suprema, causa primeira de todas as coisas. Aos anjos e pastores iluminados do céu, por guiarem meus passos.
- À toda minha família, por entender minhas constantes ausências, e pelo carinho.
- Ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária da FCAV/UNESP, por proporcionar a realização do doutorado.
- À FAPESP (Processos 2006/03005-0 e 2006/03006-6) pelo auxílio financeiro e bolsa de estudo concedida.
- À Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton, pelos anos de convivência, pelos muitos ensinamentos, confiança, amizade e oportunidades.
- Ao Prof. Dr. Miguel Angelo Mutton, pelos valiosos conselhos, atenção e zelo.
- Ao Prof. Dr. José Paulo Stupiello, pelos muitos ensinamentos que jamais serão esquecidos.
- À Louis Dreyfus Commodities Bioenergia – Usina São Carlos, por ceder a área experimental e proporcionar todas as condições para a realização desse ensaio.
- Aos meus grandes companheiros Leonardo, Cidinha e Débora, por toda a convivência e amizade verdadeira. Vocês são inesquecíveis!
- À “velha guarda” do laboratório, Eduardo Rossini, Débora, Cidinha, Leonardo, Eduardo Tiraboschi, Neto, Kelly, Mariana, Vitor, Ricardo, Miriam, Maira, Ana, Henrique, Cintia, Lidiane, José, Camila pela valiosíssima ajuda na condução do experimento e pela grande amizade. Aos “mais velhos ainda” Thaís, Fabiano, Gustavo, Jaku, Marco, Marisol, Kaspá, David, Bruna, Álvaro, Pablo, Fernanda, Munira, Paula, Garça, Leandro, Diane, Flávia, Geancarlo, Maionese, pela agradável convivência e amizade. Aos “novatos” Aline Halabi, Tatiane, Juliana, Gustavo, Danielle, Aline, Igor, Leandro, Rafael, Humberto, Raul, Ruan e Flávio, por tornarem os intensos dias de trabalho mais leves...
- Ao “mestre” Sérgio Nobokuni pelos anos de convivência e amizade.

- À Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro, pela amizade, paciência e ajuda em vários momentos. Às meninas do LBM Karina, Daniele, Gisele, Flávia, Renata e Juliana, pela grande ajuda com as análises moleculares.

-À Profa.Dra. Eliana G. Macedo Lemos, pela disponibilização do seu laboratório. Ao João Carlos, Douglas e Viviane, do LBMP por tantas vezes me socorrerem em momentos desesperadores, e pela valiosa ajuda.

-Ao Prof. Dr. Antonio Nader Filho, pela disponibilização do equipamento de eletroforese de campo pulsado. Às meninas do LEM Sandrinha, Viviane, Bel e Poliana, pela agradável convivência e apoio durante as análises moleculares.

-Ao Gilberto Vinicius de Melo Pereira e à Profa. Dra. Rosane Schwan, pelo auxílio com o protocolo de eletroforese de campo pulsado.

-À Usina Santa Adélia, pelo apoio na realização das análises de teor alcoólico dos vinhos.

-Ao Prof. Dr. Aílto Antonio Casagrande, por toda a atenção e conhecimento transmitido ao longo de minha formação.

-Ao Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes, por sua simpatia e atenção sempre.

-Ao Dr. Marco Antonio Castro e Souza, por sua atenção e contribuições.

-Ao Prof. Dr. Vico, pelo carinho, atenção e sugestões que certamente melhoraram o trabalho.

-Ao Dr. Antônio Carlos Monteiro e Dra. Lúcia Maria C. Alves pelas contribuições.

- Ao Prof. Dr. João M. Pizauro Junior, pela paciência e atenção com as análises enzimáticas.

- Aos funcionários do Dep. de Tecnologia Renata, Bete, Andréia, Vlad, Dirce Renata, João Carlos, José Carlos e D. Maria, pela agradável convivência e amizade.

-À “mãe” Tânia Lima e seu grande abraço, essencial para recarregar as energias.

-À Fátima Harnich, pela amizade, conselhos e agradável convivência.

-Aos amigos Claudine de Bona, Arlei Prado, Jorge da Silva, Denise Rossi, Pedro Rossi Silva, Rafael Rossi Silva, Gabriel Rossi Silva, Marcelo Silva e Marina Caputo pelo clima familiar, apoio e amizade.

-Aos amigos da Texas A&M e Citrus Center, Dr. Elieser Lousada, Hilda Sonia Del Rio, Francesco Margara, Marco Piñeda e Armando Lários, pelo acolhimento e ensinamentos.

- Aos meus grandes amigos Renata Leal, Leonardo Madaleno, Lucas Codognotto, Diane Téó de Moraes, Flávia Cecílio Ribeiro, Débora Garcia, Maria Aparecida de O. Faria, Mariana Bonadio, Tatiane Lozano, Aline Halabi e Cintia Rodrigues, verdadeiras preciosidades em minha vida, que mesmo às vezes distantes, sempre se fizeram presentes. ***“Amigo é a luz que não deixa a vida escurecer”.***

-Às meninas da seção de Pós-Graduação pela atenção ao longo do curso.

-A todos que direta ou indiretamente participaram desse trabalho e de minha formação. Muito obrigada!!!!!!!!!!!!

“Pedras no caminho?

Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

(Fernando Pessoa)

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ii
SUMMARY.....	iii
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	2
Cigarrinha-das-raízes	2
Qualidade da matéria- prima.....	3
Fermentação etanólica e microbiota fermentativa.....	5
Identificação de leveduras no processo fermentativo.....	8
MATERIAL E MÉTODOS.....	11
Instalação e condução do experimento.....	11
Tratamentos.....	12
Delineamento experimental.....	13
Coleta dos colmos e extração do caldo.....	13
Avaliação das características tecnológicas do caldo.....	14
Caracterização da deterioração microbiológica.....	14
Cálculos tecnológicos.....	14
Preparo do mosto.....	14
Condução do processo fermentativo.....	15
Avaliação das leveduras no processo fermentativo.....	16
Análises microbiológicas.....	16
Isolamento e seleção de leveduras.....	17
Análise da estabilidade das leveduras.....	17
Eletroforese de campo pulsado.....	18
Análise isoenzimática.....	19
Destilação do vinho e determinação dos componentes do destilado.....	20
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
Qualidade da matéria-prima.....	21
Avaliação do mosto e do processo fermentativo.....	29
Comportamento microbiológico.....	30
Características dos microrganismos presentes nas fermentações.....	44
Avaliação da estabilidade das leveduras no processo fermentativo.....	46
Avaliação do vinho e destilado.....	55
CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS.....	70
APÊNDICE.....	80

QUALIDADE DA MATÉRIA-PRIMA, MICROBIOTA FERMENTATIVA E PRODUÇÃO DE ETANOL SOB ATAQUE DE *Mahanarva fimbriolata* EM CANA-DE-AÇÚCAR.

RESUMO - A cigarrinha-das-raízes tornou-se importante praga da cana-de-açúcar na região Centro-Sul do Brasil devido à expansão das áreas de colheita de cana sem queima, que deixa sobre o solo uma camada de palha que proporciona condições ideais para a sobrevivência das ninfas. Pesquisas recentes indicam que a praga pode causar perdas de produção e reduzir a qualidade tecnológica da matéria-prima destinada ao processamento industrial. A presente pesquisa tem como objetivo estudar a influência dos danos promovidos pela cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar sobre a qualidade da matéria-prima destinada ao processamento, estabilidade das leveduras, desempenho fermentativo, e produção de etanol. Verificou-se que o ataque da praga interfere negativamente na qualidade da matéria-prima, reduzindo a Pol e os Açúcares Redutores Totais do caldo e aumentando a acidez total, volátil, ácido lático e os compostos fenólicos totais do caldo. Também constatou-se que o processo de clarificação do caldo não remove totalmente os compostos fenólicos. Observou-se interferência do ataque da praga sobre a microbiota presente no processo fermentativo, com reduções significativas na viabilidade celular e de brotos e no índice de brotamento das leveduras, e aumento da contaminação bacteriana, resultando em vinhos com menores teores alcoólicos e menor eficiência da fermentação.

PALAVRAS-CHAVE: *Saccharum* spp, cigarrinha-das-raízes, processo fermentativo, produção de etanol.

CANE QUALITY, FERMENTATIVE MICROBIOTA AND ETHANOL PRODUCTION UNDER *Mahanarva fimbriolata* ATTACK.

SUMMARY – Spittlebug has become a key pest of sugarcane in Brazil because the moisture and temperature conditions provided by the litter left on the field after harvesting without previous burn are favorable to the development of pest nymphs. Recent studies indicate that pest attack cause yield losses and reduces cane quality and industrial processing. This research was conducted to determine the effects of *M. fimbriolata* damage levels in sugarcane on cane quality, yeast stability, fermentative process and ethanol production. Spittlebug attack negatively affected cane quality, Sucrose content, Total Reducing Sugars and juice purity were lower and total, volatile acidity and lactic acid contents and phenolic compounds were higher at higher damage levels. Also, we observed that the clarification process does not remove totally phenolic compounds of juice. Pest attack also affected microorganisms in fermentation process, reducing yeasts cell and bud viability. There was an increase in bacterial contamination, resulting in wines with lower alcohol content and fermentation efficiency.

KEY WORDS: *Saccharum* spp, spittlebug, fermentation process, ethanol production.

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar ocupa cerca de 7 milhões de hectares ou 2% de toda a terra arável do Brasil, que destaca-se como o maior produtor mundial (UNICA, 2009), sendo cultivada como matéria-prima para diversos produtos, destacando-se o etanol, cuja importância vem aumentando nos últimos anos, por ser um combustível renovável, menos poluente que os derivados de petróleo e de custo relativamente baixo.

A fermentação é uma das principais etapas da produção desse álcool, na qual as leveduras transformam os açúcares presentes no substrato em etanol, gás carbônico, glicerol, biomassa e componentes secundários. Esse processo pode ser influenciado por diversos fatores, dentre eles a qualidade da matéria-prima, que engloba parâmetros como variedades, condições ambientais e de cultivo, grau de maturação da cultura e incidência de pragas e doenças.

A cigarrinha-das-raízes, *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) tornou-se praga-chave na cultura da cana-de-açúcar com a adoção da prática de colheita da cana sem queima. As ninfas sugam a seiva do xilema e floema das raízes, resultando em plantas desnutridas, com folhas amareladas, colmos finos e secos, levando à perdas de produtividade de colmos e sacarose. Também, em resposta ao ataque da praga, verificam-se alterações no metabolismo da planta, que resultam na produção de biomoléculas, como ácidos orgânicos e compostos fenólicos, que podem interferir na qualidade da cana para produção de etanol, inibindo o metabolismo das leveduras durante o processo fermentativo, refletindo em perdas no rendimento alcoólico e alterações na composição do destilado. Segundo DINARDO-MIRANDA et al. (1999), os danos são severos para a maioria das variedades cultivadas, principalmente nas colheitas de meio e fim de safra.

Neste contexto, a presente pesquisa objetiva avaliar os reflexos dos danos causados pelo ataque de cigarrinha-das-raízes na cana-de-açúcar sobre a qualidade da matéria-prima, estabilidade e desempenho da microbiota fermentativa e produção de etanol.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cigarrinha-das-raízes (*Mahanarva fimbriolata*) (Stal, 1954) (HEMIPTERA: CERCOPIDAE)

As cigarrinhas são insetos sugadores e estão amplamente distribuídas nas Américas e no Caribe (FEWKES, 1969). No Brasil, as principais espécies de cigarrinhas que ocorrem em cana-de-açúcar são *M. fimbriolata* (cigarrinha-das-raízes); *M. posticata* (cigarrinha-da-folha) e *M. rubicunda indentata* (cigarrinha-do-cartucho). Os hospedeiros naturais da cigarrinha-das-raízes são principalmente gramíneas nativas da região norte do Brasil e as do gênero *Brachiaria*, nativas da África, enquanto a cana-de-açúcar é um hospedeiro alternativo (MENDONÇA et al., 1996).

A cigarrinha-das-raízes não era considerada uma praga-chave na região Centro-Sul, uma vez que prejuízos significativos não ocorriam com frequência (MENDONÇA et al., 1996). Entretanto, ao longo dos últimos anos, com o aumento da colheita mecanizada de cana crua, essa espécie tornou-se uma das pragas mais importantes da região. Esse sistema de colheita deixa uma camada de palha abundante no solo, propiciando um ambiente de elevada umidade e temperatura estável que é favorável ao desenvolvimento de ninfas de cigarrinha (MENDONÇA & MENDONÇA, 2005). A queima da palha antes da colheita destrói todas as formas de cigarrinhas, especialmente os ovos (DINARDO-MIRANDA et al. 1999).

Após a eclosão, as ninfas fixam-se às raízes e radículas da cana-de-açúcar, onde permanecem durante todo o período ninfal, que dura cerca de 30 a 40 dias (MENDONÇA & MENDONÇA, 2005). Neste período estão permanecendo sempre cobertas por uma espuma branca por ela secretada, cuja função é envolvê-la e protegê-la contra a dessecação (GARCIA, 2002). Podem ocorrer nas raízes adventícias ou aéreas do colmo ou por baixo da palha nas entrelinhas da cana-de-açúcar, sugando as radículas presentes (MENDONÇA et al., 1996).

As ninfas causam uma desordem fisiológica na planta, em decorrência das picadas que atingem os elementos traqueais da raiz e os deterioram, dificultando ou impedindo o fluxo de água e de nutrientes, caracterizado pela desidratação do floema e

do xilema (GARCIA et al., 2007). Em consequência, as plantas tornam-se desnutridas e desidratadas, com folhas amareladas e posteriormente secas. A ocorrência das ninfas está correlacionada positivamente com o excedente hídrico e com as altas temperaturas, que ocorrem no estado de São Paulo de novembro a abril.

Os adultos medem cerca de 12mm de comprimento, possuem coloração em geral avermelhada, com presença ou não de manchas longitudinais nas asas (MENDONÇA et al, 1996). As fêmeas são mais escuras que os machos e ovipositam em média de 300 a 500 ovos no solo, próximos às raízes da touceira (BENEDINI, 2003). Para se alimentarem, sugam a seiva das folhas, na área do parênquima foliar (MENDONÇA & MENDONÇA, 2005). Ao sugarem a seiva nas folhas, injetam saliva para auxiliar no seu processo de ingestão. As substâncias presentes na saliva são ricas em enzimas e aminoácidos, e se comportam como toxina para as plantas causando clorose no tecido foliar, afetando o processo de fotossíntese. Com a interrupção da fotossíntese, o armazenamento de açúcares nas folhas é reduzido, resultando em colmos menores, mais finos, secos e com menor teor de sacarose (MENDONÇA & MENDONÇA, 2005).

Segundo DINARDO-MIRANDA et al. (2000), as reduções na produtividade agrícola, em decorrência do ataque desta praga, podem ser significativas para as principais variedades cultivadas atualmente. O ataque intenso pode ocasionar reduções na produtividade, principalmente nas colheitas de meio e fim de safra (DINARDO-MIRANDA et al., 1999) e alterar significativamente a qualidade da matéria-prima, através da redução dos teores de açúcar e aumento dos teores de fibra no colmo (DINARDO-MIRANDA et al., 2000).

2.2. Qualidade da matéria-prima

A qualidade da matéria-prima encontra-se diretamente relacionada com o desempenho dos processos industriais, fundamentais na obtenção de rendimentos satisfatórios e qualidade do produto final. CLARKE & LEGENDRE (1999) ressaltam que a matéria-prima de baixa qualidade reduz a velocidade de processamento na indústria, e conseqüentemente, reduz a quantidade e qualidade dos produtos finais.

Cana-de-açúcar como matéria-prima, segundo STUPIELLO (1989) significa colmos maduros, recém cortados, sadios e livres de impureza. Portanto, todos os fatores que danificam as raízes, os colmos e as folhas da cana, como ataque de pragas, doenças e fatores ligados ao seu manejo são indesejáveis, pois diminuem a sua qualidade, podendo acarretar em prejuízos no rendimento industrial.

A incidência de estresses bióticos na cana-de-açúcar e seus efeitos sobre a qualidade da matéria-prima foram relatados em diversas pesquisas. BLUMER (1992) relatou significativa redução na qualidade após o ataque de *Diatraea saccharalis*, enquanto DINARDO-MIRANDA et al. (1999; 2000), GONÇALVES et al. (2003) e RAVANELI et al. (2006) verificaram comprometimento da matéria-prima atacada por *M. fimbriolata*.

Segundo MUTTON (2003), em resposta ao ataque de insetos e patógenos podem ocorrer reações bioquímicas nas plantas, que desdobram os açúcares produzindo lignina, polissacarídeos e compostos fenólicos, com o objetivo de protegê-las do ataque.

TAIZ & ZEIGER (2004) relatam que os compostos fenólicos são as mais importantes substâncias de defesa produzidas pelas plantas contra o ataque de pragas e doenças. Ainda segundo esses autores, os principais compostos envolvidos com o mecanismo de resistência planta-praga são os taninos, flavonóides, isoflavonóides e lignina. BI et al. (1997), citam o ácido clorogênico e a rutina como modelos de compostos fenólicos utilizados em estudos envolvendo defesa anti-herbivoria em plantas.

FONTANIELLA et al. (2003) encontraram grandes quantidades dos ácidos ferúlico, siríngico e clorogênico em caldo de cana-de-açúcar infestada pela "síndrome da folha amarela" (YLF). PHELPS & YOUNG (1996) enfatizam que o ácido ferúlico e seus derivados conferem proteção às plantas contra o ataque de insetos, fungos e vírus. Esses compostos podem influenciar negativamente a qualidade da matéria-prima uma vez que são responsáveis pelo escurecimento do caldo e produção de açúcar com maior cor (GODSHALL, 1999), ou ainda atuar como inibidor da fermentação alcoólica, através da inibição da atividade enzimática das invertases (POLAKOVIC et al., 1992).

2.3. Fermentação etanólica e microbiota fermentativa

Segundo YOKOYA (1995) a fermentação alcoólica é a principal etapa do processo de produção de álcool, pois nela o açúcar e outros componentes do mosto são transformados em álcool etílico, gás carbônico e compostos secundários. Participam desse processo, além da levedura, que é o principal agente, outros microrganismos que são introduzidos involuntariamente no sistema. Tais microrganismos são indesejáveis e responsáveis pela redução do rendimento alcoólico e depreciação na qualidade do produto final.

Sendo um organismo vivo, a levedura apresenta, para o seu desempenho, certas exigências que lhe permitem desenvolver o seu metabolismo de maneira adequada e, conseqüentemente, a obtenção de um produto final com características que atendam às exigências do mercado (NOVAES, 1992).

As leveduras de panificação possuem baixa taxa de permanência nas fermentações industriais (BASSO et al., 1993). Sendo assim, a matéria-prima e as condições operacionais podem influenciar sensivelmente a estabilidade e o desempenho das leveduras durante a fermentação. MUTTON & MUTTON (2002) ressaltam a importância do estudo do comportamento da microbiota fermentativa frente ao mosto proveniente de cana danificada, uma vez que a eficiência do processo fermentativo pode ser diretamente influenciada pelos componentes do caldo. Além da qualidade da matéria-prima, outros fatores afetam o processo fermentativo, tais como pH, acidez, temperatura, concentração de açúcares do meio, etanol, disponibilidade de nutrientes e presença de microrganismos contaminantes,.

As leveduras são células eucarióticas altamente tolerantes às variações do pH do meio, sendo por isso denominadas acidófilas. Contudo, o pH ideal para um eficiente desempenho fermentativo é ao redor de 4,0 a 4,5. A correção do pH é importante tanto para a multiplicação como para o processo fermentativo, e na prática é feita com a aplicação de ácido sulfúrico (ANGELIS, 1992). CHAVES & PÓVOA (1992) afirmam que a acidez natural verificada no caldo de cana é praticamente suficiente quando consideramos os valores requeridos para uma fermentação adequada.

Embora algumas vezes o tratamento ácido se mostre estressante para a levedura, esse fator reduz a multiplicação das bactérias minimizando a contaminação (AMORIM et al., 1996).

Segundo NARENDRANATH et al (2001), os principais ácidos encontrados na fermentação alcoólica são o acético e lático e ambos são inibidores do crescimento das leveduras. O ácido acético é um produto formado em pequenas quantidades na fermentação, enquanto o ácido lático é o principal metabólito produzido pelas bactérias lácticas. Ainda de acordo com esses autores, a presença de ácidos orgânicos, como o acético e lático, resultam em um aumento no consumo de ATP pela levedura. Nessas condições, parte do ATP que seria utilizado para crescimento ou fermentação é desviado para manutenção de seu pH interno.

A temperatura ideal para o metabolismo das leveduras durante a fermentação encontra-se na entre 28 e 34 °C. Temperaturas inferiores a 30-32 °C prolongam o tempo de fermentação enquanto temperaturas elevadas inibem o crescimento celular, especialmente na presença de elevados teores de etanol (STUPIELO & HORII, 1981).

ANGELIS (1992) cita que, em temperaturas abaixo da ideal, há maior gasto de energia para completar o ciclo celular das leveduras, enquanto em temperaturas muito elevadas, acima de 40 °C a maioria das leveduras deixa de se multiplicar e perde a viabilidade, além de ocorrer o favorecimento do desenvolvimento de bactérias.

Segundo STOKES (1971), o etanol tem efeito inibidor sobre as leveduras, cessando o crescimento celular quando em concentrações relativamente baixas e a fermentação quando em concentrações mais elevadas. HALLSWORTH (1997) relata limitação do crescimento e atividades metabólicas das leveduras, por afetar os mecanismos relacionados ao controle osmótico, induzindo o estresse hídrico nas leveduras. Ainda segundo esse autor, concentrações de etanol próximas a 5% já são suficientes para promover tais conseqüências metabólicas.

De acordo com ANGELIS (1992), a concentração de açúcares pode afetar tanto a produção da biomassa celular da levedura como o processo fermentativo. Segundo STUPIELLO & HORII (1981) as células de leveduras em presença de teores elevados de açúcares, mesmo na presença de oxigênio, têm a respiração reprimida e tendem a

fermentar pela inibição da síntese de enzimas respiratórias e consequente inatividade das mitocôndrias, no chamado Efeito Crabtree.

Altas concentrações de açúcares promovem altos teores alcoólicos, podendo comprometer a viabilidade das células ou ainda ocorrer fermentações lentas e incompletas, com formação de subprodutos, fatos estes que podem baixar consideravelmente o rendimento alcoólico e a viabilidade celular da levedura, além de favorecer o desenvolvimento de contaminantes (ANGELIS, 1992). Sendo assim, no preparo do mosto, a concentração de açúcar total deve ser compatível com a natureza e composição da matéria-prima, com o tipo de levedura empregada e com o processo de condução da fermentação (STUPIELLO E HORII, 1981).

Do ponto de vista nutricional, o nitrogênio, fósforo, potássio, enxofre, magnésio, manganês, zinco, cálcio entre outros, são elementos considerados fundamentais às leveduras, levando-se em conta a estrutura celular dos microrganismos fermentadores, o desdobramento de açúcares e outros processos metabólicos vitais (AMORIM, 1985). A exigência nutricional depende da concentração desses elementos no meio, estando diretamente ligados à linhagem da levedura utilizada no processo. O enxofre, potássio, manganês e cobalto apresentam uma função importante no processo por estarem relacionados às atividades enzimáticas (AMORIM et al., 1996).

Outro fator que influencia o processo fermentativo é a presença da microbiota contaminante. A origem desses microrganismos é principalmente o campo, e a infecção pode aumentar durante o período que decorre entre o corte e o processo de extração, pois muitos microrganismos do solo encontram amplas e favoráveis condições de desenvolvimento (STUPIELLO & HORII, 1981). De acordo com GALLO (1992), o caldo de cana constitui um ótimo substrato para o crescimento de microrganismos, face aos teores de nutrientes, elevado teor de água, pH e temperatura favoráveis.

Dentre os microrganismos responsáveis pela redução no rendimento de uma fermentação alcoólica destacam-se as bactérias pertencentes aos gêneros *Acetobacter*, *Clostridium*, *Aerobacter*, *Streptococcus* (AMORIM & OLIVEIRA, 1982), *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Leuconostoc*, *Bacillus* e *Lactobacillus* (BEVAN & BOND, 1971) e os

fungos (leveduras e bolores) como *Saccharomyces*, *Torula*, *Pichia*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* (BEVAN & BOND, 1971) e *Candida* (CABRINI & GALLO, 1999).

As bactérias participam ativamente da deterioração da cana colhida, obrigando a uma redução no tempo de estocagem, uma vez que estas introduzem no processo metabólitos indesejáveis que dificultam as etapas anteriores à fermentação, causando alterações desfavoráveis às leveduras durante o processo fermentativo, provocando a floculação e perda do fermento, consomem a sacarose e outros nutrientes do mosto, comprometendo o rendimento alcoólico (GALLO, 1992).

Segundo AMORIM & OLIVEIRA (1982), bactérias do gênero *Leuconostoc* e *Bacillus* quebram a sacarose, formando polímeros de alto peso molecular, que são constituídos por resíduos de glicose ou frutose. Estes polímeros entopem trocadores de calor e canalizações, além de aumentarem a viscosidade do vinho, entupindo as centrífugas. As bactérias do gênero *Acetobacter* e *Gluconobacter* oxidam o álcool etílico em ácido acético, aumentando a acidez volátil e fixa nos vinhos, enquanto as bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Pediococcus* produzem grande quantidade de ácido láctico a partir da glicose, e as bactérias do gênero *Clostridium* são responsáveis pela formação dos ácidos butírico, fórmico e acético (YOKOYA, 1995).

2.4. Identificação de leveduras no processo fermentativo

As fermentações industriais geralmente iniciam-se com uma cepa de levedura selecionada. Entretanto, no decorrer dos ciclos fermentativos, as linhagens que iniciaram o processo podem ser substituídas por outras leveduras. Tais leveduras, denominadas nativas ou contaminantes, podem predominar no processo em função de alguns fatores, tais como agressividade na competição por nutrientes, maior velocidade de multiplicação, pressão de seleção favorável e adaptação às condições do meio fermentativo. Como consequência, o processo pode ser negativamente afetado, através de redução no rendimento alcoólico, maior tempo de fermentação e produção de metabólitos indesejáveis. Entretanto, essas leveduras selvagens podem também

apresentar excelente rendimento alcoólico, possibilitando assim ser selecionadas para o processo fermentativo (CABRINI & GALLO, 1999).

BASSO (2009), em estudo conduzido nas últimas quatro safras, verificou que das 326 linhagens selvagens isoladas de várias destilarias, cerca de 63% se mostraram formadoras de espuma em excesso, 32% flocluraram sem a indução por bactérias e 53% não metabolizaram todo açúcar do mosto. Observou também que entre 3 a 5% dos isolados não eram *Saccharomyces*, predominando os gêneros *Schizosacharomyces*, *Candida* e *Bretanomyces* (*Dekkera*), as quais uma vez instaladas no processo acarretam sérios prejuízos.

A identificação das leveduras presentes nos processos fermentativos é importante, uma vez que, sob condições inadequadas, algumas estirpes que apresentam baixa produtividade em etanol podem dominar o processo fermentativo, levando a prejuízos na indústria. Os métodos moleculares têm sido bastante empregados na identificação de leveduras, uma vez que são mais precisos quando comparados aos testes tradicionais (morfológicos, bioquímicos e fisiológicos).

Atualmente, vários métodos moleculares são utilizados para caracterizar linhagens de leveduras no processo fermentativo, tais como o Polimerase Chain Reaction (PCR) (EGLI et al., 1998; GUERRA et al., 2001), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (QUESADA & CENIS, 1995; MARTINS et al., 1999); Restriction Fragment Length Polymorfism (RFLP) (GUILLAMÓN et al., 1998; DEMUYTER et al. 2004), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (FLORES BERRIOS et al., 2005) entre outras. Entretanto, quando pretende-se verificar a permanência de uma linhagem durante todo o processo de fermentação, a técnica mais empregada é a PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), ou eletroforese em campo pulsado. Essa técnica consiste em separar o DNA cromossômico intacto, de acordo com o tamanho dos cromossomos, e tem-se mostrado uma importante ferramenta na identificação de gêneros, espécies ou estirpes de leveduras (BASSO et al., 1993). A técnica de eletroforese em campo pulsado tem sido amplamente empregada por diversos autores (BASSO et al., 1993; BRIONES et al., 1996; GIUDICI et al., 1998; VILANOVA & MASSNEUF-POMARÈDE, 2005).

BASSO et al. (1993) investigando o emprego da técnica de PFGE no acompanhamento de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae*, verificaram que as leveduras de panificação não permanecem no processo fermentativo industrial após 40 dias, sendo substituídas por leveduras dominantes típicas de cada destilaria. Esses autores observaram que, apesar da diversidade da população, essas leveduras em grande parte mostraram-se geneticamente mais próximas entre si do que com o padrão da levedura de panificação utilizada como inoculo inicial. BASSO et al (2008) relatam que a principal razão pela qual essas leveduras são incapazes de permanecer no processo pode ser a condição de estresse imposta pelas fermentações, tais como alta concentração de etanol, estresse osmótico, elevadas temperaturas, presença de sulfito e bactérias contaminantes.

Segundo LUCENA (2004), essa técnica têm demonstrado uma variedade de perfis genéticos em função de sua capacidade de detectar rearranjos cromossômicos, não detectados por outros métodos. Também é uma técnica muito importante para se avaliar a estabilidade genômica de uma população de leveduras submetidas a diferentes condições ambientais.

Estudos realizados por PUIG et al. (2000) e SOUZA et al. (2007), empregando a técnica de PFGE, observam que diferenças nos cariótipos das leveduras não necessariamente indicam a ocorrência de rearranjos cromossômicos, não sendo possível determinar pequenas alterações no número e tamanho das bandas e sua relação com certas características genéticas das estirpes.

Dessa maneira, torna-se relevante o estudo da estabilidade das leveduras em um sistema fermentativo quando emprega-se matéria-prima de qualidade comprometida, uma vez que os impactos sobre o rendimento fermentativo e a produção de etanol podem ser significativamente afetados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Instalação e condução do experimento

A presente pesquisa foi instalada no município de Guariba-SP, em área pertencente à Louis Dreyfus Commodities Bioenergia S/A – Usina São Carlos, durante a safra 2007/2008. As análises foram conduzidas nos Laboratórios de Tecnologia do Açúcar e Álcool e Microbiologia das Fermentações do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Jaboticabal -SP.

A variedade utilizada foi a SP80-1842, de 5º corte, que se destaca entre as variedades mais susceptíveis ao ataque de cigarrinha-das-raízes (DINARDO-MIRANDA et al., 2001) e caracteriza-se como de maturação média. O índice de infestação por broca observado na área experimental foi 8%.

A partir de novembro de 2006, com o início das chuvas (Anexo 1 - Apêndice), iniciou-se monitoramento da área experimental, através de contagem de ninfas de *M. fimbriolata* presentes nas raízes das plantas em nove parcelas previamente distribuídas na área experimental. Cada parcela era constituída de seis linhas de cana com 5 m de comprimento e espaçamento de 1,5 m entrelinhas (20 m²).

A contagem de ninfas foi realizada em 1m nas duas linhas centrais da parcela, através da retirada da palha, contagem de ninfas na base das plantas e recolocação da palha. Foram realizados levantamentos nos dias 10/11/2006, 11/01/2007, 09/02/2007, 02/03/2007, 23/03/2007, 13/04/2007, 04/05/2007 e 25/05/2007 com a finalidade de acompanhar o desenvolvimento da praga ao longo do ciclo de desenvolvimento.

A infestação média observada foi de 7,52 ninfas/m, com pico populacional de 17,8 ninfas/m em 11/01/2007 (Figura 1). Nesse período, a temperatura e precipitação mensal média observadas foram 24,4°C e 200,9mm, respectivamente (Anexo 1 – Apêndice).

Na primeira época, a cana foi colhida no período de maio/junho de 2007, correspondente ao final das chuvas. Em seqüência, realizou-se a colheita em período pós-seca (outubro de 2007).

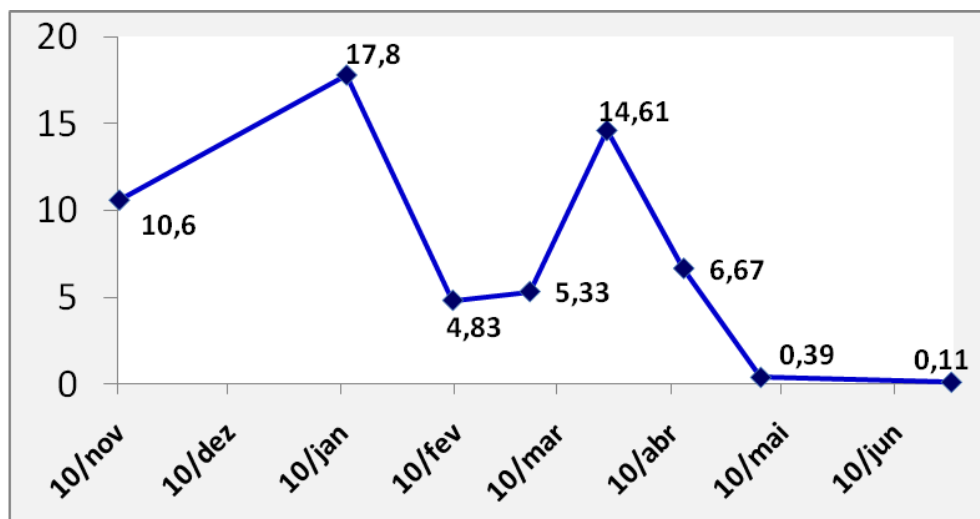


Figura 1: Infestação de ninfas de *M. fimbriolata* (ninfas/m) em raízes de cana-de-açúcar.

3.2. Tratamentos

Os tratamentos utilizados foram testemunha e níveis de comprometimento médio, alto e muito alto, conforme esquema a seguir:

Níveis de Comprometimento	% de Danos	Colmos Aparentemente Sadios	Colmos com Danos	Colmos Secos
Testemunha	0%	20	0	0
Médio	15%	17	2	1
Alto	30%	14	4	2
Muito Alto	60%	8	8	4

Estabeleceu-se para os colmos utilizados a classificação de “aparentemente sadios”, “com danos” e “secos”. Os aparentemente sadios referem-se aos colmos que se apresentaram com a parte externa sem danos e com o meristema apical vivo; os colmos com danos foram aqueles cuja aparência externa apresentava-se injuriada, com

o meristema apical seco, mas com a parte basal ainda normal. Os secos foram aqueles que ainda estavam ligados à touceira, mas completamente secos.

3.3 – Delineamento Experimental

Foram adotados os seguintes delineamentos:

- Análises do caldo e mosto: delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 2, com 4 níveis de danos promovido pela cigarrinha-das-raízes (0, 15, 30 e 60% de danos), duas épocas de colheita (maio/junho e outubro de 2007) e 15 repetições.
- Avaliação do processo fermentativo: delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x10x 2, sendo os tratamentos principais os níveis de danos promovido pela cigarrinha-das-raízes (0, 15, 30 e 60%), os secundários os 10 ciclos fermentativos, e os terciários as duas épocas de colheita, com três repetições.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo Teste F e comparação entre as médias pelo teste de Tukey e análise de regressão linear (BANZATTO & KRONKA, 2006).

3.4 - Coleta de Colmos e Extração do Caldo

Diariamente os colmos foram selecionados, cortados e removidos do canavial para o carreador, onde foram despalhados e despontados na altura do ponto de quebra. A seguir, os tratamentos foram compostos, identificados e encaminhados para o laboratório de PCTS da Usina São Carlos para extração do caldo.

Os colmos foram desintegrados, homogeneizados e subamostras de 500 g foram retiradas e submetidas à prensa hidráulica (TANIMOTO, 1964). Imediatamente após a extração do caldo, foram realizadas as análises tecnológicas e o resíduo fibroso resultante da prensagem foi pesado para cálculo da fibra % cana.

Parte do caldo extraído foi acondicionado, identificado e imediatamente encaminhado ao Laboratório de Tecnologia do Açúcar e Álcool da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Jaboticabal, para demais determinações.

3.5 - Avaliação das Características Tecnológicas do Caldo

O Brix e a Pol do caldo foram determinados segundo SCHNEIDER (1979). O pH foi determinado por leitura direta em medidor digital Digimed DMPH – 2 com correção de temperatura. Os Açúcares Redutores Totais (ART) foram dosados pelo método volumétrico de LANE & EYNON (1934). A Acidez Total foi determinada através da titulação do caldo em agitação com NaOH padrão 0,05N. Os compostos fenólicos totais foram quantificados segundo FOLIN & CIOCALTEAU (1927).

3.6 – Caracterização da deterioração microbiológica

A deterioração microbiológica foi caracterizada através da quantificação da acidez volátil (VILLELA et al., 1973), dextrana (COPERSUCAR, 2001), manitol (LUNN et al., 1989 e EGGLESTON & HARPER; 2006) e ácido lático no caldo (VENTURA, 2007).

3.7 – Cálculos Tecnológicos

A Pureza Aparente do caldo foi calculada através da relação entre a Pol e o Brix do caldo ($\text{Pol} \times 100/\text{Brix}$). Os Açúcares Redutores e a Pol da cana (%) foram calculados segundo CONSECANA (2008).

A Fibra % Cana foi calculada segundo CONSECANA (2008) e TANIMOTO (1964). A Umidade da cana foi determinada através da secagem da cana desfibrada em estufa a 65°C por 48 horas. Após a secagem, o material seco foi pesado e a umidade calculada.

3.8 - Preparo do Mosto

O caldo extraído foi submetido a um processo de clarificação para remoção de impurezas. Este processo consistiu na adição de ácido fosfórico, correção do pH para valores próximos a 7 com leite de cal, aquecimento do caldo até 105°C e reação com polímero (MAFLOC) na concentração de 2mg/L para decantação das impurezas. A decantação teve duração de 10 minutos. Em seguida, o caldo decantado foi filtrado para retirada da borra.

Em função das condições de maturação da cana, na primeira época (maio/junho), após o processo de clarificação, o caldo clarificado apresentava valores de Brix próximos a 13°, não foi realizada nova diluição para preparar o mosto. Na segunda época, entretanto, o Brix do caldo clarificado foi padronizado a 14°.

Após a padronização do Brix, o pH do caldo clarificado foi corrigido com ácido sulfúrico até 3,5 ($\pm 0,3$), sendo os Açúcares Redutores Totais (LANE & EYNON, 1934), e a Acidez Total quantificados. O caldo clarificado foi aquecido a 32°C, obtendo-se o mosto.

3.9 - Condução do Processo Fermentativo

Alíquotas de 500 mL de mosto foram inoculadas com 30g de fermento prensado (marca comercial Fleishmann) por litro de mosto, equivalente à concentração recomendada por AMORIM et al. (1996). Os frascos contendo mosto inoculado foram mantidos a 32°C (± 1 °C) durante toda a fermentação. A alimentação com 250mL de mosto ocorreu em duas vezes, com intervalos de 30 minutos.

Para condução da fermentação empregou-se o processo em bateladas com recuperação do fermento por centrifugação. O processo foi monitorado com auxílio de densímetro de °Brix.

O final das fermentações foi estabelecido quando o Brix apresentava valores menores ou iguais a 1, ou quando houve estabilização da leitura em densímetro em intervalo de 30 minutos.

Ao término de cada ciclo fermentativo, os vinhos foram centrifugados a 1650 x g, 25°C, por 5 minutos (centrífuga HIMAC CR 21G) para separação do fermento e vinho delevurado. O fermento foi lavado com solução salina 0,85% estéril e submetido ao tratamento com 0,5% de glicose + ácido sulfúrico até pH 3,5 ($\pm 0,2$), quando o pH encontrava-se acima deste valor. O fermento permaneceu sob agitação por 1 hora, a 32°C, formando um novo pé-de-cuba, que foi utilizado em novas fermentações. Foram realizados dez ciclos fermentativos.

Ao final do 3°, 5°, 6°, 7° e 8° ciclos, realizou-se uma limpeza de “fundo de dorna” para remoção de material inerte, células mortas e bactérias. A limpeza consistiu na

transferência do vinho do erlenmeyer para proveta e após cinco minutos, 50mL do vinho juntamente com o fermento presentes no fundo da proveta era removido com auxílio de pipeta para frasco volumétrico e aguardava-se cinco minutos. Após esse período, descartava-se 15mL da suspensão (vinho e fermento), correspondente a 3% do volume total, e o restante era devolvido ao processo. Este procedimento foi realizado em sala asséptica e em todos os tratamentos, para evitar possíveis variações na condução das fermentações.

No vinho delevurado, foi determinado o teor de glicerol, segundo COPERSUCAR (1988), Açúcares Redutores Residuais Totais (LANE & EYNON, 1934) e teor alcoólico, através de densímetro digital.

A Eficiência Fermentativa (EF) foi calculada segundo FERNANDES (2006).

3.10 - Avaliação das leveduras no processo fermentativo

3.10.1 - Análises microbiológicas

No início (50 minutos após a inoculação do fermento) e final dos processos fermentativos foram realizadas contagens de células de leveduras em Câmara de Neubauer (LEE et al., 1981). Os parâmetros microbiológicos avaliados foram: viabilidade celular das leveduras, viabilidade de brotos, índice de brotamentos e concentração de bactérias contaminantes.

No caldo, mosto, início e final da fermentação, os microrganismos foram quantificados por plaqueamento. No caldo e mosto essa avaliação foi realizada somente nos ciclos ímpares.

Para contagem de bactérias lácticas empregou-se o meio MRS Agar (MAN et al., 1960) com adição de cicloheximida (100mg/L). Para a quantificação de leveduras, foi utilizado o meio WLN (Green & Gray, 1950, modificado por OLIVEIRA & PAGNOCA, 1988) com adição dos antibióticos ampicilina e ácido nalidíxico (100mg/L cada). Para microrganismos totais empregou-se o meio PCA (triptona 0,5%, extrato de levedura 0,25%, glicose 0,1%, agar 1,5%). De cada meio, foram utilizadas duas placas, com uma repetição correspondente a cada diluição seriada de 10^{-5} e 10^{-6} para o meio MRS e 10^{-8}

e 10^{-9} para os meios WLN e PCA. No caldo e mosto, foram utilizadas as diluições 10^{-3} e 10^{-4} . As placas foram incubadas por três dias a 32°C .

3.10.2 – Isolamento e seleção de leveduras

No início e final de cada ciclo fermentativo, foram coletadas e congeladas amostras do mosto em fermentação e vinho para posterior isolamento das leveduras.

As amostras armazenadas em microtubos foram reativadas em meio YEPD (extrato de levedura 1%; peptona 2%; dextrose 2%) a 30°C ($\pm 0,5$) por 48 horas. Em seguida, procedeu-se plaqueamento em meio YEPD agar, contendo 100mg/L de ampicilina e ácido nalidíxico. As placas foram incubadas por 3 dias a 30°C ($\pm 0,5$).

Após esse período, as colônias foram avaliadas quanto à frequência e morfologia. Os parâmetros morfológicos empregados para avaliação das colônias estão descritos na Tabela 1. As leveduras isoladas foram inoculadas em tubos contendo o meio YEPD agar e incubadas a 30°C ($\pm 0,5$) por 24/48h. As culturas foram mantidas a 4°C com óleo mineral.

Tabela 1: Descrição dos parâmetros morfológicos utilizados para avaliação das colônias de leveduras (Van DER WALT & YARROW, 1984).

Parâmetro	Descrição
Tamanho	Diâmetro
Textura	mucóide, viscosa, brilhante, fosca
Cor	branca, bege, rosa...
Superfície	lisa, crespada, complexa
Bordo	liso, ondulado, denteado, filiforme, rizóide
Elevação	convexa, cônica, plana, elevada, gota

3.10.3 – Análise da estabilidade das leveduras

As avaliações foram conduzidas através das técnicas de Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE) e do perfil isoenzimático.

3.10.3.1 - Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE)

A técnica de PFGE foi realizada de acordo com a metodologia proposta por BLONDIN & VIZINHET (1988), com adaptações, como descrito a seguir.

As leveduras isoladas foram colocadas em um molde, contendo 80µL de tampão CPES (ácido cítrico 0,84%; Na₂HPO₄ 1,7%; EDTA.Na₂ 0,745%; sorbitol 22,52%; dithiothreitol 0,08%) contendo 8 mg/mL de Lysing Enzymes (Sigma L1412) para digestão enzimática da parede celular. Após homogeneização das células, foi adicionada solução de agarose 1% em tampão CPE (ácido cítrico 0,84%; Na₂HPO₄ 1,7%; EDTA.Na₂ 0,745%). As amostras solidificadas em agarose ("plugs") foram transferidas para microtubos e incubadas a 28°C por 4 horas em 0,5 mL de tampão CPE. Após esse período, o tampão CPE foi retirado, sendo adicionado às amostras 0,5 mL da solução 3 (EDTA.Na₂ 16,75%; tris 0,12%; SDS 1,0%; pH 9,0) contendo 1mg/mL de proteinase K (Invitrogen) para digestão das proteínas e lipoproteínas. Os "plugs" foram incubados em banho-maria, a 50°C por 16 horas. Para as amostras que foram estocadas, a solução 3 foi removida e substituída por 1mL de solução EDTA.Na₂ 0,5M pH 8,0, sendo mantidas em refrigeração (4°C) até o uso. Os "plugs" que foram imediatamente submetidos à eletroforese foram lavados três vezes por 20 minutos a 50°C e cinco vezes por 15 minutos em temperatura ambiente em 0,5mL de tampão TE (tris 0,12%; EDTA.Na₂ 0,029%; pH 8,0). Após a lavagem, os "plugs" foram cortados para serem utilizados na eletroforese.

5.10.3.1.1 - Preparo do gel de corrida e eletroforese em sistema CHEF

Os géis foram preparados com agarose para Pulsed Field (Bio-Rad) 1% em tampão TBE 0,5X. Os "plugs" foram colocados nas cavidades do gel de corrida. Para a eletroforese foram usados 2,5L de tampão TBE 0,5X.

A eletroforese foi conduzida em aparelho CHEF DR III (Bio-Rad), nas seguintes condições: ângulo de 120°, gradiente de voltagem 6V/cm; temperatura 14°C; com os seguintes tempos de pulsos: 1 hora com pulsos de 5s; 10 horas com pulsos de 60s; 15,6 horas com pulsos de 100s (BERNARDI et al., 2008). O gel foi revelado por imersão

em tampão TBE 0,5X com adição de brometo de etídeo, por 1 hora e fotografado no sistema Gel Doc (Bio Rad), através do software Quantit One (Bio-Rad).

3.10.3.2 - Análise isoenzimática

Foi utilizada a metodologia adaptada por JOSÉ (2000). As leveduras foram cultivadas em 50mL de meio YEPD por 48 horas sob agitação a 30°C. As suspensões foram submetidas à centrifugação (8000 x g; 5 min a 4°C), sendo em seguida lavadas com solução salina 0,85%, desprezando-se os sobrenadantes. Foram adicionados aos precipitados 0,5mL do tampão de extração (Tris-HCl 0,5M pH 7,2; 0,1% MgCl₂; 15% glicerol). Após nova centrifugação, adicionou-se 0,5mL de tampão de extração com 0,2% de mercaptoetanol e 1mg/mL de lisozima, aguardando-se 10 minutos a temperatura ambiente. Foi efetuada uma nova centrifugação, seguida da adição de 0,5mL de tampão de sonicação (Tris-HCl 0,1M pH 8,8; 15% glicerol).

O rompimento das células foi realizado através de sonicador (Branson Sonifier 250), com o seguinte programa: 10 minutos, com pulsos de 10 segundos, 60W de potência e 10 ciclos. Após a extração, as amostras foram centrifugadas e a fração sobrenadante armazenada em freezer.

Para a separação das isoenzimas presentes nos vários extratos protéicos foi empregado o sistema de tampão descontínuo para eletroforese em gel de poliacrilamida. A concentração de acrilamida foi de 5% no gel concentrador e 9% no gel separador. A eletroforese foi conduzida por 3 horas a 4°C, com voltagem constante de 200V.

A revelação das atividades isoenzimáticas nos géis foi realizada utilizando-se os sistemas enzimáticos: álcool desidrogenase (EC 1.1.1.1-ADH), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (EC 1.2.1.12 - G3PDH) e glicose 6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49 – G6PDH).

Os resultados foram submetidos à análise filogenética, utilizando como informações básicas as matrizes de presença ou ausência, construídas a partir do bandeamento específico obtido com a revelação dos géis. O software empregado para essa finalidade foi o NTSYS.exe versão 2.02i

(<http://www.excelersoftware.com/cat/ntsyspc/ntsyspc.html>), utilizando o coeficiente de Jaccard.

3.11 - Destilação do Vinho e Determinação dos Componentes do Destilado

Os componentes voláteis presentes nos vinhos foram recuperados por destilação, onde a cada 50mL de vinho recuperava-se 20mL de destilado. As amostras foram submetidas à análise de componentes em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 2014, acoplado com software GC Solution com uma coluna Restec modelo Rtx[®]-1301, 60m x 0,25mm. Injetou-se 1µL de cada amostra nas seguintes condições: temperatura do injetor: 200°C, detector FID, temperatura do detector: 240°C, gás de arraste: Nitrogênio; pressão: 186,6kPa; fluxo: 47,2mL/min.; fluxo da coluna: 1,7mL/min; velocidade linear: 30cm/seg. A temperatura da coluna permaneceu por 7,5 minutos a 40°C, aumentando até 220°C, com uma taxa de 10°C/min. Os compostos avaliados foram: acetaldeído, acetato de etila, etanol, álcool n-propílico, álcool isobutílico e álcool isoamílico.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Qualidade da Matéria-Prima

Significativas reduções na qualidade tecnológica da cana foram detectadas. Os valores observados para Brix, Pol, Pureza e Açúcares Redutores Totais foram significativamente menores enquanto houve aumento nos Açúcares Redutores nos tratamentos em que os danos da praga foram encontrados (Tabela 2 e Figuras 2 e 3). Este comportamento ocorre tanto em função do comprometimento do processo fotossintético, reduzindo o acúmulo de sacarose (DINARDO-MIRANDA et al, 2000; GONÇALVES et al., 2003; RAVANELI et al., 2006; MADALENO et al, 2008), quanto ao consumo dos açúcares armazenados para produzir moléculas de defesa contra o ataque da praga. Resultados similares foram obtidos para outras variedades de cana-de-açúcar, tais como IAC83-2396, RB825336 (DINARDO-MIRANDA et al.; 2001); IAC82-2045 (GONÇALVES et al., 2003) e SP 80-1816 (RAVANELI et al., 2006), corroborando as informações de DINARDO-MIRANDA et al. (1999), que relataram que a maioria das variedades comerciais plantadas são suscetíveis à cigarrinha-das-raízes.

Também se verificou maiores quantidades de compostos fenólicos totais no caldo com o aumento dos níveis de danos da praga. Esse aumento foi observado nas duas épocas, porém mais evidenciado na colheita realizada em outubro (Figura 3). Em resposta ao ataque de insetos e patógenos podem ocorrer reações bioquímicas nas plantas, que desdobram os açúcares produzindo lignina, polissacarídeos e compostos fenólicos, com o objetivo de protegê-las do ataque. Além disso, o estresse hídrico também contribui para o acúmulo de compostos fenólicos na planta.

TAIZ & ZEIGER (2004) relatam que os compostos fenólicos são as mais importantes moléculas de defesa produzidas pelas plantas contra o ataque de pragas e doenças. Esses compostos podem influenciar negativamente a qualidade da matéria-prima uma vez que são responsáveis pelo escurecimento do caldo e produção de açúcar com maior cor (GODSHALL, 1999), ou ainda atuam como inibidores da fermentação alcoólica (POLAKOVIC et al, 1992), comprometendo a produção de etanol. Semelhantemente, RAVANELI et al. (2006) verificaram aumento significativo nesses

compostos quando os níveis de infestação de cigarrinha-das-raízes foi superior a duas ninfas/m.

Tabela 2. Resultado da análise de variância (teste de F) e comparação de médias pelo teste de Tukey (5 % de probabilidade) para os parâmetros tecnológicos do caldo e cana.

Causas de variação	Brix Caldo	Pol Caldo	Pureza Caldo	ART Caldo	Pol Cana	AR Cana	Fenol Caldo
	%						ug/mL
Níveis de danos (A)							
0%	20,16A	17,33A	85,41A	18,66A	15,35A	0,58B	392,03B
15%	20,04A	17,15A	85,16A	18,38AB	14,48AB	0,60B	412,31AB
30%	19,86A	16,78A	84,11AB	17,96B	14,22B	0,62B	434,14AB
60%	19,06B	15,89B	82,66B	17,39C	13,24C	0,67A	457,05A
F	5,46**	11,50**	5,06**	13,97**	12,47**	10,26**	3,71*
DMS (Tukey)	0,78	0,7	2,05	0,55	0,90	0,47	53,73
Épocas (B)							
maio/junho	15,23B	11,96B	79,41B	12,97B	10,90B	0,76A	323,33B
Outubro	24,33A	21,61A	89,26A	23,22 ^a	17,75A	0,48B	524,44A
F	1841,07**	2596,62**	315,12**	4743,77**	781,08**	494,63**	191,12**
DMS (Tukey)	0,42	0,37	1,09	0,29	0,48	0,25	28,82
A x B	0,18ns	0,19ns	1,01ns	1,99ns	1,23ns	0,35ns	0,73ns
CV	5,87	6,18	3,6	4,5	9,35	11,19	18,8

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo

* = significativo ao nível de 5%

** = significativo ao nível de 1%

ART = Açúcares Redutores Totais

AR = Açúcares Redutores

O pH do caldo também foi alterado pelos níveis de danos (Tabela 3 e Figuras 4 e 5), em que se verificou redução significativa no maior nível de dano. Embora este seja pouco sensível para determinar a deterioração da cana, tendo indicado variação, mostra o quanto foi representativo, principalmente quando combinado com a acidez total e volátil. Para esses parâmetros, houve aumento significativo apenas para a segunda época, apesar de os maiores valores terem sido encontrados na coleta realizada nos meses de maio e junho. Similarmente, as maiores concentrações de

ácido láctico, dextrana e manitol no caldo foram observadas para a primeira época (Figura 4).

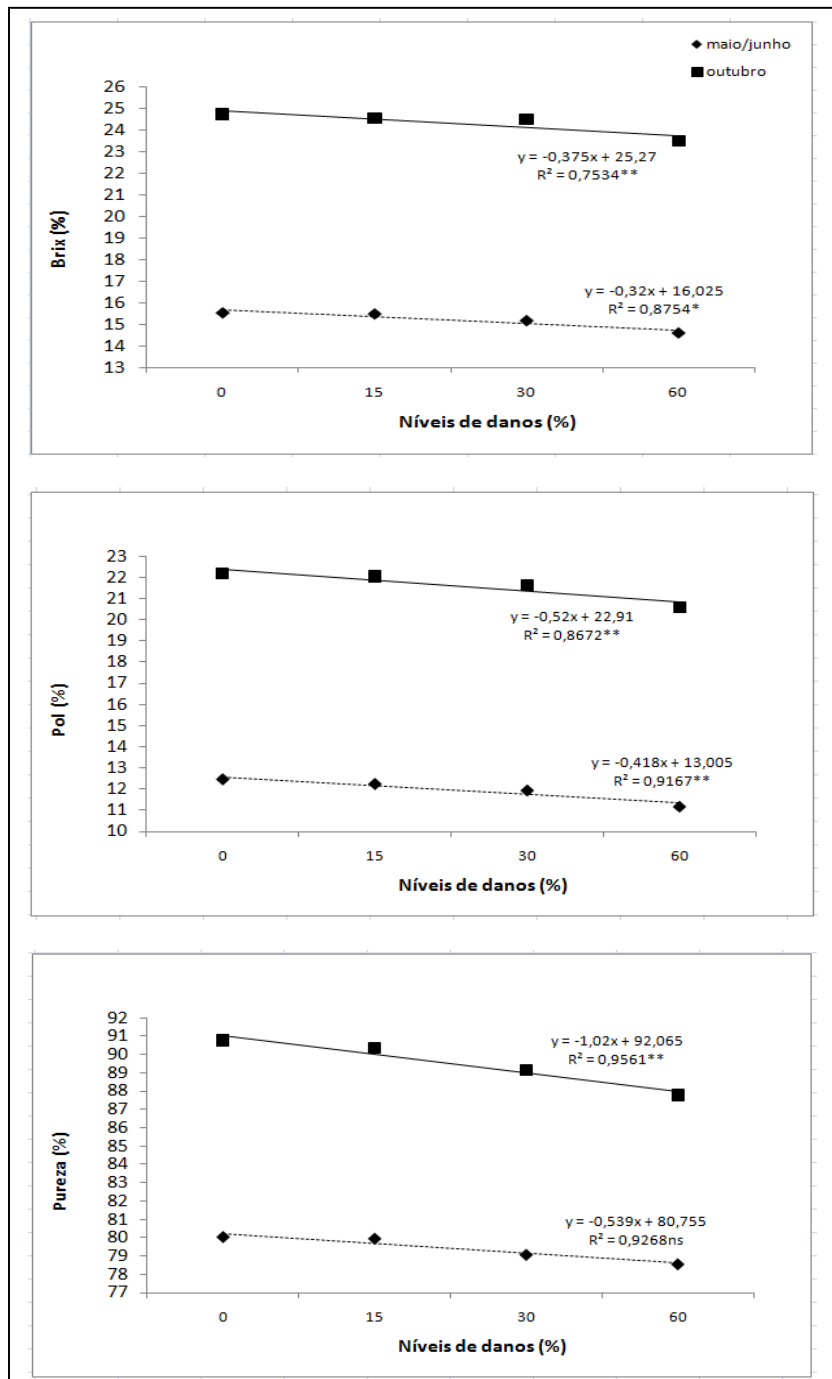


Figura 2: Efeito dos danos causados por *M. fimbriolata* sobre parâmetros tecnológicos da matéria-prima nas duas épocas de colheita.

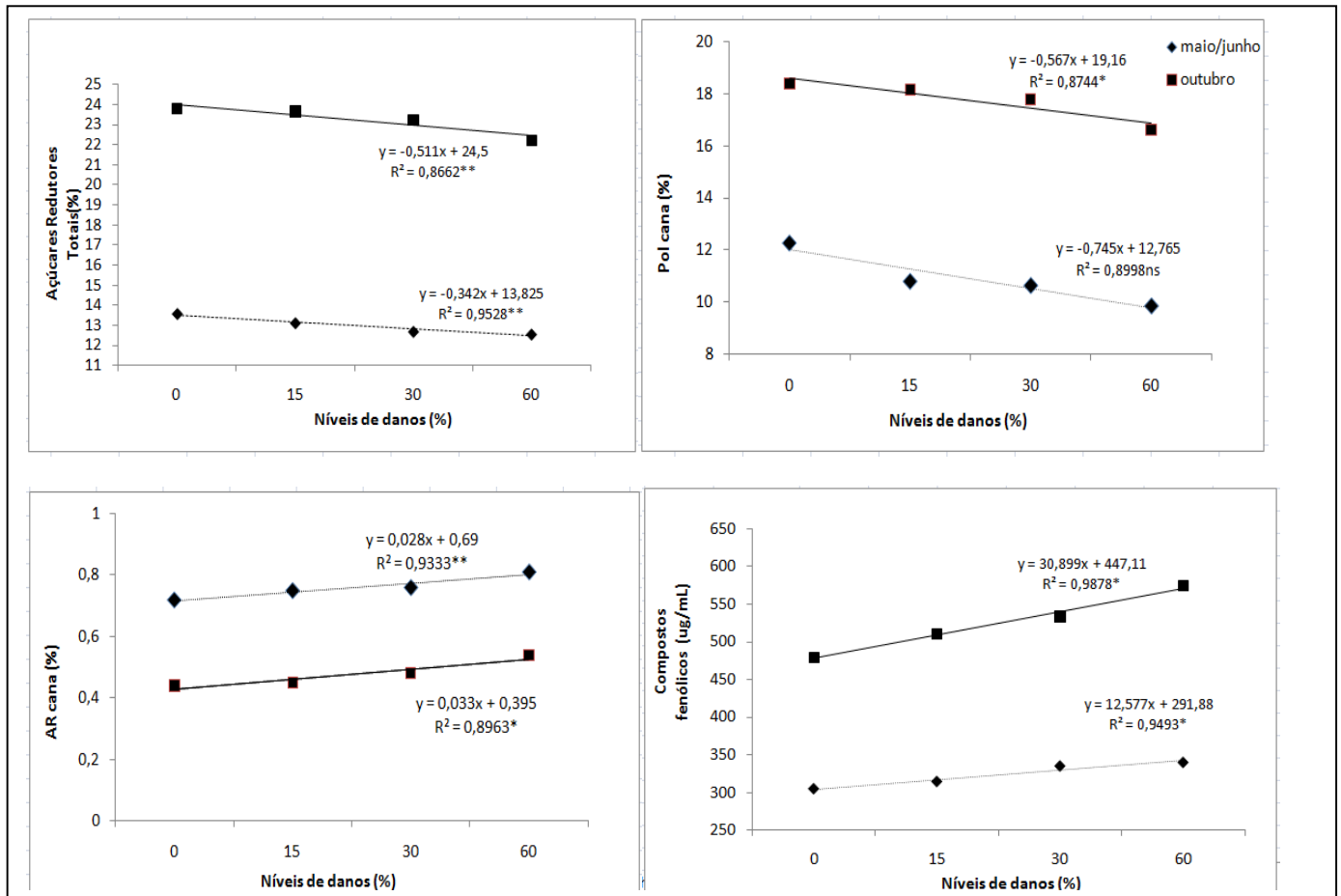


Figura 3: Efeito dos danos causados por *M. fimbriolata* sobre parâmetros tecnológicos da matéria-prima nas duas épocas de colheita.

A dextrana e o manitol são compostos produzidos por bactérias lácticas, principalmente do gênero *Leuconostoc*, a partir do desdobramento da sacarose presente no caldo de cana (EGGLESTON, 2002; EGGLESTON & HARPER, 2006). Como produtos dessa degradação também se podem citar o ácido lático e acético (EGGLESTON et al., 2004). EGGLESTON et al. (2007) relatam que o manitol é um indicador de deterioração mais sensível que a dextrana e também pode ser produzido por outras espécies de bactérias lácticas.

Sob esse enfoque, o aumento da acidez do caldo é indicativo de deterioração microbiológica, em decorrência da contaminação bacteriana. Verificou-se tendência de aumento da contagem de colônias de bactérias quando há dano da praga nos colmos (Anexos 2 e 3 - Apêndice e Figuras 17 e 18). Entretanto, convém ressaltar que a relação entre número de bactérias e produção de ácidos pode não ser direta, uma vez que a produção desses compostos ocorre em função da concentração e espécies de bactérias presentes no substrato (VENTURA, 2007).

Tabela 3. Resultado da análise de variância (teste de F) e comparação de médias pelo teste de Tukey (5 % de probabilidade) para os parâmetros tecnológicos do caldo.

Causas de variação	pH	Acidez total	Acidez Volátil	Dextrana ¹	Manitol ¹	Ácido Lático ²
		gH ₂ SO ₄ /L	mg ác. acético/L	mg/kg	mg/L	mmol/Brix
Níveis de danos (A)						
0%	5,27A	1,09B	13,53B	1,21A	2,52A	2,66B
15%	5,26AB	1,13AB	15,52AB	1,72A	4,55A	2,66B
30%	5,20B	1,19AB	17,14AB	1,19A	5,39A	2,90AB
60%	5,09C	1,25A	18,76A	1,43A	4,33A	3,02A
F	18,84**	4,45**	3,62*	1,05ns	0,73ns	3,62*
DMS (Tukey)	0,07	0,12	4,34	0,88	5,35	0,35
Épocas (B)						
maio/junho	5,26A	1,23A	19,23A	1,85A	4,57 ^a	2,92A
Outubro	5,15B	1,11B	13,25B	0,93B	3,82 ^a	2,70B
F	30,11**	13,81**	25,84**	14,93**	0,28ns	5,21*
DMS (Tukey)	0,04	0,06	2,33	0,47	2,85	0,19
A x B	8,28**	2,56ns	0,05ns	1,71ns	1,45ns	0,15ns
CV	2,02	15,11	39,66	93,88	116,42	18,54

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo

* = significativo ao nível de 5%

** = significativo ao nível de 1%

¹ valores transformados em $\sqrt{x + \alpha}$, sendo $\alpha = 5$.

² valores transformados em $\sqrt{x + \alpha}$, sendo $\alpha = 0,5$.

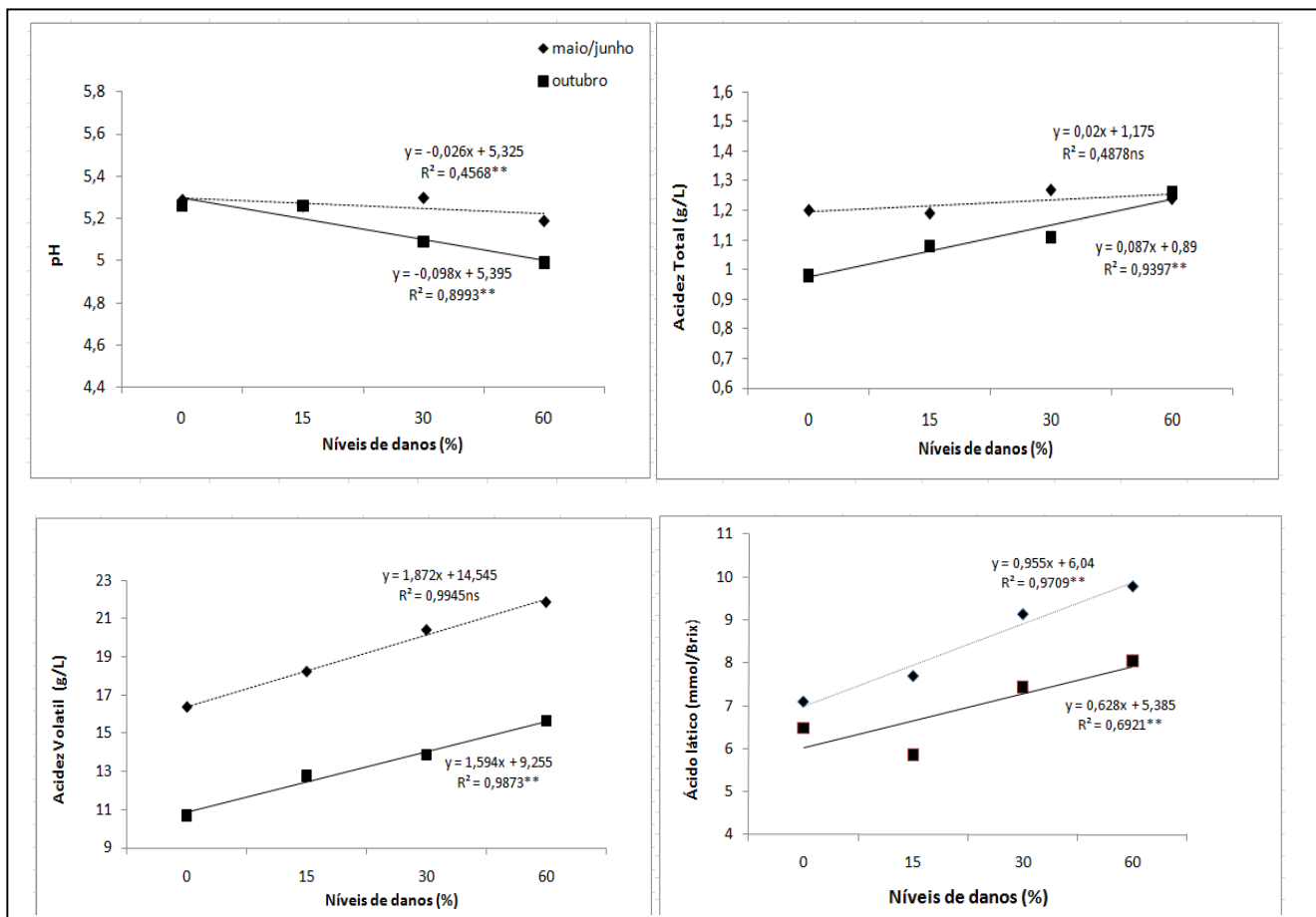


Figura 4: Efeito dos danos causados por *M. fimbriolata* sobre pH, acidez total, volátil e ácido láctico no caldo, nas duas épocas de colheita.

O aumento da fibra da cana é resultante do estresse hídrico causado pela ação sugadora da cigarrinha-das-raízes. Para este parâmetro foi observada diferença significativa para níveis de danos, sendo os resultados mais expressivos obtidos através do cálculo proposto por TANIMOTO (1964) (Tabela 4 e Figura 6). Também verificou-se significativo aumento para a colheita realizada no final da safra (outubro/2007).

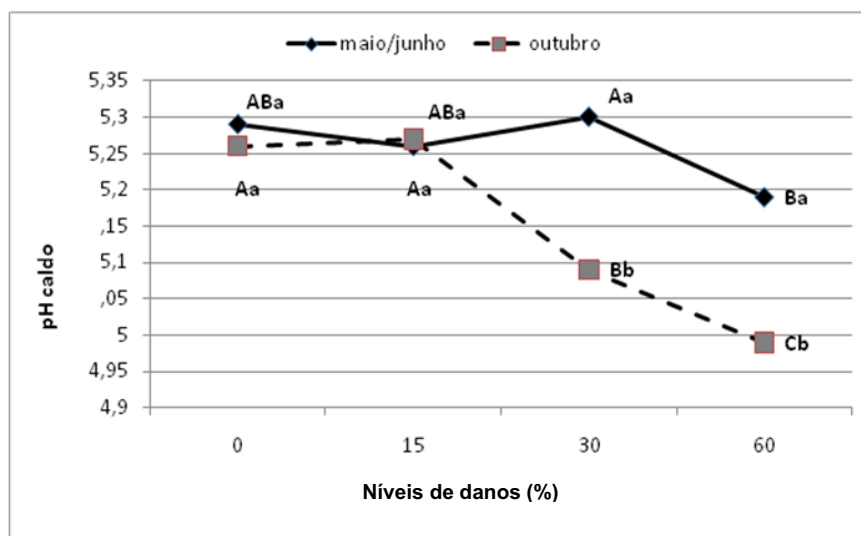


Figura 5: Resultados obtidos para a interação entre os fatores Níveis de infestação x épocas de colheita, para pH do caldo. Letras maiúsculas comparam níveis de danos dentro de épocas de colheita. Letras minúsculas comparam épocas de colheita dentro de níveis de danos.

Para umidade da cana não foi verificado aumento significativo com os danos causados pela praga, entretanto, na segunda época verificou-se significativa redução (Tabela 4). Tais resultados corroboram com DINARDO-MIRANDA et al., (1999), que enfatiza que os sintomas de secamento dos colmos são mais severos nas colheitas de meio e fim de safra, quando a maturação se encontra completa.

Na colheita realizada em outubro, os sintomas do ataque da praga foram mais evidenciados, bem como seus efeitos sobre a qualidade da matéria-prima (Tabelas 2, 3 e 4 e Figuras 2 a 6). Este comportamento era esperado e corrobora DINARDO-MIRANDA et al. (1999), uma vez que neste período de colheita houve acúmulo de dois estresses, o da praga, que ocorreu no período de fevereiro a início de maio, e hídrico, que ocorreu nos meses de junho a outubro.

Tabela 4. Resultado da análise de variância (teste de F) e comparação de médias pelo teste de Tukey (5 % de probabilidade) para fibra e umidade da cana.

Causas de variação	Umidade	Fibra Consecana	Fibra Tanimoto
	%		
Níveis de danos (A)			
0%	68,10A	12,00B	11,88B
15%	67,76A	12,27AB	12,34AB
30%	68,35A	12,24AB	12,68A
60%	68,49A	12,46A	12,91A
F	0,60ns	2,83**	6,08**
DMS (Tukey)	1,52	0,41	0,64
Épocas (B)			
maio/junho	74,12A	11,08B	11,38B
Outubro	62,23B	13,40A	13,52A
F	834,30**	432,93**	153,95**
DMS (Tukey)	0,81	0,22	0,34
A x B	0,28ns	2,6ns	1,89ns
CV	3,31	4,98	7,59

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo

* = significativo ao nível de 5%

** = significativo ao nível de 1%

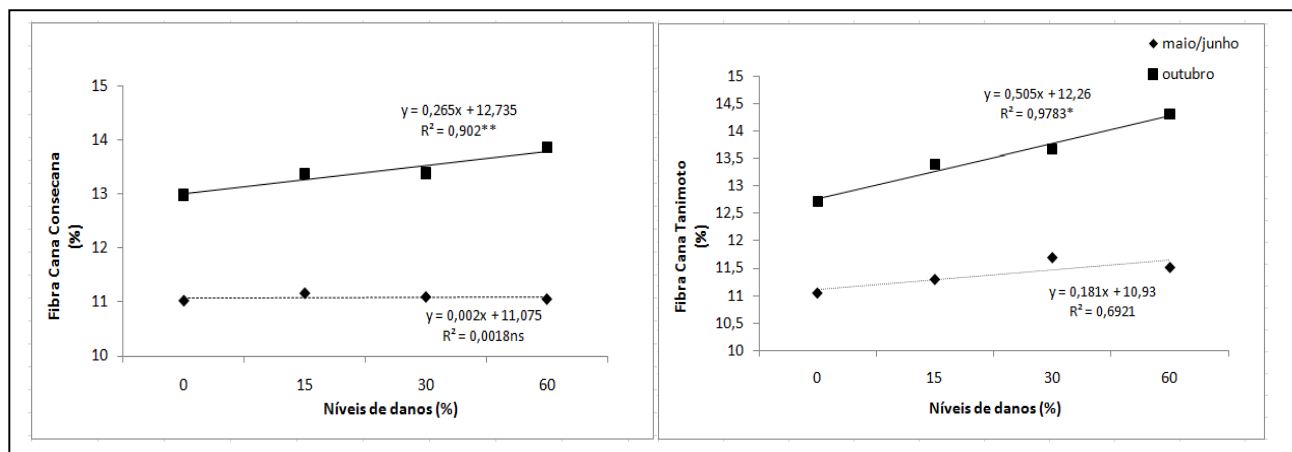


Figura 6: Efeito dos danos causados por *M. fimbriolata* sobre a fibra da cana, nas duas épocas de colheita.

4.2- Avaliação do Mosto e do Processo fermentativo

Com o aumento dos danos promovidos por *M. fimbriolata* verificou-se discreto aumento nos compostos fenólicos totais no mosto (Tabela 5), principalmente a partir de 30% de dano nos colmos.

Os compostos fenólicos encontram-se entre as principais moléculas de defesa que protegem as plantas contra ataque de insetos e patógenos, pois são adstringentes (TAIZ & ZEIGER, 2004) e atuam como inibidores do metabolismo das leveduras (POLAKOVIC et al., 1992; STUPIELLO, 2002), refletindo em significativas perdas no rendimento alcoólico e alterações na composição do destilado (RAVANELI, 2005). Os resultados observados nesse ensaio corroboram com observações de GODSHALL (1999), que relata que o processo de clarificação do caldo não remove o excesso dessas biomoléculas.

Tabela 5. Resultado da análise de variância (teste de F) e comparação de médias pelo teste de Tukey (5 % de probabilidade) para parâmetros tecnológicos do mosto.

Causas de variação	ART	Acidez total	Comp. Fenólicos Totais
	%	gH ₂ SO ₄ /L	µg/mL
Níveis de danos (A)			
0%	12,71A	1,39A	230,01A
15%	12,47A	1,36A	233,41A
30%	12,39AB	1,43A	249,74A
60%	11,94B	1,48A	254,52A
F	6,09**	1,16ns	3,21*
DMS (Tukey)	0,48	0,17	24,79
Épocas (B)			
maio/junho	11,55B	1,73A	245,96A
Outubro	13,20 ^a	1,10B	237,88A
F	164,61**	181,08**	1,44ns
DMS (Tukey)	0,25	0,09	13,29
A x B	1,24ns	0,39ns	0,06ns
CV	5,71	17,94	15,19

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo

* = significativo ao nível de 5%

** = significativo ao nível de 1%

Houve redução significativa nos Açúcares Redutores Totais (ART) no mosto com o aumento de danos causados pela praga (Tabela 5 e Figura 7), como reflexos da matéria-prima utilizada. Esses resultados enfatizam a necessidade do emprego de matéria-prima de qualidade no processo de industrialização, uma vez que os reflexos desta implicam em reduções significativas na produção e qualidade dos produtos finais.

Com relação às épocas, verificou-se aumento do ART e redução da acidez total na colheita realizada em outubro (Tabela 5). Tais resultados eram esperados, como reflexos da maturação da cana após um período de seca.

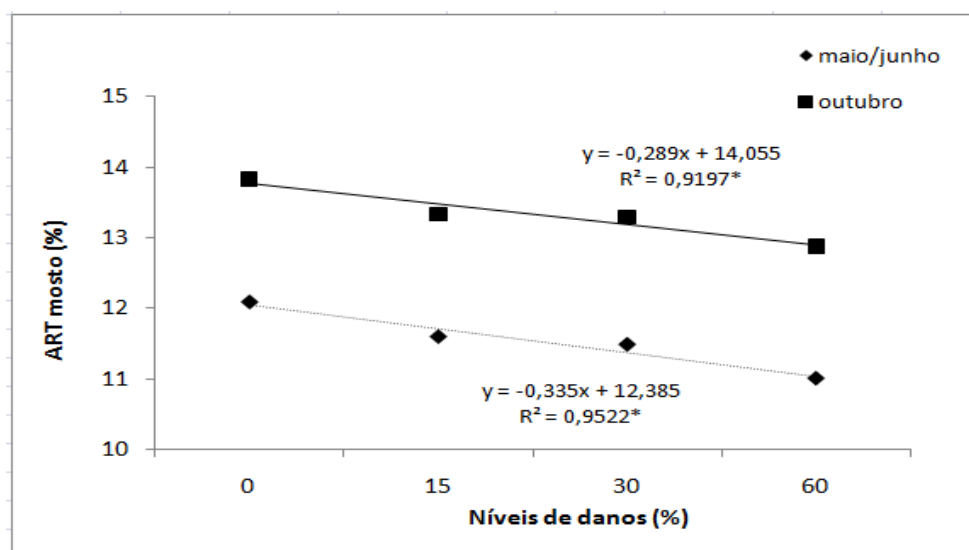


Figura 9: Efeito dos danos causados por *M. fimbriolata* sobre os Açúcares Redutores Totais do mosto (%), nas duas épocas de colheita.

4.2.1 – Comportamento microbiológico

No momento da inoculação do fermento ao mosto ($t=0$), a viabilidade celular média do inóculo era de 98,86%, com 93,44% de brotos viáveis. A partir de 50 minutos de fermentação, verificou-se redução na viabilidade celular de leveduras com o aumento dos níveis de danos causados pela *M. fimbriolata* (Tabela 6).

A queda na viabilidade celular está associada a diversos fatores, tais como disponibilidade de nutrientes e presença de contaminantes, decorrentes da matéria-prima deteriorada. Pesquisas anteriores envolvendo a cigarrinha-das-raízes indicaram resultados semelhantes (GONÇALVES, 2003; RAVANELI et al., 2006) e os atribuíram à redução da qualidade da matéria-prima quando há ataque da praga (DINARDO-MIRANDA et al., 2000 e 2002; GONÇALVES et al., 2003). Nessa pesquisa também foi observada reduções na qualidade da matéria-prima, através da redução dos teores de sacarose e aumento da acidez volátil e dos compostos fenólicos no caldo.

Houve redução da viabilidade celular no decorrer dos ciclos fermentativos, tanto no início quanto ao final do processo (Tabela 6), sendo menores no início do 5º, 7º e ao final do 4º e 6º ciclos. Verificou-se que a limpeza de “fundo de dorna”, realizada ao final do 3º, 5º, 6º, 7º e 8º ciclos, contribuiu em alguns ciclos para a melhoria da viabilidade celular. A queda na viabilidade ao longo dos ciclos possivelmente ocorreu em função do estresse acumulado pela levedura, causado pela presença das biomoléculas inibidoras do processo fermentativo, tais como compostos fenólicos e ácidos e à presença de contaminantes.

No início do processo fermentativo, houve interação significativa entre ciclos e épocas de colheita (Figura 8), onde observou-se maior porcentagem de células viáveis na segunda época, sobretudo a partir do 5º ciclo. Este comportamento pode indicar que, apesar de a matéria-prima ter apresentado maior comprometimento, nesta época a maturação da cultura encontrava-se completa, com menor concentração de ácidos orgânicos, favorecendo a manutenção de células viáveis.

Ao final do processo houve interação significativa entre os fatores níveis de danos e épocas de colheita e ciclos fermentativos e épocas de colheita, as quais também mostram uma porcentagem de células viáveis superior na colheita realizada em outubro (Figuras 9 e 10).

Tabela 6. Resultado da análise de variância (teste de F) e comparação de médias pelo teste de Tukey (5 % de probabilidade) para viabilidade celular de leveduras no início e final do processo fermentativo.

Causas de variação	Viabilidade Celular	Viabilidade Celular
	Início	Final
	%	
Níveis de danos (A)		
0%	70,06A	67,71A
15%	56,49B	49,98B
30%	57,29B	49,83B
60%	48,22C	40,54C
F	52,45**	73,00**
DMS (Tukey)	4,57	4,88
Ciclos (B)		
1	86,62A	79,19A
2	79,54A	55,33B
3	58,04B	54,33BC
4	52,51BC	44,86CD
5	48,41C	52,03BCD
6	53,36BC	43,96D
7	46,26C	48,27BCD
8	49,93BC	47,21BCD
9	51,36BC	50,51BCD
10	54,14BC	44,47D
F	48,42**	24,35**
DMS (Tukey)	8,93	9,53
Épocas (C)		
maio/junho	53,51B	45,92B
Outubro	62,53A	58,11A
F	52,50**	84,09**
DMS (Tukey)	2,46	2,62
A x B	0,60ns	1,24ns
A x C	2,35ns	4,14**
B x C	8,20**	11,59**
A x B x C	1,63*	1,33ns
CV	16,62	19,79

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo

* = significativo ao nível de 5%

** = significativo ao nível de 1%

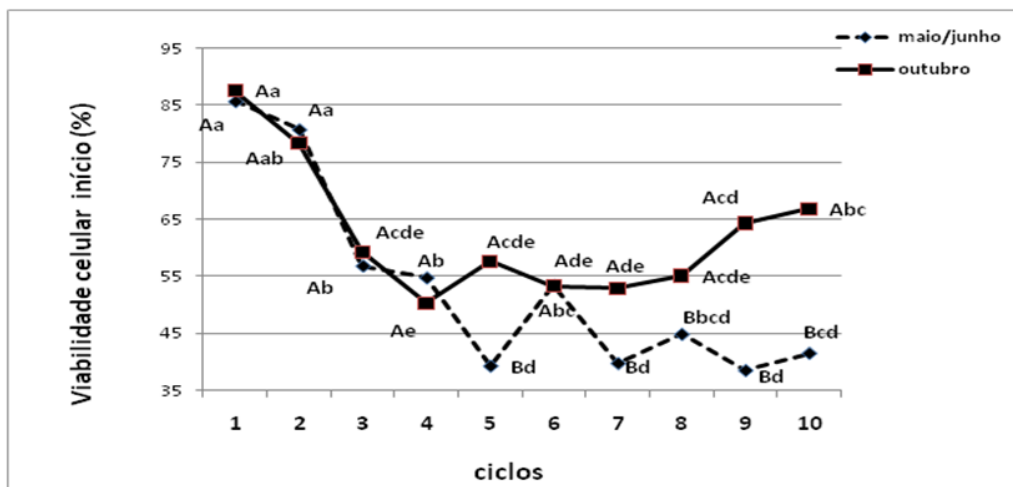


Figura 8: Resultados obtidos para a interação entre ciclos fermentativos e épocas de colheita para Viabilidade Celular de leveduras no início da fermentação. Letras maiúsculas comparam ciclos fermentativos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de ciclos fermentativos. Os resultados correspondem às médias dos quatro níveis de danos causados pela *M. fimbriolata*.

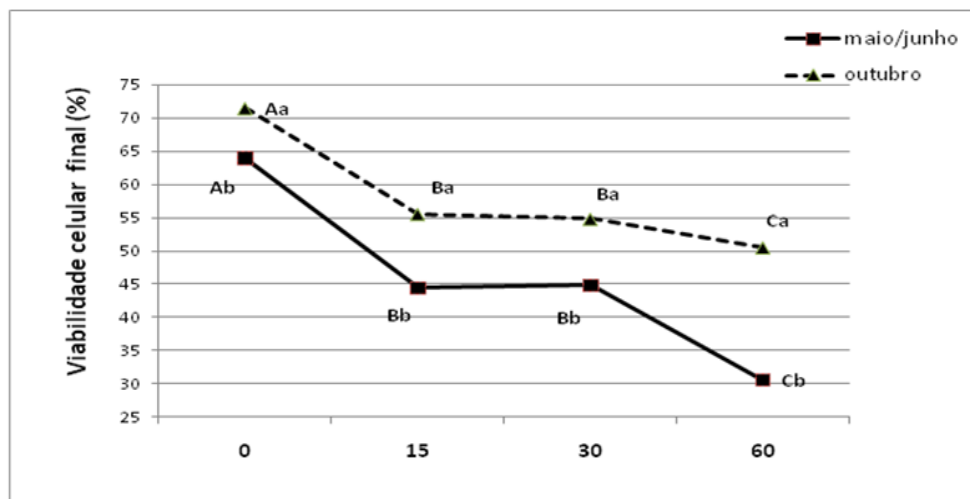


Figura 9: Resultados obtidos para a interação entre níveis de danos e épocas de colheita para Viabilidade Celular de leveduras no final da fermentação. Letras maiúsculas comparam níveis de danos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de níveis de danos. Os resultados correspondem às médias dos dez ciclos fermentativos.

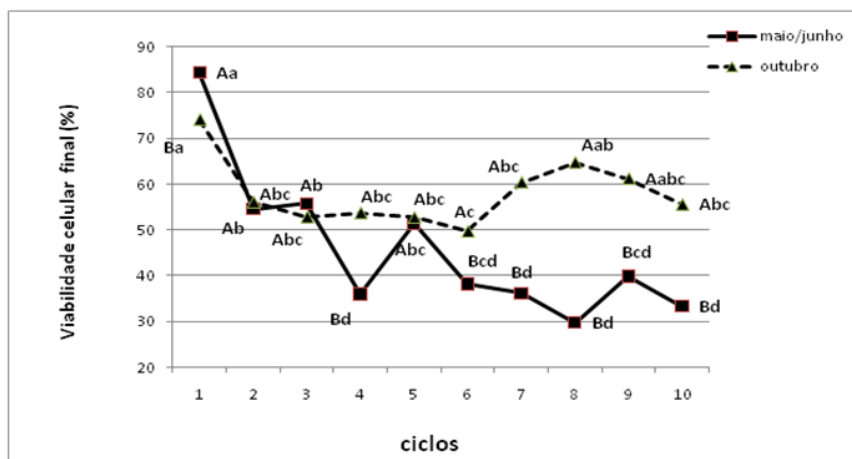


Figura 10: Resultados obtidos para a interação entre ciclos fermentativos e épocas de colheita para Viabilidade Celular de leveduras no final da fermentação. Letras maiúsculas comparam ciclos fermentativos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de ciclos fermentativos. Os resultados correspondem às médias dos quatro níveis de danos causados pela *M. fimbriolata*.

Observou-se diferença significativa na viabilidade de brotos para níveis de infestação no início da fermentação ($t = 50$ minutos), com tendência similar no final do processo (Tabela 7). A porcentagem de células e brotos viáveis durante a fermentação é de extrema importância para a manutenção da população de leveduras, sendo seu monitoramento imprescindível, uma vez que, além de metabólitos indesejáveis contidos na matéria-prima, compostos tóxicos às leveduras que são produzidos durante a fermentação podem acumular-se no fermento, promovendo perdas de viabilidade e reduzindo a eficiência industrial (OKOLO et al., 1987).

Para ciclos fermentativos, a viabilidade de brotos também foi variável nos dois períodos avaliados (Tabela 7), sendo que, no início foram menores a partir do 3º ciclo. No final da fermentação, a partir do 2º ciclo verificou-se redução na viabilidade de brotos. Observou-se também que no 6º e 8º ciclos a realização da “limpeza de fundo de dorna” contribuiu para o aumento da viabilidade de brotos nos ciclos subsequentes.

Tabela 7. Resultado da análise de variância (teste de F) e comparação de médias pelo teste de Tukey (5 % de probabilidade) para viabilidade de brotos de leveduras no início e final do processo fermentativo.

Causas de Variação	Viabilidade de Brotos Início	Viabilidade de Brotos Final
	%	
Níveis de danos (A)		
0%	71,25A	65,06A
15%	56,89B	47,94B
30%	51,29B	47,58B
60%	42,11C	37,79C
F	36,31**	37,21**
DMS (Tukey)	7,44	6,83
Ciclos (B)		
1	83,68A	58,43A
2	66,65B	45,56ABC
3	53,71BC	56,76AB
4	50,42C	48,54ABC
5	43,89C	54,77ABC
6	51,35C	45,07BC
7	53,86BC	47,45ABC
8	45,09C	51,69ABC
9	53,05BC	43,09C
10	52,13BC	44,57BC
F	13,29**	3,48**
DMS (Tukey)	14,53	13,33
Épocas (C)		
maio/junho	53,30B	45,58B
Outubro	57,46A	53,61A
F	4,21*	18,67**
DMS (Tukey)	2,33	0,47
A x B	1,59*	0,89ns
A x C	0,39ns	2,82*
B x C	2,49*	4,74**
A x B x C	1,12ns	1,68*
CV	28,33	29,02

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo

* = significativo ao nível de 5%

** = significativo ao nível de 1%

No início da fermentação, a interação entre níveis de danos e ciclos fermentativos foi significativa (Figura 11), indicando que, em todos os ciclos houve redução na viabilidade de brotos com o aumento dos níveis de danos promovidos pela cigarrinha-das-raízes. Também verificou-se interação significativa entre ciclos fermentativos e épocas de colheita (Figura 12), a qual mostra maiores viabilidades de brotos na segunda época, a partir do 7º ciclo.

Ao final do processo, a interação entre níveis de danos e épocas de colheita foi significativa (Figura 13), indicando maior porcentagem de brotos viáveis na colheita realizada em outubro. Da mesma forma, verificou-se através da interação entre ciclos fermentativos e épocas de colheita (Figura 14), que os maiores valores foram obtidos na segunda época, a partir do 6º ciclo.

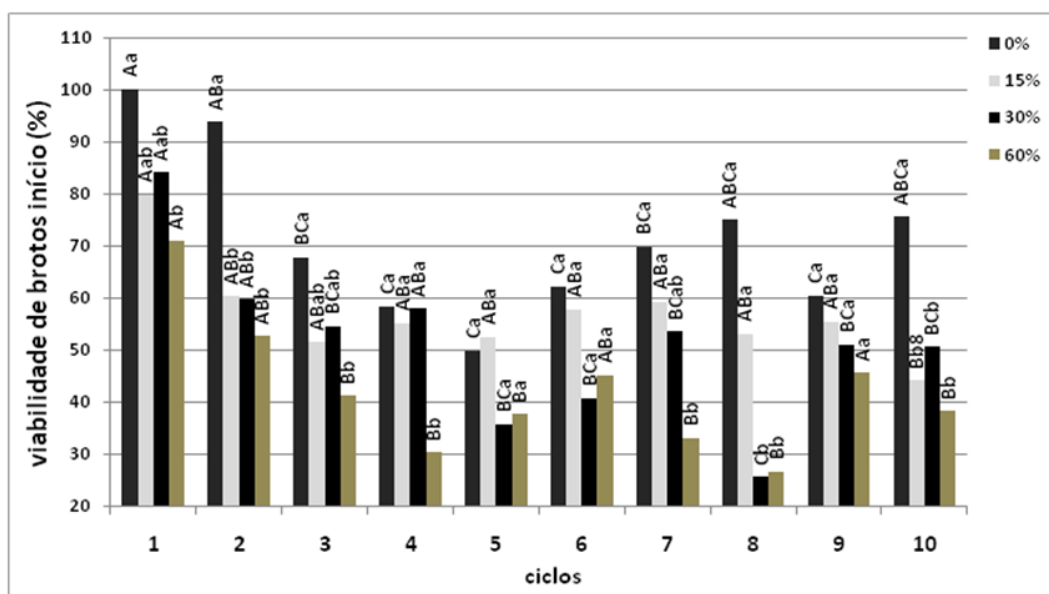


Figura 11: Resultados obtidos para a interação entre níveis de danos e ciclos fermentativos para Viabilidade de brotos de leveduras no início da fermentação. Letras maiúsculas comparam níveis de danos dentro de ciclos fermentativos. Letras minúsculas comparam ciclos fermentativos dentro de níveis de danos. Os resultados correspondem às médias das duas épocas de colheita.

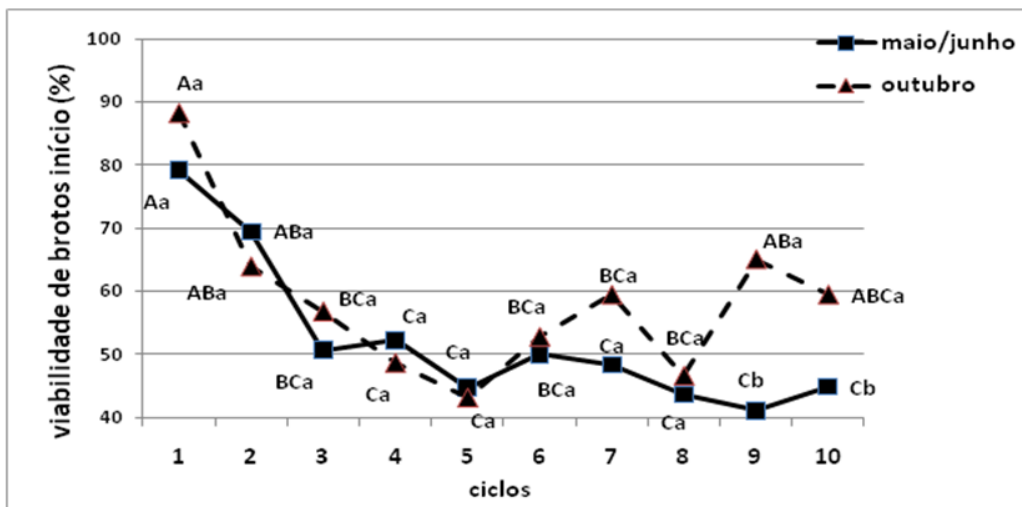


Figura 12: Resultados obtidos para a interação entre ciclos fermentativos e épocas de colheita para Viabilidade de brotos de leveduras no início da fermentação. Letras maiúsculas comparam ciclos fermentativos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de ciclos fermentativos. Os resultados correspondem às médias dos quatro níveis de danos causados pela *M. fimbriolata*.

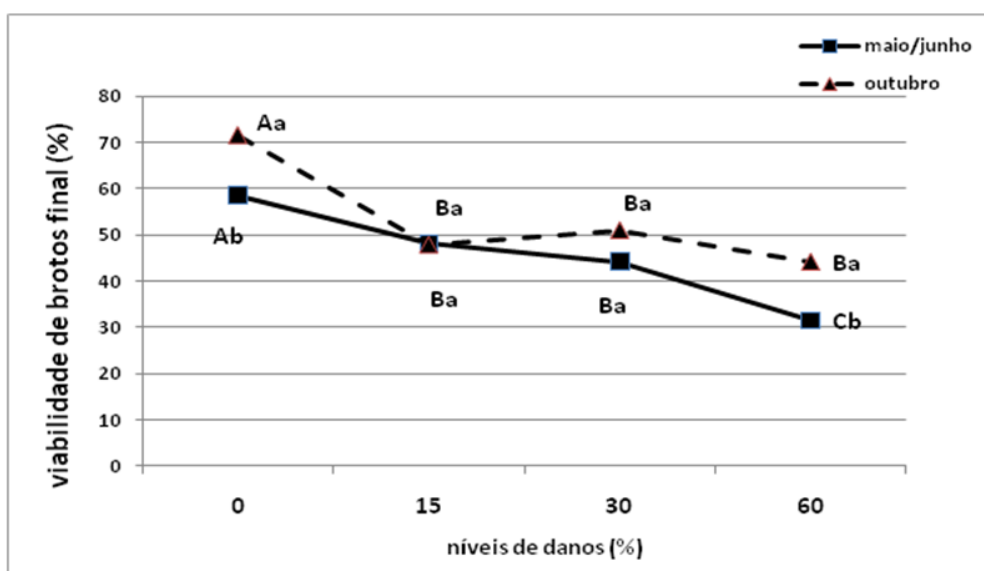


Figura 13: Resultados obtidos para a interação entre níveis de danos e épocas de colheita para Viabilidade de brotos de leveduras no final da fermentação. Letras maiúsculas comparam níveis de danos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de níveis de danos.

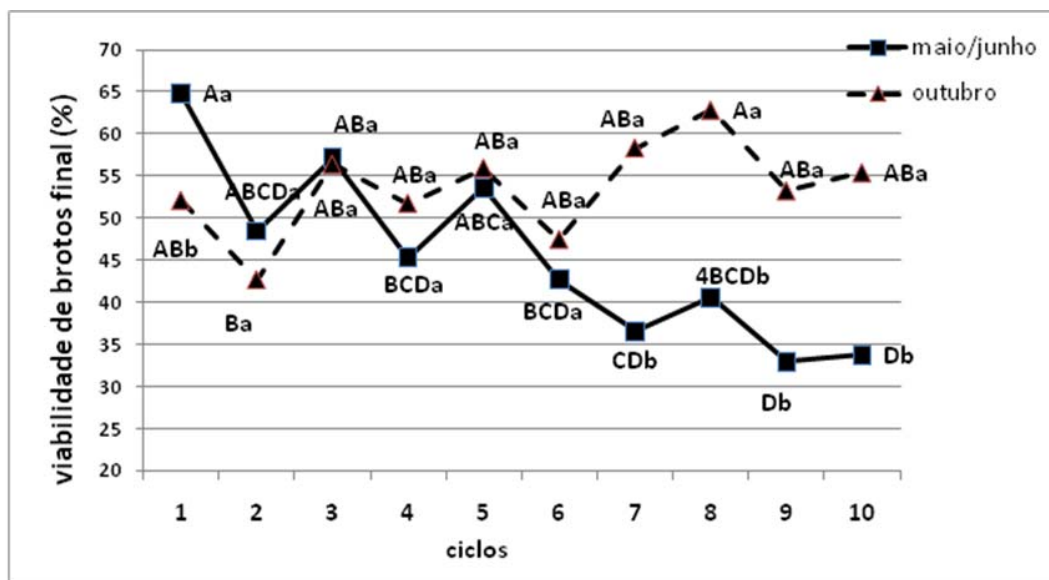


Figura 14: Resultados obtidos para a interação entre ciclos fermentativos e épocas de colheita para Viabilidade de brotos de leveduras no final da fermentação. Letras maiúsculas comparam ciclos fermentativos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de ciclos fermentativos. Os resultados correspondem às médias dos quatro níveis de danos causados pela *M. fimbriolata*.

De maneira geral, os maiores índices de viabilidade celular e de brotos de leveduras foram observados no início da fermentação, como é de se esperar, uma vez que ao final de cada ciclo, o fermento era tratado. A redução no número de células vivas no final do processo pode estar relacionada ao aumento na concentração de metabólitos como etanol, CO₂ e ácidos e redução na quantidade de açúcar e nutrientes do substrato. O acúmulo de etanol intracelular e outros metabólitos presentes no ambiente favorecem a redução da concentração de células de leveduras vivas (STOKES, 1971; HALLSWORTH, 1998). Considerando-se que as leveduras são reutilizadas em ciclos fermentativos posteriores, é de extrema importância a presença de células e brotos viáveis ao final da fermentação para manter a porcentagem de fermento estável na dorna (AMORIM et al. 1996).

Similarmente à viabilidade celular e de brotos, houve redução significativa no índice de brotamentos com o aumento dos danos causados pela cigarrinha-das-raízes (Tabela 8).

O índice de brotamentos de leveduras apresentou-se superior a partir do 2º ciclo, tanto no início quanto ao final do processo. Segundo Nagodawithana et al. (1974), citado por MUTTON (1998), com a intensificação da fermentação, ocorre a elevação da temperatura, levando ao aumento da atividade metabólica das leveduras, e conseqüentemente aumentando o brotamento. AMORIM et al. (1996) relatam que a porcentagem ideal de brotamentos varia entre 5 a 15%, sendo que valores acima deste são indicativos de aumento da temperatura, ou baixa manutenção do fermento nas dornas. Como neste ensaio a temperatura das fermentações era controlada, é possível que, ao final do 3º ao 8º ciclos tenha ocorrido morte seguida por reposição celular da população de leveduras, uma vez que a matéria-prima empregada no processo encontrava-se com a qualidade comprometida pelo ataque da cigarrinha-das-raízes. A interação entre ciclos fermentativos e épocas foi significativa ao final da fermentação (Figura 15), indicando aumento no índice de brotamentos na segunda época a partir do 7º ciclo.

Observou-se também maiores valores para viabilidade celular, de brotos e índice de brotamentos de leveduras na segunda época de colheita (Tabelas 6, 7 e 8). Este comportamento pode ser explicado em função da maturação da cana nesta época, que apesar de apresentar maior comprometimento pelo ataque da praga, apresentava maior pureza e menor concentração de ácidos orgânicos, podendo ter favorecido as leveduras durante o processo fermentativo.

Tabela 8 Resultado da análise de variância (teste de F) e comparação de médias pelo teste de Tukey (5 % de probabilidade) para índice de brotamentos de leveduras no início e final do processo fermentativo.

Causas de variação	Brotamentos Início	Brotamentos Final
	%	
Níveis de danos (A)		
0%	18,24A	19,28A
15%	15,84AB	16,32A
30%	13,57BC	16,74A
60%	12,38C	13,04B
F	9,28**	9,49**
DMS (Tukey)	3,12	3,06
Ciclos (B)		
1	10,53DE	7,44B
2	7,38E	8,77B
3	12,44CDE	18,54A
4	15,29ABCD	16,38A
5	13,83BCD	18,41A
6	16,97ABC	17,30A
7	18,73AB	18,79A
8	15,25ABCD	21,20A
9	20,04A	17,84A
10	19,63AB	18,77A
F	9,29**	11,82**
DMS (Tukey)	6,09	13,33
Épocas (C)		
maio/junho	13,79B	14,17B
outubro	16,23A	18,52A
F	8,26*	27,32**
DMS (Tukey)	1,68	0,47
A x B	1,02ns	0,80ns
A x C	1,56ns	2,09ns
B x C	0,93ns	2,51**
A x B x C	0,87ns	1,63*
CV	43,81	39,45

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo

* = significativo ao nível de 5%

** = significativo ao nível de 1%

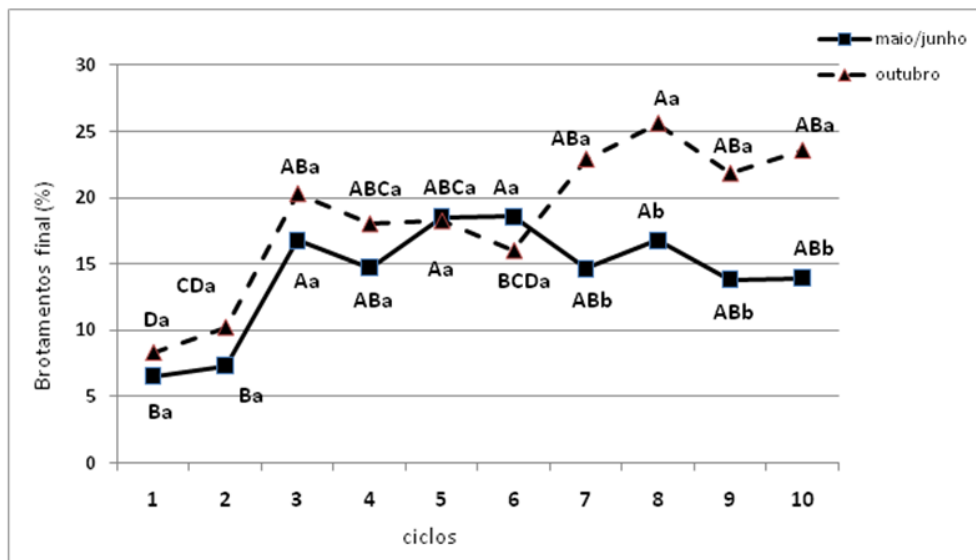


Figura 15: Resultados obtidos para a interação entre ciclos fermentativos e épocas de colheita para índice de brotamentos de leveduras no final da fermentação. Letras maiúsculas comparam ciclos fermentativos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de ciclos fermentativos. Os resultados correspondem às médias dos quatro níveis de danos causados pela *M. fimbriolata*.

A origem dos contaminantes é principalmente o campo, pois muitos microrganismos do solo encontram amplas e favoráveis condições de desenvolvimento na cana (STUPIELLO & HORII; 1981).

As bactérias contaminantes da fermentação alcoólica competem com as leveduras pelo mesmo substrato, consomem açúcares e etanol, produzem ácidos e gomas, diminuindo a viabilidade de leveduras e rendimento do processo (AMORIM & OLIVEIRA, 1982). As bactérias lácticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc* são os principais contaminantes da fermentação alcoólica (NARENDRANATH, 2003), sendo que *Lactobacillus* é adaptada às condições de fermentação, enquanto *Leuconostoc* é mais sensível ao etanol e geralmente não persiste por um longo período no processo fermentativo (OLIVA-NETO & YOKOYA, 2001). As bactérias lácticas também são responsáveis pela floculação das leveduras (YOKOYA & OLIVA-NETO, 2001), levando ao assentamento das leveduras no fundo das dornas, o que dificulta a conversão do açúcar em etanol (Rose et al., 1980, citado por LUDWIG et al., 2001).

Tabela 9. Resultado da análise de variância (teste de F) e comparação de médias pelo teste de Tukey (5 % de probabilidade) para concentração de bactérias contaminantes no início e final do processo fermentativo.

Causas de variação	Concentração Bactérias	Concentração Bactérias
	Início	Final
	cel/mL x 10 ⁸	
Níveis de danos (A)		
0%	2,24C	2,24C
15%	2,25B	2,25B
30%	2,25B	2,25B
60%	2,27A	2,26A
F	17,97**	21,83**
DMS (Tukey)	0,0096	0,0087
Ciclos (B)		
1	2,24B	2,25AB
2	2,25B	2,25AB
3	2,26AB	2,25AB
4	2,25AB	2,25AB
5	2,25AB	2,26A
6	2,26AB	2,24B
7	2,24B	2,24B
8	2,25AB	2,24B
9	2,24B	2,26A
10	2,27A	2,26A
F	2,87**	4,77**
DMS (Tukey)	0,09	0,08
Épocas (C)		
maio/junho	2,25A	2,25A
Outubro	2,26A	2,25A
F	2,26ns	0,0047
DMS (Tukey)	0,0051	1,13ns
A x B	0,97ns	1,35ns
A x C	1,56ns	0,53ns
B x C	3,16**	4,32**
A x B x C	0,46	1,19ns
CV	0,89	0,81

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo

* = significativo ao nível de 5%

** = significativo ao nível de 1%

valores transformados em $\sqrt{x + \alpha}$, sendo $\alpha = 5$.

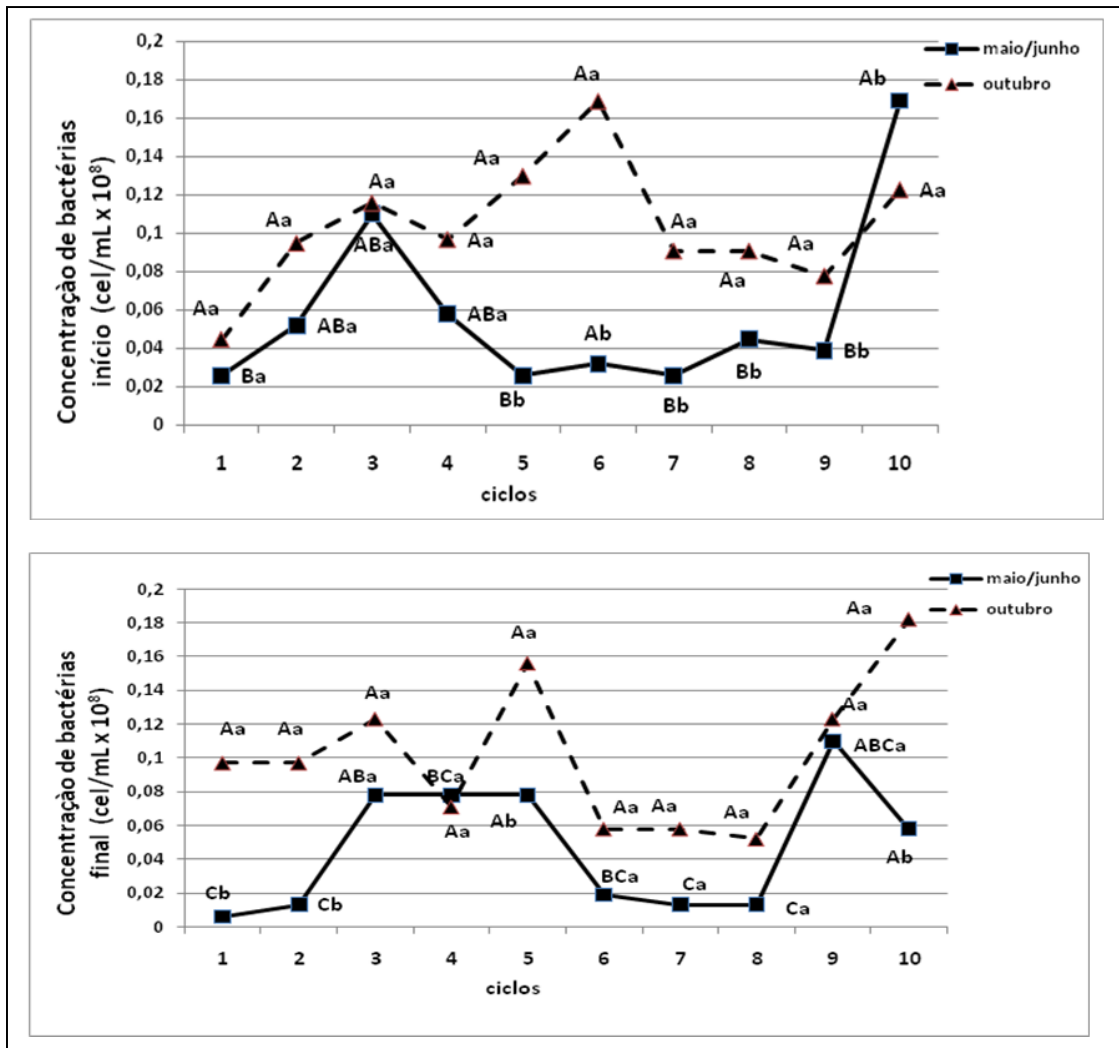


Figura 16: Resultados obtidos para a interação entre ciclos fermentativos e épocas de colheita para concentração de bactérias contaminantes no início e final da fermentação. Letras maiúsculas comparam ciclos fermentativos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de ciclos fermentativos. Os resultados correspondem às médias dos quatro níveis de danos causados pela *M. fimbriolata*.

No início e final das fermentações houve aumento significativo para concentração de bactérias com o aumento dos níveis de dano (Tabela 9), mostrando que a qualidade da matéria-prima empregada no processo contribuiu para o aumento de contaminantes na fermentação.

Com relação aos ciclos fermentativos, houve aumento na contaminação bacteriana a partir do final do 9º ciclo (Tabela 9). Verificou-se que a “limpeza de fundo

de dorna”, realizada nos 3º e 5º ciclos, contribuiu para a redução da concentração de bactérias nos ciclos seguintes. A interação entre ciclos fermentativos e épocas de colheita foi significativa tanto no início quanto ao final da fermentação e indicou que na segunda época de colheita, apesar de mais elevada, não houve diferença quanto a concentração de bactérias durante os dez ciclos (Figura 16).

4.2.2. Características dos microrganismos presentes nas fermentações

A microbiota presente no caldo (Anexos 2 e 3) apresentou características bastante variadas, uma vez que a cana-de-açúcar abriga em seu ecossistema uma elevada diversidade de microrganismos próprios, que constituem uma fonte natural de contaminantes no momento em que as operações de colheita e processamento são realizadas.

Nas duas épocas de colheita, com o aumento dos danos causados por *M. fimbriolata*, houve aumento no número de colônias de leveduras selvagens no caldo e mosto (Anexos 2 e 3 e Figura 17), verificados por meio de contagem em meio WLN. RAVANELI (2005), estudando diferentes níveis de infestação dessa praga, observaram resultados similares.

As colônias observadas ao longo das fermentações apresentavam características variadas quanto à cor, tamanho, textura, elevação e bordo.

No caldo foi observado aumento no número de colônias de bactérias lácticas com o aumento dos danos causados pela praga (Anexos 2 e 3 e Figura 18). Este resultado pode ser confirmado através do aumento na acidez volátil do caldo (Tabela 3), indicando que as bactérias presentes nos tratamentos com maiores danos consumiram parte da sacarose presente, produzindo ácidos orgânicos.

Verificou-se que o processo de clarificação removeu parte dos microrganismos presentes no caldo, principalmente bactérias (Anexos 2 e 3 e Figuras 17 e 18).

No início e final da fermentação, verificou-se maior número de colônias de leveduras quando não houve danos de *M. fimbriolata* nos colmos (Anexos 4 e 5). Tal

comportamento justifica-se através da maior porcentagem de células e brotos viáveis observadas nesse tratamento ao longo dos ciclos fermentativos.

Pôde-se observar que apesar das fermentações terem iniciado com inóculo prensado, houve o desenvolvimento de outras leveduras, possivelmente em função da microbiota presente na cana. Entretanto, durante as fermentações predominaram as colônias verde-claro, com elevação convexa e tamanho, textura e bordos variados.

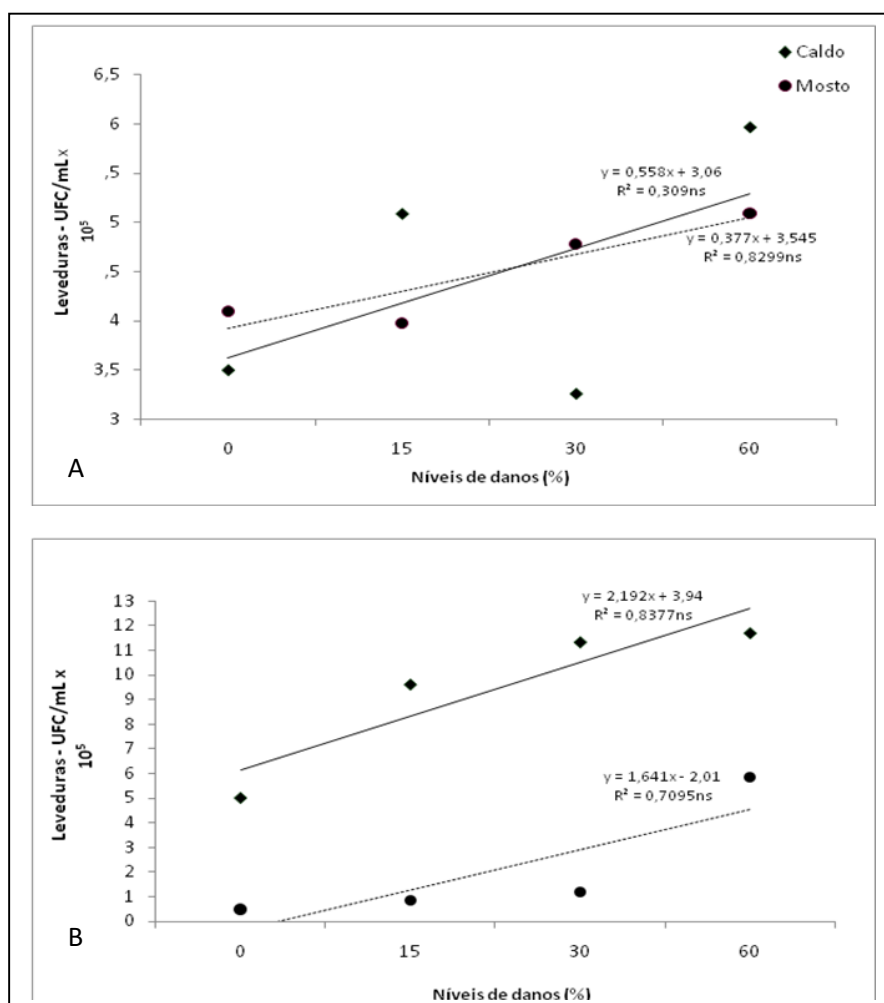


Figura 17: Contagem de colônias de leveduras no caldo e mosto nas duas épocas de colheita. **17A.** Colheita de maio/junho. **17B.** Colheita de outubro.

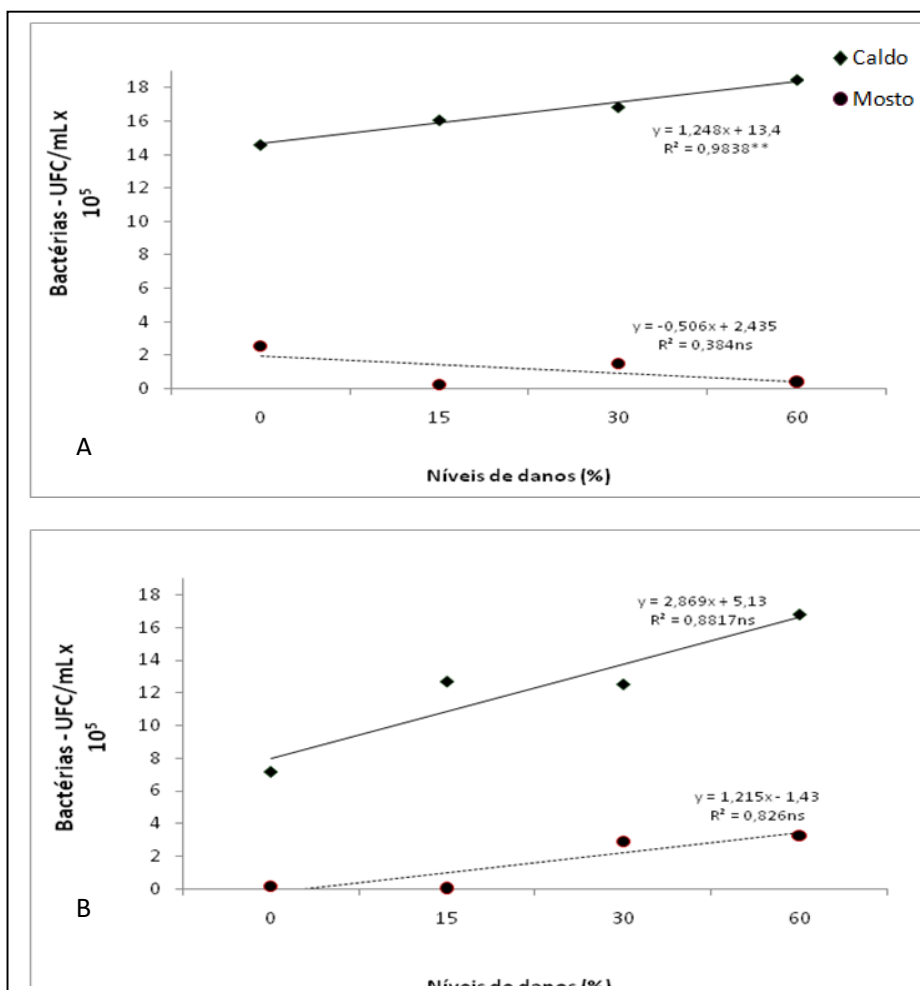


Figura 18: Contagem de colônias de bactérias no caldo e mosto nas duas épocas de colheita. **18A.** Colheita de maio/junho. **18B.** Colheita de outubro.

No meio PCA verificou-se grande número de colônias coloridas, principalmente nas cores amarela, rosa e bege. Porém, as colônias brancas e com bordas lisas predominaram durante as fermentações.

4.2.3. Avaliação da estabilidade das leveduras no processo fermentativo

Foram isoladas 441 colônias de leveduras nos processos fermentativos, sendo 46 e 60; 57 e 50; 56 e 58; e 49 e 63 leveduras para os tratamentos 0, 15%, 30% e 60%,

na primeira e segunda época, respectivamente (Anexo 6). Todas as leveduras isoladas foram submetidas à análise de cariótipo. Foram encontrados 19 perfis entre as leveduras isoladas (Quadro 5 e Figura 29), dentre os quais somente o perfil P1 não diferiu do padrão *Saccharomyces cerevisiae* (Bio Rad) (Figura 19).

No pé-de-cuba, o perfil encontrado foi o P1. Os perfis observados na primeira época de colheita foram P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P12 e P18 (Quadro 6), onde houve predominância do perfil P1 nessas fermentações. Na segunda época, verificou-se uma maior diversidade de leveduras. Os perfis encontrados nessa colheita foram P1, P2, P3, P4, P6, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17 e P19 (Quadro 6). Verificou-se que conforme aumentava o comprometimento da matéria-prima, a diversidade de perfis encontrados nas fermentações também foi maior.

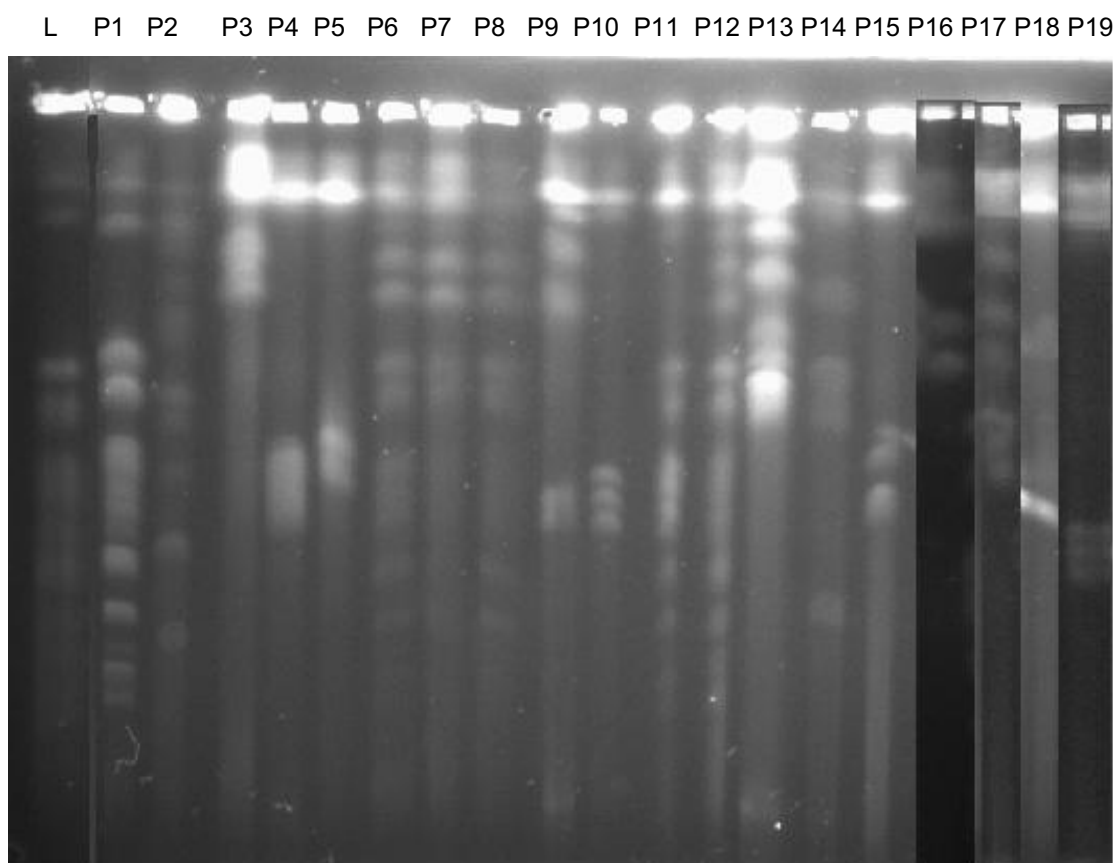


Figura 19: Perfis eletroforéticos encontrados no início e final dos processos fermentativos nas duas épocas de colheita.

Observou-se também que a maioria das leveduras encontradas no início de alguns ciclos não permaneceu até o final, e as encontradas no final da fermentação geralmente não permaneceram ou reduziram sua frequência no início do ciclo seguinte.

As origens dessas leveduras são principalmente o mosto, onde são encontrados muitos gêneros e espécies de leveduras (QUEROL et al., 2003), sendo que a maioria não se mostra adaptada às condições de elevada acidez e teor alcoólico proporcionadas pelo meio fermentativo, ou ainda ao tratamento ácido realizado no pé-de-cuba após cada ciclo de fermentação. Sob esse enfoque, as leveduras P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P13, P14, P15, P16, P17, P18 e P19 parecem ser contaminantes presentes no mosto, uma vez que apresentaram maior ocorrência no período inicial das fermentações. Os perfis P3, P6 e P9 mostraram-se adaptados ao meio fermentativo, uma vez que permaneceram com grande frequência durante as fermentações (Quadros 5 e 6), sendo que por diversas vezes o perfil P3 substituiu totalmente o P1.

De acordo com BASSO et al. (2008), estirpes de leveduras dominantes e persistentes no processo fermentativo devem receber atenção especial pois podem ser competitivas e tolerantes aos estresses impostos pelas fermentações industriais. Esses autores ainda ressaltam que, apesar de apresentarem dominância e persistência no processo, infelizmente a maioria dessas estirpes apresenta características indesejáveis, tais como formação excessiva de espumas, alta taxa de sedimentação durante o processo fermentativo, elevado tempo de fermentação, alta produção de componentes secundários e baixa capacidade de degradar todo o açúcar presente no mosto, de modo que os vinhos apresentam altos teores açúcares residuais.

Diversos estudos utilizam a técnica de PFGE como ferramenta para cariotipagem de leveduras. Entretanto, a maioria encontra-se relacionada à produção de vinhos (IZQUIERDO CANÃS et al., 1997; EGLI et al., 1998; GIUDICI et al. 1998; DEMUYTER et al., 2004) e cachaça (PATARO et al., 2000; BERNARDI et al., 2008). Nestas condições também são observados o desaparecimento de algumas espécies com a intensificação de fatores estressantes no meio, tais como aumento da acidificação e do teor alcoólico. Esse desaparecimento também pode estar relacionado com mudanças

no perfil das leveduras (IBEAS & JIMENES, 1996). Fleet & Heard (1992), citados por QUEROL et al. (2003) relatam que leveduras não-*Saccharomyces* desenvolvem-se bem durante os estágios iniciais da fermentação; entretanto são substituídas por leveduras *Saccharomyces* durante os outros estágios desse processo, uma vez que estas mostram-se mais tolerantes ao etanol.

Quadro 5: Características dos perfis de colônias de leveduras encontrados no início e final dos processos fermentativos.

Perfil	Característica
1	branca, elevação convexa, textura brilhante, diâmetro 1-4mm, bordo liso
2	rosa, elevação convexa, textura brilhante, diâmetro 3-4mm, bordo liso
3	branca, elevação convexa, textura brilhante, diâmetro 1-4mm, bordo liso
4	branca, elevação convexa, textura brilhante, diâmetro 1-4mm, bordo liso
5	branca, elevação convexa, textura brilhante, diâmetro 1-4mm, bordo liso
6	branca, elevação convexa, textura brilhante, diâmetro 1-4mm, bordo liso
7	branca, elevação convexa, textura brilhante, diâmetro 1-4mm, bordo ondulado
8	branca, elevação convexa, textura brilhante, diâmetro 1-4mm, bordo ondulado
9	branca, elevação convexa, textura brilhante, diâmetro 1-4mm, bordo liso
10	branca, elevação convexa, textura brilhante, diâmetro 1-4mm, bordo liso
11	branca, elevação convexa, textura brilhante, diâmetro 1-2mm, bordo liso
12	branca, elevação convexa, textura brilhante, diâmetro 1-4mm, bordo liso
13	branca, elevação convexa, textura brilhante, diâmetro 2-4mm, bordo ondulado
14	branca, elevação convexa, textura brilhante, diâmetro 1-4mm, bordo liso
15	branca, elevação convexa, textura fosca, diâmetro 2-4mm, bordo liso
16	branca, elevação convexa, textura brilhante, diâmetro 1-4mm, bordo ondulado
17	rosa, elevação convexa, textura fosca, diâmetro 1-4mm, bordo liso
18	bege, elevação convexa, textura fosca, diâmetro 1-2mm, bordo liso
19	rosa, elevação convexa, textura brilhante, diâmetro 1-4mm, bordo liso

Com exceção dos perfis P2, P17, P18 e P19, as leveduras encontradas nas fermentações apresentavam coloração branca, elevação convexa, diâmetro entre 1 e 4mm, com textura e bordos diversificados.

Segundo IBEAS & JIMENES (1996), em resposta a condições estressantes também podem ocorrer recombinações entre sequências homólogas presentes em diferentes posições dos cromossomos, além de modificações mitóticas, responsáveis

pela simplificação do cariótipo das leveduras, reduzindo o número de bandas presentes em géis de PFGE. LONGO & VIZINHET (1993) ressaltaram que apesar de esses rearranjos serem em sua maioria indesejáveis, estes também podem constituir uma fonte de variabilidade genética, propiciando uma maior adaptabilidade ao ambiente. Esta observação foi constatada por LUCENA (2004), que verificou alta freqüência de rearranjos cromossômicos em leveduras submetidas a condições de estresse.

Quadro 6: Distribuição dos diferentes perfis de leveduras no início e final do processo fermentativo, na colheita de maio/junho.

	0	15%	30%	60%
INÍCIO	1	P1 (100%)	P1(92,6%); P6(7,4%)	P1 (100%)
	2	P1 (100%)	P1 (100%)	P3 (100%)
	3	P1 (100%)	P1 (100%)	P1 (100%)
	4	P1 (98,75%); P2 (1,25%)	P1 (100%)	P1 (35,6%); P9(64,3%)
	5	P1 (100%)	P1(84,9%); P5(15,1%)	P3 (100%)
	6	P1 (100%)	P1(5,3%); P6(94,7%)	P1 (100%)
	7	P1 (100%)	P1 (100%)	P1(42,5%); P8(57,5%)
	8	P1(90%); P3 (10%)	P1 (19,9%); P6 (80,1%)	P10 (100%)
	9	P1 (28,5%); P2 (14,3%); P4 (57,14%)	P5(35,71%); P7(64,29%)	P3 (100%)
	10	P1 (33,33%); P5 (66,67%)	P1 (100%)	P1(100%)
FINAL	1	P1(100%)	P1(87%); P3(67,2%); P6(24,1)	P1(100%)
	2	P3(100%)	P1(84,2%); P4(13,7%); P9(2,05%)	P3(100%)
	3	P1(100%)	P1(100%)	P1(100%)
	4	P1 (100%)	P1(100%)	P1(14,3%); P9(85,7%)
	5	P1(100%)	P1(100%)	P3(100%)
	6	P1 (85,7%); P2(14,3%)	P1(75%); P12(25%)	P1(100%)
	7	P3(95,8%); P5(4,2%)	P1(100%)	P1(4,3%); P3(95,7%)
	8	P12(100%)	P1(100%)	P1(100%)
	9	P3(20,7%); P18(79,3%)	P1(100%)	P3(100%)
	10	P3(74,7%); P10 (25,3%)	P1(100%)	P1(100%)
				P1(23,6%); P9 (74,3%)

Quadro 7: Distribuição dos diferentes perfis de leveduras no início e final do processo fermentativo, na colheita de outubro.

	0%	15%	30%	60%	
INÍCIO	1	P1 (96,7%); P3(2,3%)	P1(92,6%); P3(7,4%)	P1 (92,3%); P3 (5,2%); P16(2,5%)	P1 (3,17%); P3(3,17%); P9(93,65%)
	2	P1 (100%)	P1 (85,7%); P3(14,3%)	P1 (3,87%); P3(96,13%)	P1(4,44%); P3(95,55%)
	3	P1 (86%); P3(14%)	P1 (8,95%); P3(91,05%)	P1 (79,8%); P3(9,09%); P15(11,1%)	P1(3,78%); P3(96,19%)
	4	P1 (86,5%); P3 (13,5%)	P1 (4,08%); P2 (27,55%); P3 (68,37%)	P1 (43,47%); P4(7,06%); P17(49,5%)	P1 (89,59%); P12(10,4%)
	5	P1 (7,36%); P3(88,9%); P9(2,45%); P12(1,2%)	P1(27%); P3(11,84%); P6(34,47%); P13(26,7%)	P4 (54,8%); P9(34,9%); P19(10,31%)	P1 (42,85%); P9(35,7%);P10(21,43%)
	6	P1 (6,8%); P9(93,2%)	P1(14,3%); P3 (14,3%); P6(71,4%)	P1 (13,7%); P3(27,03%);P4(22,9%); P12(36,3%)	P9 (11,7%); P12(88,3%)
	7	P1 (5,74%); P4(9,2%); P12(85)	P1 (90,8%); P6(9,2%)	P1(37,5%); P3(62,5%)	P1 (6,91%);P3(57,97%); P6(34%); P17(1,1%)
	8	P1(90%); P10 (10%)	P1 (83,92%); P3 (16,07%)	P12(3,42%); P15(97,7%)	P1 (59,19%); P6(0,8%); P17(40%)
	9	P1 (95,8%); P10 (4,2%)	P1(54,9%); P14(45,1%)	P9(67,97%); P15(8,16%); P19(23,9%)	P1(100%)
	10	P1 (78%); P3 (7,69%)	P6 (100%)	P1(12,53%); P2(5,9%); P6(47,3%); P19(34,5%)	P1(2,1%); P6(97,9%)
FINAL	1	P1(68,4%); P12(31,6%)	P1(20%); P6(20%); P9(60%)	P3(100%)	P1(7,43%); P3(14,2%); P13(2,02%); P17(76,35%)
	2	P1(92,3%); P3(7,7%)	P1(100%)	P1(32,2%); P6(67,8%)	P1(14,5%); P13(73,53%)
	3	P3(100%)	P1(86,7%); P3(13,3%)	P1(100%)	P1(100%)
	4	P1(100%)	P1(100%)	P1(88,1%); P3(11,9%)	P1(19,45%); P3(78,64%); P12(1,9%)
	5	P1(100%)	P1(25%); P3(70%); P6(4,2%)	P1(25%); P9(75%)	P1(100%)
	6	P1(100%)	P1(93,3%); P19(6,7%)	P1(100%)	P1(8,9%); P6(89,5%); P9(1,38%)
	7	P1(100%)	P3(60%); P11(40%)	P1(17,34%); P3(20,72%); P6(61,94%)	P1(10,35%); P6(89,65%)
	8	P1(100%)	P1(100%)	P1(4,2%); P3(93,8%)	P1(71,2%); P4(25,45%); P6(3,33%)
	9	P1(100%)	P1(5,03%); P6(5,75%); P17(89,2%)	P1(27,3%); P6(72,7%)	P1(85,8%); P6(17,5%)
	10	P1(34,3%); P3(65,7%)	P1(1,6%); P6(98,4%)	P1(4,85%); P6(25,8%); P12(69,35%)	P1(11,97%); P6(3,42%); P11(84,61%)

A análise dos sistemas enzimáticos glicose 6-fosfato desidrogenase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e álcool desidrogenase encontram-se nas Figuras 30, 31 e 32.

A isoenzima glicose 6-fosfato desidrogenase encontra-se envolvida na produção de NADPH durante a via da pentose monofosfato, conferindo proteção às células contra estresses oxidativos. Observou-se a presença de 3 grupos, sendo que a levedura P1 diferiu-se das demais, com o perfil P16 sendo o mais próximo, com 50% de similaridade. Já os perfis P2 e P8, P3, P6, P7 e P10 e P13, P14 e P19 apresentaram 100% de similaridade entre si (Figura 20). Dentre todos os perfis, somente o P18 não apresentou a produção dessa isoenzima e, juntamente com os perfis P15 e P17, diferiram-se totalmente da levedura padrão P1.

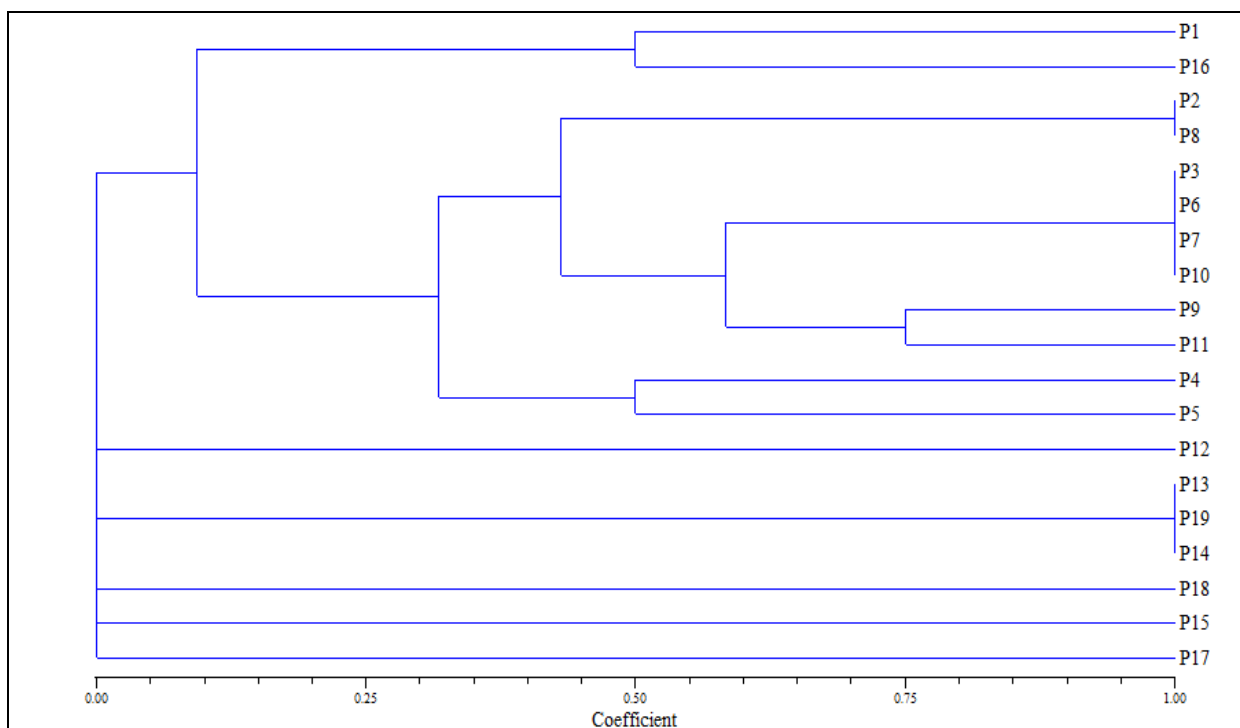


Figura 20: Dendrograma para análise do sistema enzimático glicose 6 fosfato desidrogenase.

Para gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (Figura 21), observou-se a presença de vários grupos distintos, nos quais os perfis P6 e P7 apresentaram 100% de similaridade entre si; enquanto os perfis P1 e P8 também apresentaram 50% de

similaridade entre si. Os perfis P4, P10, P11, P15, P16 e P18 não apresentaram atividade enzimática.

Com relação à álcool desidrogenase também observou-se a presença de vários grupos (Figura 22), sendo que os perfis P6 e P7 novamente apresentaram 100% de similaridade entre si e 50% de similaridade com o perfil P4. Os perfis P1 e P8 novamente apresentaram 60% de similaridade entre si enquanto as leveduras P3 e P5 apresentaram 50% de similaridade. Verificou-se também que os perfis P2, P16 e P17 diferiram-se totalmente dos demais. Todas as leveduras apresentaram essa atividade enzimática, o que indica que são produtoras de etanol.

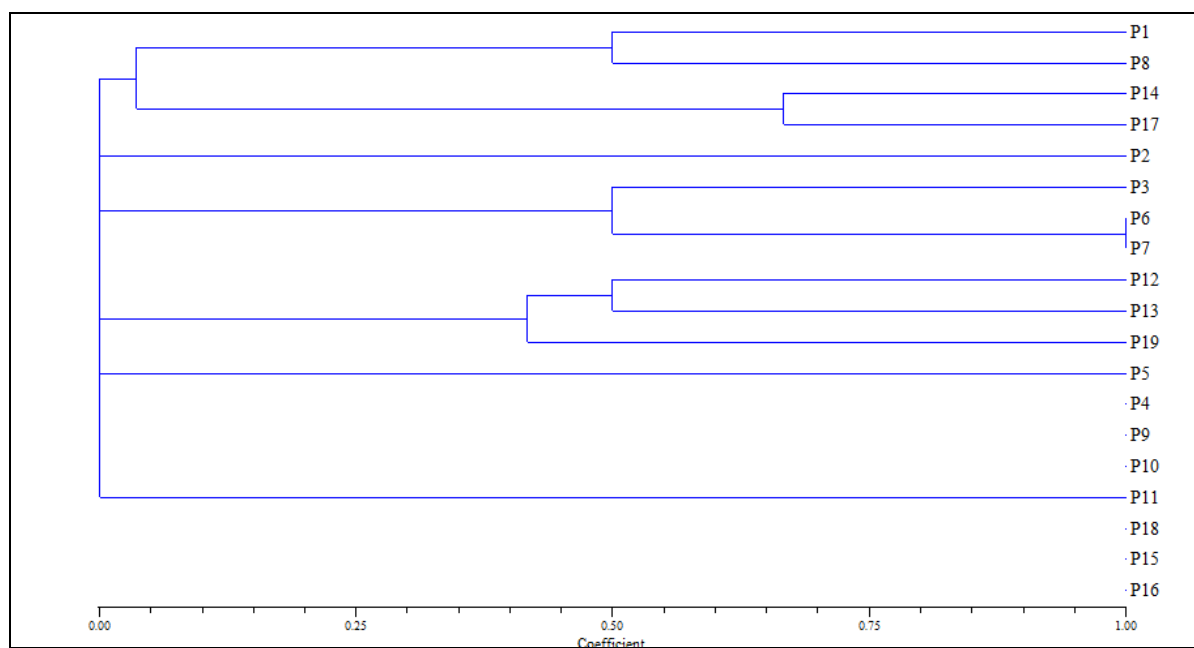


Figura 21: Dendrograma para análise do sistema enzimático gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

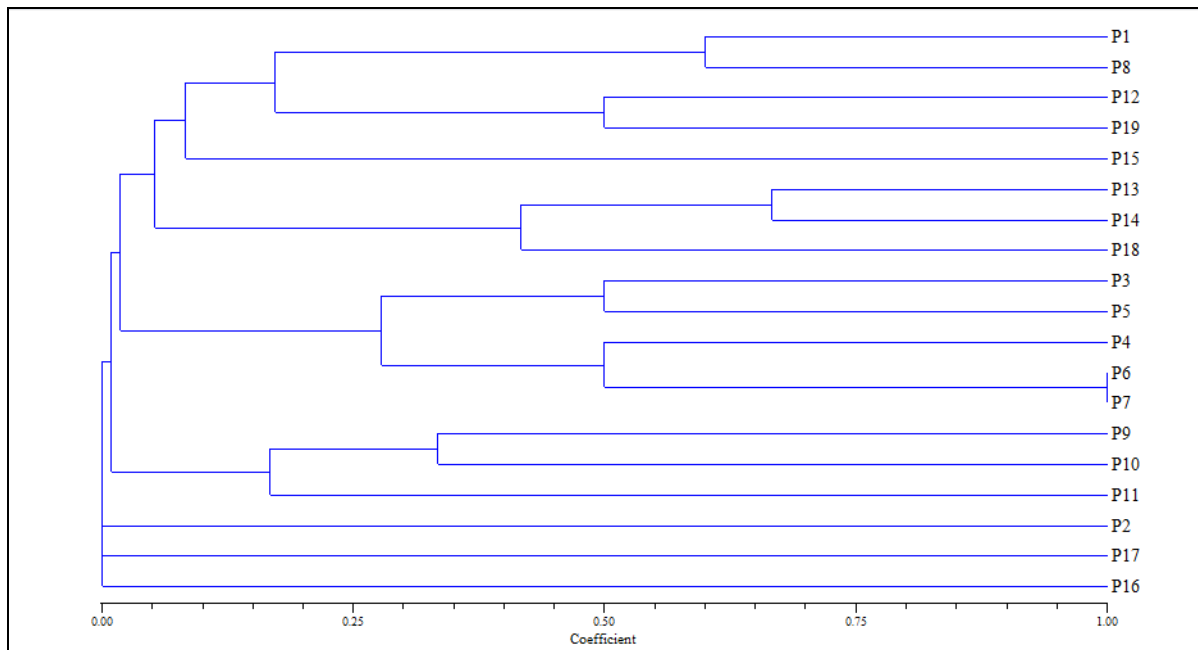


Figura 22: Dendograma para análise do sistema enzimático álcool desidrogenase.

Comparando-se todos os sistemas enzimáticos, verificou-se graus distintos de polimorfismo entre os perfis, sendo que o P6 e P7 foram os únicos a apresentarem 100% de similaridade. Também observou-se que nenhum dos perfis é similar ao P1 (*S. cerevisiae*), apenas o P8 apresentou cerca de 35% de similaridade. Os perfis P16 e P18 não apresentaram nenhum grau de similaridade com os demais (Figura 23).

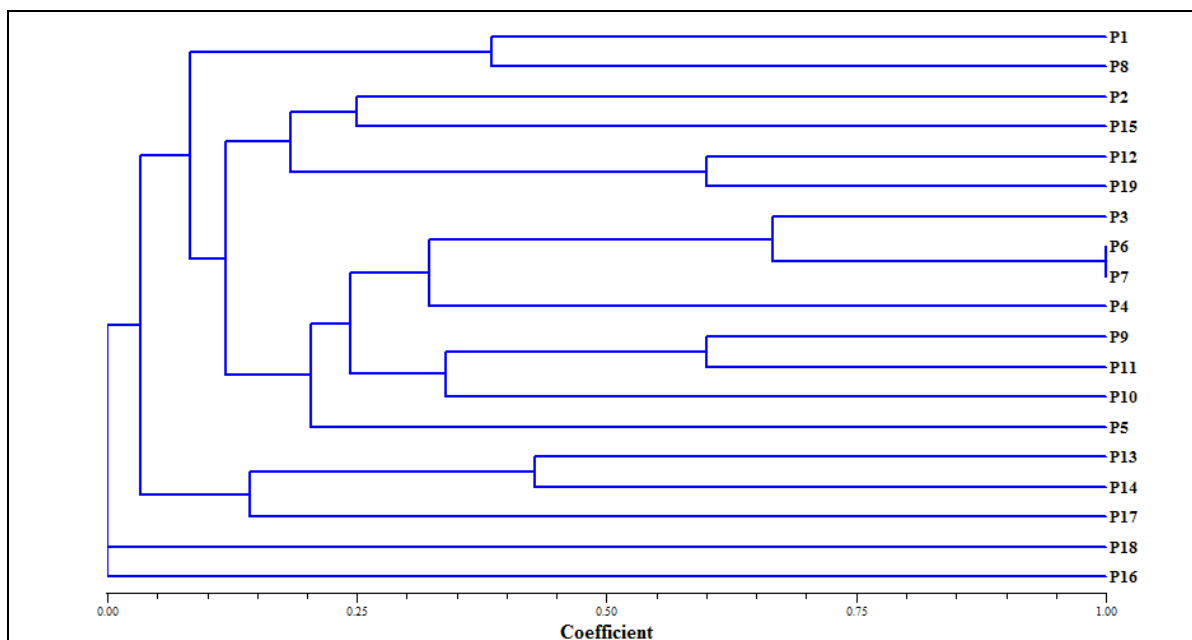


Figura 23: Dendrograma para análise de todos os sistemas enzimáticos.

4.3 - Avaliação do Vinho e Destilado

Verificou-se redução no pH dos vinhos a partir a partir do 7º ciclo fermentativo (Tabela 10 e Figura 24) e concomitante aumento da população de bactérias contaminantes ao final da fermentação (Quadros 3 e 4). Para acidez total, verificaram-se maiores valores no 4º e 5º ciclo, enquanto a produção de glicerol não foi influenciada pelo ataque da praga, como já relatado por GONÇALVES (2003) e RAVANELI (2005). Em relação aos níveis de danos, observou-se discreto aumento na acidez total e redução do pH quando a matéria-prima foi comprometida pelo ataque da praga (Tabela 10).

Constatou-se aumento significativo para Açúcares Redutores Residuais Totais nos vinhos quando houve comprometimento dos colmos (Tabela 10). Tal comportamento era esperado, tendo em vista que a matéria-prima empregada apresentava elevados acidez e teores de compostos fenólicos. Essas substâncias, segundo NARENDRANATH et al (2001) e POLAKOVIC et al. (1992), atuam como inibidores do metabolismo das leveduras, comprometendo o processo de degradação dos açúcares e produção de etanol.

Tabela 10. Resultado da análise de variância (teste de F) e comparação de médias pelo teste de Tukey (5 % de probabilidade) para análises tecnológicas do vinho.

Causas de variação	pH	Acidez Total	Glicerol	ARRT
		g/L	mg/100mL	%
Níveis de danos (A)				
0%	3,41A	2,32A	11,67A	1,19B
15%	3,35A	2,38A	12,07A	1,75A
30%	3,41A	2,37A	11,10A	1,41AB
60%	3,36A	2,50A	11,29A	1,57A
F	1,32ns	0,69ns	2,01ns	5,59**
DMS (Tukey)	0,1	0,33	1,12	0,37
Ciclos (B)				
1	3,43A	2,30B	11,07CD	0,55D
2	3,59A	2,16B	9,50D	0,47D
3	3,41ABC	2,17B	10,81BCD	1,15CD
4	3,39BCD	2,64AB	11,18ABCD	1,49BC
5	3,44ABC	3,17A	12,88AB	1,59BC
6	3,50AB	2,34B	12,06ABC	1,81ABC
7	3,34BCD	2,43B	10,54CD	1,39BC
8	3,23D	2,25B	12,00ABC	2,05AB
9	3,27CD	2,13B	13,06A	1,89AB
10	3,22D	2,35B	12,21ABC	2,43A
F	7,78**	4,70**	5,32**	15,28**
DMS (Tukey)	0,05	0,66	2,18	0,72
Épocas (C)				
maio/junho	3,38A	2,33A	9,98B	0,89B
Outubro	3,38A	2,45A	13,08A	2,08A
F	0,002ns	1,77ns	104,28**	139,63**
DMS (Tukey)	1,68	0,18	0,6	0,19
A x B	0,15ns	0,78ns	1,19ns	2,02**
A x C	1,07ns	0,061ns	0,20ns	1,17ns
B x C	2,44*	1,17ns	3,05**	3,52**
A x B x C	0,30ns	0,48ns	0,68ns	1,65*
CV	6,16	29,56	20,42	52,69

ARRT = Açúcares Redutores Residuais Totais

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo

* = significativo ao nível de 5%

** = significativo ao nível de 1%

Houve também significativo aumento a partir do 4º ciclo para açúcares redutores residuais totais, enquanto a produção de glicerol foi variável entre os ciclos fermentativos (Figura 26), com maiores concentrações desses compostos na colheita realizada em outubro, principalmente a partir do 8º ciclo.

Em todos os ciclos verificou-se maior porcentagem de açúcares residuais nos vinhos quando havia comprometimento dos colmos (Figura 25). Este comportamento é resultante do estresse sofrido pelas leveduras devido ao comprometimento da matéria-prima e às condições de fermentação, na qual há aumento da acidez e da concentração do etanol, que levaram a um aumento do tempo de fermentação e menor consumo de açúcares do substrato.

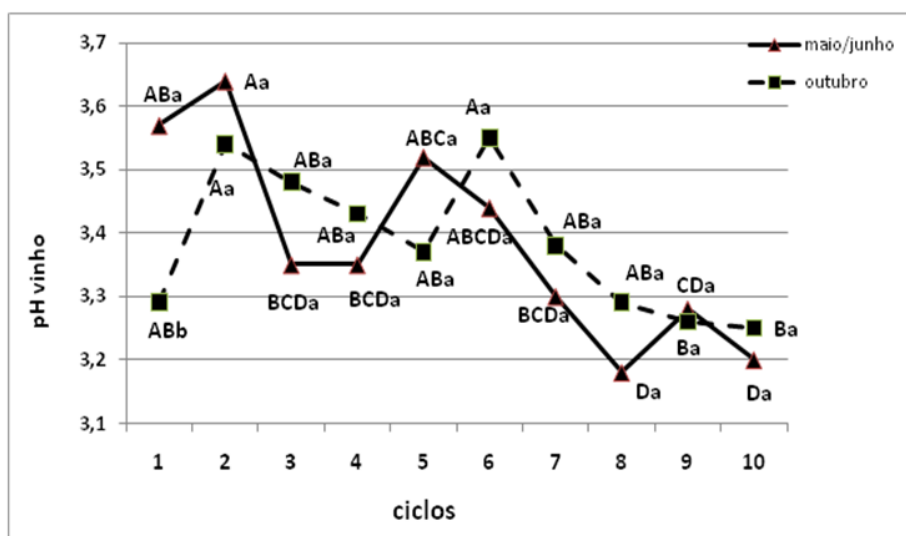


Figura 24: Resultados obtidos para a interação entre ciclos fermentativos e épocas de colheita para pH dos vinhos. Letras maiúsculas comparam ciclos fermentativos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de ciclos fermentativos. Os resultados correspondem às médias dos quatro níveis de danos causados pela *M. fimbriolata*.

Segundo MUTTON & MUTTON (2002), o reflexo direto da qualidade da matéria-prima pode ser observado no processo fermentativo, uma vez que é diretamente afetado pelos componentes do caldo. Portanto, é de grande importância o conhecimento do comportamento das leveduras fermentadoras quando inoculadas em

mosto proveniente de canas estressadas ou injuriadas. Nesse estudo verificou-se que os danos causados pelo ataque da praga na cana-de-açúcar influenciaram negativamente o processo fermentativo, resultando em vinhos com maior acidez e açúcares residuais (Tabela 10) e menores teores alcoólicos, reduzindo a eficiência da fermentação (Tabela 11).

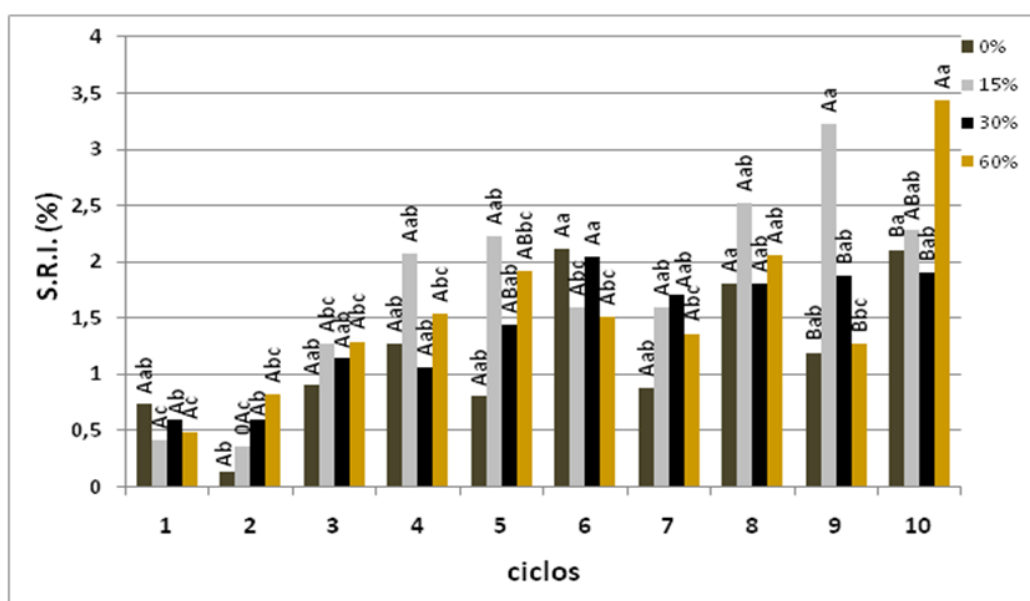


Figura 25: Resultados obtidos para a interação entre ciclos fermentativos e épocas de colheita para Açúcares Redutores Residuais Totais. Letras maiúsculas comparam ciclos fermentativos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de ciclos fermentativos. Os resultados correspondem às médias dos quatro níveis de danos causados pela *M. fimbriolata*.

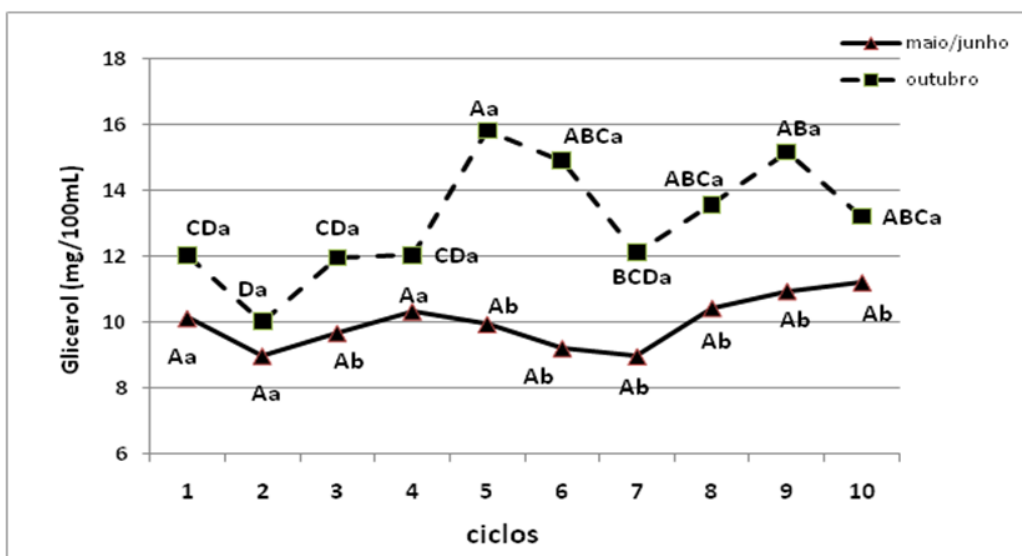


Figura 26: Resultados obtidos para a interação entre ciclos fermentativos e épocas de colheita para glicerol dos vinhos. Letras maiúsculas comparam ciclos fermentativos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de ciclos fermentativos. Os resultados correspondem às médias dos quatro níveis de danos causados pela *M. fimbriolata*.

Observaram-se reduções de 13,82% no teor alcoólico dos vinhos e 8,4% na eficiência da fermentação quando empregou-se 60% de colmos danificados pela cigarrinha-das-raízes (Tabela 11 e Figura 27). Resultados semelhantes foram obtidos por GONÇALVES (2003) que relata que quanto menos danificada a planta, maior a quantidade de açúcares e conseqüentemente melhor o rendimento da fermentação.

RAVANELI (2005) verificou interferência dos compostos fenólicos sobre o metabolismo das leveduras, com reduções de 7,2% no teor alcoólico dos vinhos quando o nível de infestação da cigarrinha-das-raízes era superior a 2,5 ninfas/m. Também BLUMER (1992), avaliando o efeito do complexo broca-podridão sobre o processo fermentativo, também observou significativas reduções na eficiência da fermentação quando o índice volumétrico da infestação era superior a 5%.

Observou-se também redução no teor alcoólico e na eficiência da fermentação a partir do 7º ciclo fermentativo (Tabela 11), sobretudo nos tratamentos com maior porcentagem de danos (Figuras 28 e 29).

Tabela 11. Resultado da análise de variância (teste de F) e comparação de médias pelo teste de Tukey (5 % de probabilidade) para análises tecnológicas do vinho.

Causas de variação	Teor	Eficiência
	Alcoólico	Fermentativa
	% v/v	%
Níveis de danos (A)		
0%	6,15A	77,30A
15%	5,82B	73,91AB
30%	5,88B	74,93AB
60%	5,30C	71,64C
F	23,90**	4,88**
DMS (Tukey)	0,26	3,90
Ciclos (B)		
1	6,13AB	77,99AB
2	6,29A	81,71A
3	6,06AB	78,09AB
4	6,11AB	77,75AB
5	6,1AB	78,81A
6	5,83AB	75,11ABC
7	5,7BC	70,56BCD
8	5,27CD	67,78CD
9	5,17D	67,12D
10	5,2CD	69,57CD
F	5,24*	9,68**
DMS (Tukey)	0,52	7,62
Épocas (C)		
maio/junho	5,71B	78,50A
Outubro	5,87A	70,39B
F	5,24*	58,32**
DMS (Tukey)	0,14	2,09
A x B	2,49**	2,07**
A x C	7,54**	5,41**
B x C	2,29*	1,73ns
A x B x C	2,77*	1,70**
CV	9,64	11,05

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo

* = significativo ao nível de 5%

** = significativo ao nível de 1%

Para épocas, apesar de na colheita de maio/junho os vinhos apresentarem menores teores alcoólicos, a eficiência da fermentação foi maior (Tabela 11). Tal comportamento pode ter ocorrido em função da época em que a matéria-prima foi processada, uma vez que a porcentagem de açúcares no mosto foi menor na primeira época. Entretanto, nessa época, os colmos apresentavam danos menos evidenciados, permitindo que as leveduras metabolizassem maior quantidade de açúcar para produzir etanol.

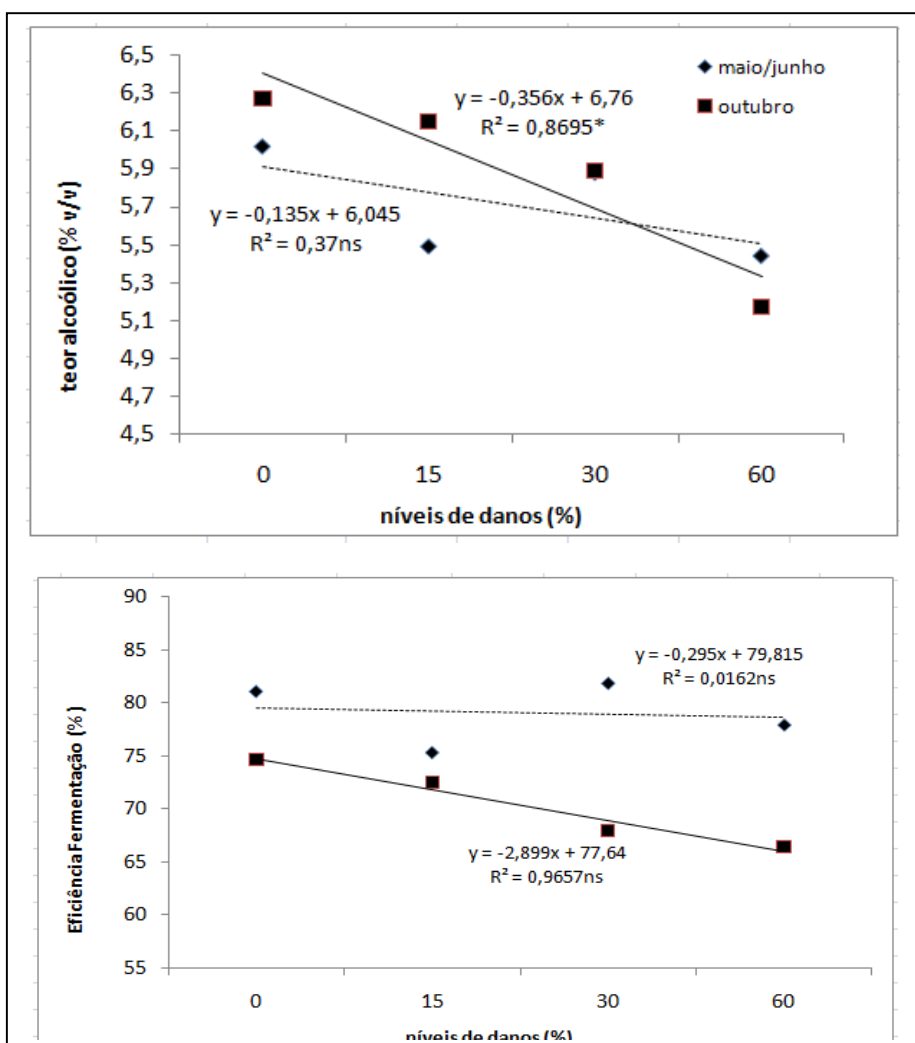


Figura 27: Efeito dos danos causados por *M. fimbriolata* sobre teor alcoólico dos vinhos e eficiência da fermentação nas duas épocas de colheita. Os resultados correspondem às médias dos dez ciclos fermentativos.

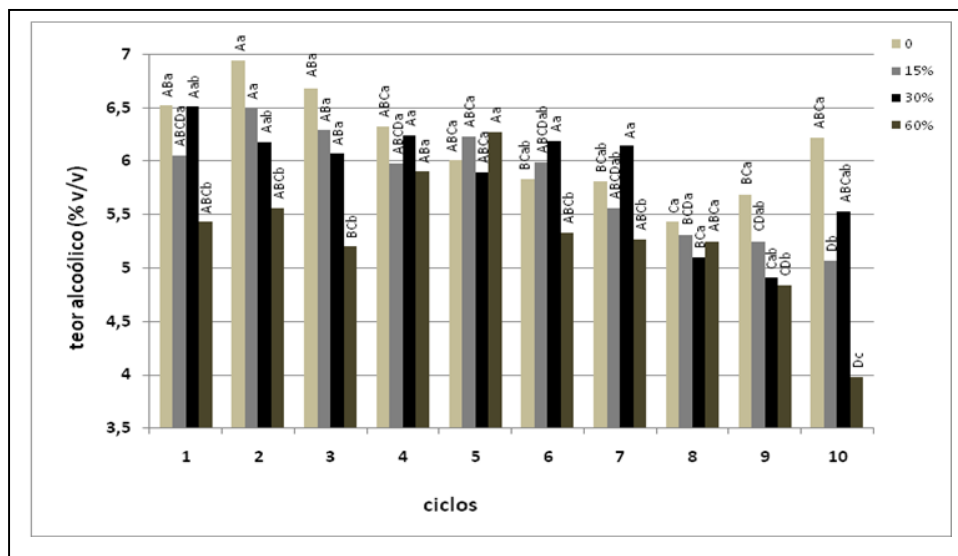


Figura 28: Resultados obtidos para a interação entre níveis de danos e ciclos fermentativos para teor alcoólico dos vinhos. Letras maiúsculas comparam níveis de danos dentro de ciclos fermentativos. Letras minúsculas comparam ciclos fermentativos dentro de níveis de danos. Os resultados correspondem às médias dos quatro níveis de danos causados pela *M. fimbriolata*.

Para o tratamento em que foram empregados 60% de colmos danificados, verificou-se maior teor alcoólico dos vinhos na primeira época de colheita, em relação à segunda (Figura 30), uma vez que na colheita realizada em outubro os danos da praga comprometeram significativamente a matéria-prima e o processo fermentativo.

Na interação entre ciclos fermentativos e épocas de colheita (Figura 31), observou-se o mesmo comportamento relatado anteriormente, no qual, apesar de na colheita realizada em outubro os teores alcoólicos dos vinhos serem maiores, a eficiência da fermentação foi menor. Esses resultados, quando comparados com as quantidades de açúcares redutores residuais e glicerol nos vinhos, comprovam que o comprometimento da matéria-prima resulta em inibição do metabolismo das leveduras, que apesar de terem apresentado maior viabilidade nessa época, não foram capazes de metabolizar parte dos açúcares para produzir álcool.

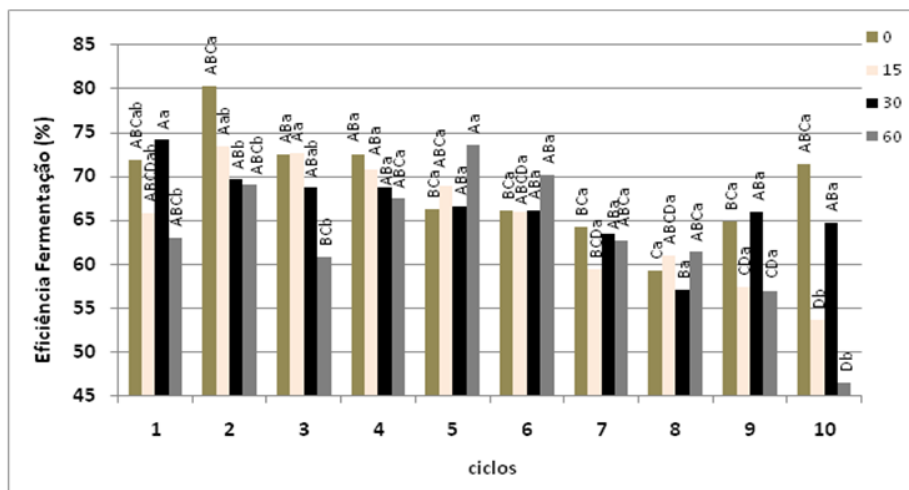


Figura 29: Resultados obtidos para a interação entre níveis de danos e ciclos fermentativos para eficiência da fermentação. Letras maiúsculas comparam níveis de danos dentro de ciclos fermentativos. Letras minúsculas comparam ciclos fermentativos dentro de níveis de danos. Os resultados correspondem às médias das duas épocas de colheita.

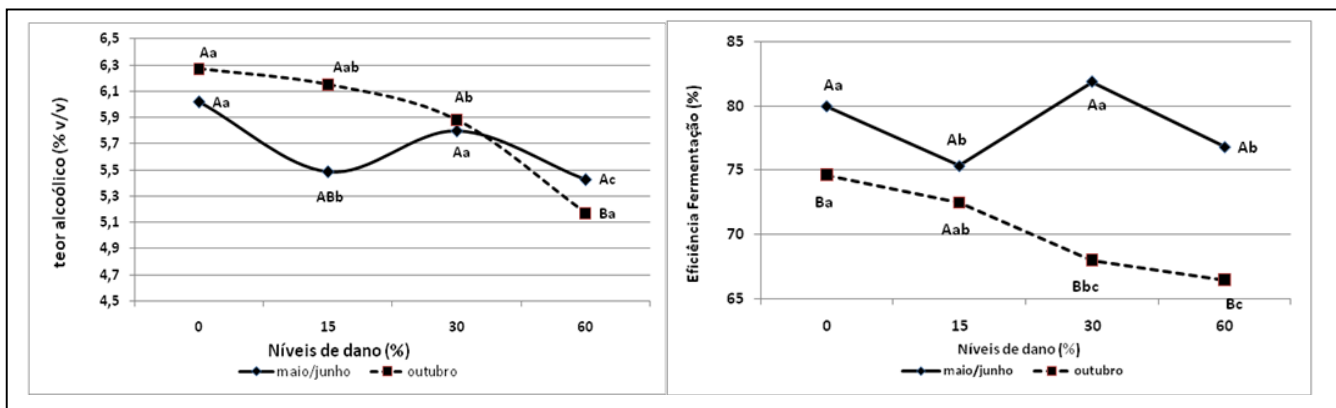


Figura 30: Resultados obtidos para a interação entre níveis de danos e épocas de colheita para teor alcoólico dos vinhos e eficiência da fermentação. Letras maiúsculas comparam níveis de danos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de níveis de danos.

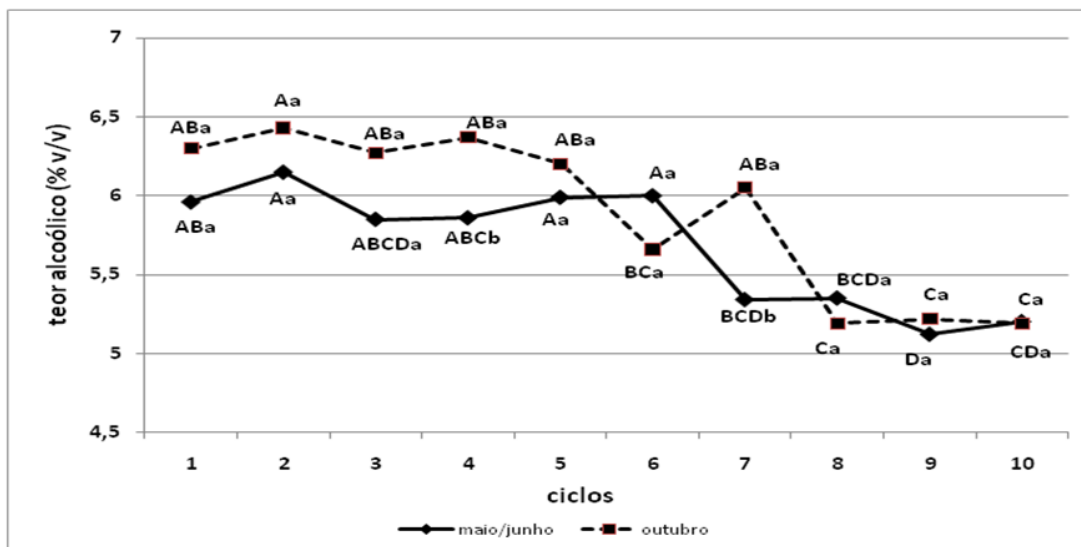


Figura 31: Resultados obtidos para a interação entre ciclos fermentativos e épocas de colheita para teor alcoólico dos vinhos. Letras maiúsculas comparam ciclos fermentativos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de ciclos fermentativos.

Houve aumento na concentração de acetaldeído nos destilados quando empregou-se colmos comprometidos pela cigarrinha no processo fermentativo (Tabela 12), principalmente a partir do 5º ciclo e na colheita realizada em maio/junho. Entretanto, na segunda época, verificou-se aumento na concentração desse composto com o aumento dos danos causados pela cigarrinha-das-raízes na cana (Figura 32). Para a porcentagem de etanol nos destilados, verificou-se comportamento oposto, em que o aumento dos níveis de danos, houve reduções na sua produção, que obteve seu máximo no 2º ciclo (Tabela 12).

Esse comportamento era esperado, uma vez que o acetaldeído é o precursor do etanol na via fermentativa. O ataque da praga resultou em fermentações incompletas, por afetar a qualidade da matéria-prima e a microbiota fermentativa. Resultados similares foram obtidos por RAVANELI (2005).

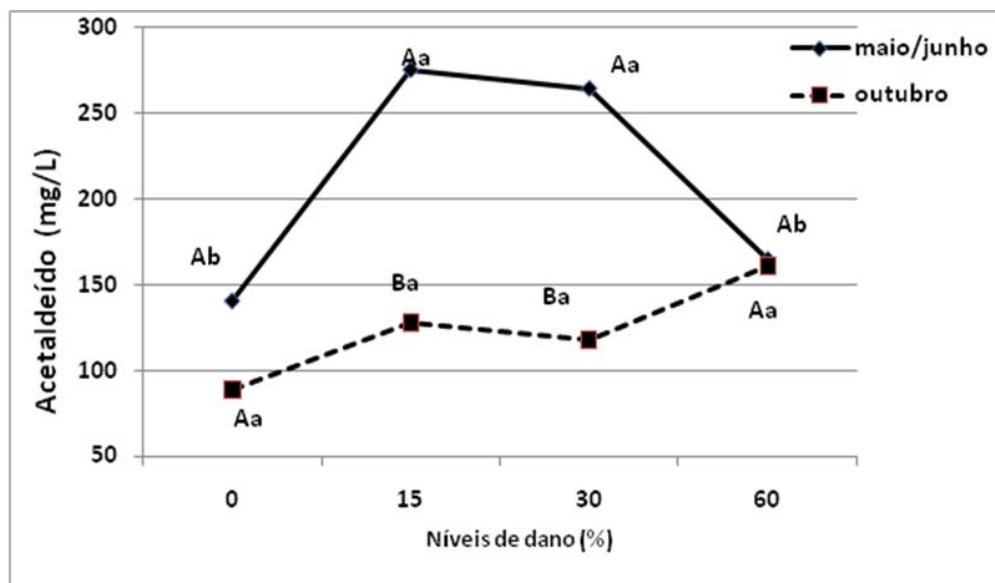


Figura 32: Resultados obtidos para a interação entre níveis de danos e épocas de colheita para teor alcoólico dos vinhos e eficiência da fermentação. Letras maiúsculas comparam níveis de danos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de níveis de danos.

Não se observou alterações nas concentrações de acetato de etila e alcoóis superiores nos destilados com o ataque da praga (Tabelas 12 e 13). De uma maneira geral, a maior produção de alcoóis superiores foi observada a partir do 5º ciclo e na primeira época de colheita (Tabela 13), apresentando diferença significativa entre épocas somente para a produção de álcool isobutílico no tratamento testemunha e durante o 3º a 7º ciclo para álcool isoamílico. O não aumento de alcoóis superiores pode ser justificado pelo processo de clarificação do caldo, uma vez que esse processo pode ter removido aminoácidos, que são os precursores da formação desses compostos.

Tabela 12. Resultado da análise de variância (teste de F) e comparação de médias pelo teste de Tukey (5 % de probabilidade) para análises cromatográficas do destilado.

Causas de variação	Acetaldeído	Etanol	Acetato de etila
	mg/L	% v/v	mg/L
Níveis de danos (A)			
0%	114,83B	21,26A	55,41A
15%	201,65A	19,45AB	50,49A
30%	191,06A	19,87AB	49,60A
60%	162,97AB	17,90B	45,85A
F	4,66**	5,26**	1,96ns
DMS (Tukey)	66,04	2,22	10,32
Ciclos (B)			
1	166,61AB	21,17AB	55,90A
2	189,63AB	22,61A	61,23A
3	91,80B	19,51AB	49,93A
4	97,28B	19,65AB	44,37A
5	262,46A	19,12AB	52,98A
6	208,64AB	20,18AB	49,38A
7	164,21AB	18,69AB	44,44A
8	151,05AB	18,49AB	56,80A
9	161,34AB	18,69AB	43,01A
10	183,61AB	18,06B	45,33A
F	3,08**	2,11*	1,96*
DMS (Tukey)	128,92	4,33	20,14
Épocas (C)			
maio/junho	211,48A	19,86A	47,91A
Outubro	123,77B	19,38A	52,77A
F	23,82**	0,65ns	2,99ns
DMS (Tukey)	35,48	1,19	5,54
A x B	1,54ns	1,43ns	1,18ns
A x C	3,92**	0,12ns	1,68ns
B x C	1,19ns	1,16ns	1,60ns
A x B x C	2,02**	0,83ns	0,90ns
CV	83,04	23,84	43,21

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo

* = significativo ao nível de 5%

** = significativo ao nível de 1%

Tabela 13. Resultado da análise de variância (teste de F) e comparação de médias pelo teste de Tukey (5 % de probabilidade) para análises cromatográficas do destilado.

Causas de variação	n-propílico	isobutílico	Isoamílico
	mg/L	mg/L	mg/L
Níveis de danos (A)			
0%	50,02A	119,19A	249,32A
15%	49,06A	114,60A	237,09A
30%	48,20A	110,53A	248,94A
60%	45,89A	105,11A	224,50A
F	0,93ns	1,34ns	1,58ns
DMS (Tukey)	6,73	19,01	34,25
Ciclos (B)			
1	57,26AB	159,32A	316,39A
2	58,51A	139,45AB	316,54A
3	43,99C	95,75C	215,60B
4	44,53BC	89,54C	206,72B
5	49,56ABC	113,37BC	238,60B
6	49,16ABC	124,45ABC	231,75B
7	44,73BC	102,11C	214,44B
8	43,37C	107,48BC	211,05B
9	46,29ABC	98,48C	223,59B
10	45,52ABC	93,65C	226,72B
F	3,55**	7,56**	7,88**
DMS (Tukey)	13,15	37,11	66,87
Épocas (C)			
maio/junho	53,22A	120,75A	267,32A
Outubro	43,37B	103,97B	213,01B
F	28,94**	10,52**	33,95**
DMS (Tukey)	3,61	10,21	18,41
A x B	1,17ns	1,13ns	1,04ns
A x C	0,67ns	2,65*	1,54ns
B x C	1,72ns	0,87ns	2,50*
A x B x C	0,75ns	1,14ns	0,83ns
CV	29,39	35,66	30,06

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo

* = significativo ao nível de 5%

** = significativo ao nível de 1%

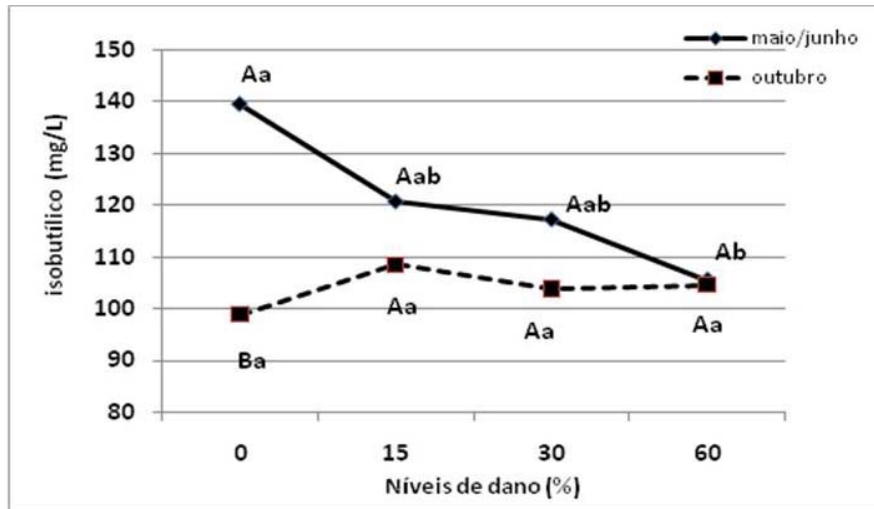


Figura 33: Resultados obtidos para a interação entre níveis de danos e épocas de colheita para álcool isobutílico nos destilados. Letras maiúsculas comparam níveis de danos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de níveis de danos.

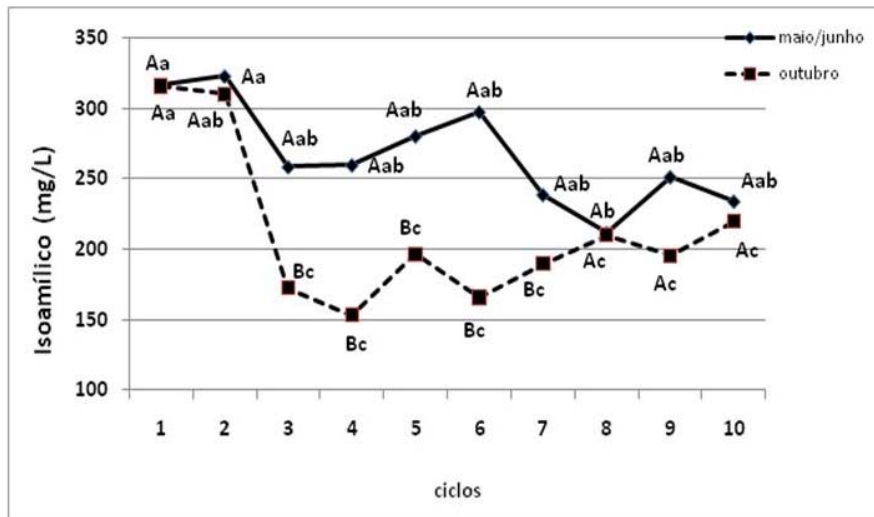


Figura 34: Resultados obtidos para a interação entre ciclos fermentativos e épocas de colheita para álcool isoamílico nos destilados. Letras maiúsculas comparam ciclos fermentativos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de ciclos fermentativos.

5 – CONCLUSÕES

-Os danos promovidos pela cigarrinha-das-raízes afetam negativamente a qualidade da cana à medida que aumenta o nível de dano;

-A matéria-prima danificada possui maior acidez, compostos fenólicos e contaminantes, que interferem negativamente na fermentação;

-O processo fermentativo é comprometido pelo aumento dos danos causados pela cigarrinha-das-raízes na matéria-prima processada;

-Os perfis de leveduras P1, P3, P6 e P9 mostram-se adaptados ao meio fermentativo.

-Os reflexos do ataque da praga sobre o processo de produção de etanol é mais evidenciado na colheita realizada ao final da safra (outubro).

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, H. V. Nutrição mineral da levedura, aspectos teóricos e práticos. In: SEMANA DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, 4.,1985, Piracicaba. **Anais...**, p.44- 48.
- AMORIM, H.V., OLIVEIRA, A. J. Infecção na fermentação: como evitá-la. **Álcool e Açúcar**. São Paulo, v. 2 n.5, p.12-18, 1982.
- AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; ALVES, D.G. **Processos de produção de álcool – controle e monitoramento**. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, 1996, 93p.
- ANGELIS, D. F de. Agentes físicos, químicos e microbiológicos que afetam a fermentação alcoólica. In: MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. **Aguardente de cana- produção e qualidade**. Jaboticabal, FUNEP, 1992 p. 49-66.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação Agrícola**. 3. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006, 237p.
- BASSO, L.C. Fisiologia e Ecologia Microbiana. **Workshop Produção de Etanol**, 7p., 2009.
- BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J. de; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **Fems Yeast Research**, v. 8, p. 1155-1163, 2008.
- BASSO, L.C.; OLIVEIRA, A.J.; ORELLI, V.F.D.M.; CAMPOS, A.A.; GALLO, C.R.;AMORIM, H.V. Dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliada pela técnica de cariotipagem. **Congresso Nacional da STAB**, 5. Águas de São Pedro, p. 245-250, 1993 (Anais).
- BENEDINI, M. S. Ganhando da cigarrinha-da-raiz na técnica. **Idea News**, ano 4, n.32, p.50-70, 2003.
- BERNARDI, T.L.; PEREIRA, G.V.M.; CARDOSO, P.G.; DIAS, E.S.; SCHWAN, R.F. *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with production of cachaça: identification and characterization by traditional and molecular methods (PCR, PFGE and RFLP). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p.2705-2712, 2008.
- BEVAN, D., BOND, J. Microorganism in field and mill – a preliminary survey. In: CONFERENCE OF SOCIETY SUGAR CANE TECHNOLOGY, 38., 1971. **Proceedings...**, p.137- 143.

BI, J. L.; FELTON, G. W.; MURPHY, J. B.; HOWLES, P.A.; DIXON, R.A; LAMB, C.J. Do plant phenolics confer resistance to specialist and generalist insect herbivores? **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, p. 4500-4504, 1997.

BLONDIN, B.; VIZINHET, F. Identification de souches de levures oenologiques par leus caryotypes obtenus em électrophorèse em champ pulse. **Révue Française d'Oenologie**, v.28, p.7-11, 1988.

BLUMER, E. *Efeito do complexo broca/podridões na fermentação etanólica*. Piracicaba, 1992. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

BRIONES, A. I.; UBEDA, J.; GRANDO, M.S. Differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from fermenting musts according to their kariotype patterns. **International Journal of Food Microbiology**. v. 28, p.369-377, 1996.

CABRINI, K.T.; GALLO, C. R. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do Estado de São Paulo, Brasil. **Scientia Agrícola**. Piracicaba, v.56, n.1, p.207-215, 1999.

CIIAGRO online. Resultados agrometeorológicos da região de Guariba-SP. Disponível em < <http://ciiagro.iac.sp.gov.br/ciiagroonline> >. Acesso em: 10 de maio de 2008.

CHAVES, J.B.P.; PÓVOA, M.E.B. A qualidade da aguardente de cana- de- açúcar. In: MUTTON, M.J.R.; MUTTON, M.A. **Aguardente de cana - produção e qualidade**. Jaboticabal, FUNEP, 1992, p.93-132.

CLARKE, M. A.; LEGENDRE, B. R. Qualidade da cana-de-açúcar: impactos no rendimento do açúcar e fatores de qualidade. **STAB: açúcar, álcool e subprodutos**, v.17, n.6, 1999.

CONSECANA. Normas de Avaliação da Qualidade da Cana-de-açúcar. Disponível em: < <http://www.unica.com.br/files/consecana/normasepreços.pdf> >. Acesso em: 21 de março de 2008.

COPERSUCAR. **Manual de Controle Químico da Fermentação**. CTLA-2. São Paulo, 1988. 46p.

COPERSUCAR. **Manual de Controle Químico da Fabricação de Açúcar**. Piracicaba, 2001. CD-Rom (não paginado)

DEMUYTER, C.; LOLLIER, M.; LEGRAS, J.L.; LE JEUNE, C. Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, 1140–1148, 2004.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; FIGUEIREDO, P.; LANDELL, M. G. A.; FERREIRA, J. M. G.; CARVALHO, P. A. M. Danos causados pelas cigarrinhas-das-raízes (*Mahanarva fimbriolata*) a diversos genótipos de cana-de-açúcar. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.17, n.5, p.48-52, 1999.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; FERREIRA, J.M.G.; CARVALHO, P.A.M. Influência da cigarrinha-das-raízes, *Mahanarva fimbriolata*, sobre a qualidade tecnológica da cana-de-açúcar. **Stab: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.19, n. 2, p.34-35, 2000.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; GARCIA, V.; COELHO, A.L. Eficiência de inseticidas no controle da cigarrinha das raízes, *Mahanarva fimbriolata*, em cana-de-açúcar. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.20, n.1, p.30-33, 2001.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; GARCIA, V.; PARAZZI, V.J. Efeito de inseticidas no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera:Cercopidae) e de nematóides fitoparasitos na qualidade tecnológica e na produtividade da cana-de-açúcar. **Neotropical Entomology**, v. 31, n.4, p. 909-914, 2002.

EGGLESTON, G. Deterioration of cane juice—sources and indicators. **Food Chemistry**, v. 78, p. 95–103, 2002.

EGGLESTON, G.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; PAULILLO, S. de L.; BASSO, T. Mannitol as a sensitive indicator of sugarcane deterioration and bacterial contamination in fuel alcohol production. **Zuckerindustrie**, v. 132, n.1, p. 33-39, 2007.

EGGLESTON, G.; LEGENDRE, B.; TEW, T. Indicators of freeze damaged sugarcane varieties which can predict processing problems. **Food Chemistry**, v. 87, n.1, p. 119-133, 2004.

EGGLESTON, G.; HARPER, W. Determination of sugarcane deterioration at the factory: Development of a rapid, easy and inexpensive enzymatic method to measure mannitol. **Food Chemistry**, v.98, n.2, p.366-372, 2006.

- EGLI, C.M.; EDINGER, W.D.; MITRAKUL, C.M.; HENICK-KLING, T. Dynamics of indigenous yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. **Journal of Applied Microbiology**, v.779-789, 1998.
- FERNANDES, A.C. Cálculos na agroindústria da cana-de-açúcar, 2ª Edição. Piracicaba, 2006, 240p.
- FEWKES, D.W. The biology of sugar cane froghoppers. In: WILLIAMS, J.R.; METCALFE, J.R.; MUNGOMERY, R.W.; MATHES, R. (Ed.) **Pests of sugar cane**. Amsterdam: Elsevier Publishing, 1969. p. 281-307.
- FLORES BERRIOS, E.P.; ALBA GONZALEZ, J.F.; ARRIZON GAVINÓ, J.P.; ROMANO, P.; CAPECE, A.; GSCHAEDLER MATHIS, A. The use of AFLP for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity between yeasts isolated from Mexican agave-distilled beverages and from grape musts. **Letters in Applied Microbiology**, v.41, p. 147–152, 2005.
- FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 73, n.2, p.627-50, 1927.
- FONTANIELLA, B.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.E.; ARMAS, R. de; RODRIGUEZ, C.W.; MARTINEZ, M.; PINÓN, D.; ACEVEDO, R.; SOLAS, M.T. Yellow leaf syndrome modifies the composition of sugarcane juices in polysaccharides, phenols and polyamines. **Plant Physiology Biochemistry**, v.41, p.1027-1036, 2003.
- GALLO, C. R. Identificação de bactérias contaminantes na fermentação alcoólica. **STAB: açúcar, álcool e subprodutos**. Piracicaba, v. 10, n. 5, p.30-36, 1992.
- GARCIA, J. F. *Técnica de criação e tabela de vida de Mahanarva fimbriolata (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae)*. Piracicaba, 2002, 59f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – ESALQ, Universidade de São Paulo.
- GARCIA, J.F.; GRISOTO, E.; BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P.; APPEZATO-DA-GLÓRIA, B. Feedings site of the spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (STÅL) (HEMIPTERA: CERCOPIDAE) on sugarcane. **Scientia Agricola**, v. 64, n.5, p.555-557, 2007.
- GIUDICI, P.; CAGGIA, C.; PULVIRENTI, A.; RAINIERI, S. Karyotyping of *Saccharomyces cerevisiae* strains with different temperature profiles. **Journal of Applied Microbiology**. v.84, p. 811-819, 1998.

GODSHALL, M.A. Removal of colorants and polysaccharides and the quality of white sugar. In: **Association A.V.H. Symposium**, 6. 1999, Reims. Proceedings... Reims: Association Andrew van Hook, 1999. p. 28-35.

GONÇALVES T.D., *Danos causados por Mahanarva fimbriolata em cana-de-açúcar: reflexos na qualidade da matéria-prima e fermentação etanólica*. Jaboticabal, 2003. 51p. (Dissertação de Mestrado, FCAV, UNESP).

GONÇALVES, T.D.; MUTTON, M.A.; PERECIN, D.; CAMPANHÃO, J.M., MUTTON, M.J.R. Qualidade da matéria prima em função de diferentes níveis de danos promovidos pela cigarrinha-das-raízes. **STAB: açúcar, álcool e subprodutos**, v. 22, n. 2, p. 29-33, 2003.

GUERRA, J.B.; ARAUJO, R.A.C.; PATARO, C.; FRANCO, G.R.; MOREIRA, E.S.A.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; ROSA, C.A. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p.106-111, 2001.

GUILLAMÓN, J.M.; SABATÉ, J.; CANO, E.B.J.; QUEROL, A. Rapid identification of wine yeasts species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. **Archives of Microbiology**, v. 169, p.387-392, 1998.

HALLSWORTH J.E., Ethanol-induced water stress in yeast. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v., 85, n. 2, p. 125-137, 1998.

IBEAS, J.I.; JIMENES, J. Genomic complexity and chromosomal rearrangements in wine-laboratory yeast hybrids. **Current Genetics**, v. 30, p. 410-416, 1996.

IZQUIERDO-CANÃS, P.M.; UBEDA IRANZO, J.F.; BRIONES PERES, A.I. Study of the karyotype of wine yeasts isolated in the region of Valdepenas in two consecutive vintages. **Food Microbiology**, v. 14, p.221-225, 1997.

JOSÉ, C.L.A. *Caracterização e avaliação do perfil isoenzimático de leveduras contaminantes do processo fermentativo*. Jaboticabal, 2000, 142p. (Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP).

LANE, J.H.; EYNON, L. **Determination of reducing sugars by Fehling solution with methylene blue indicator**. Norman Rodger, London, 8p. (1934).

- LEE, S.S.; ROBINSON, F.M.; WONG, H.Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, n.11 (1981).
- LONGO, E.; VIZINHET, F. Chromosomal rearrangements during vegetative growth of wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 322-326, 1993.
- LUCENA, B.T.L. *Análise de polimorfismos cromossômicos em linhagens de leveduras de fermentação alcoólica*. Recife, 2004, 82 p. (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco).
- LUDWIG, K.M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D.F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 21, n.1, p. 63-68, 2001.
- LUNN, P.G.; NORTHROP, C.A.; NORTHROP, A.J. Automated enzymatic assays for the determination of intestinal permeability probes in urine. 2. Mannitol. **Clinica Chimica Acta**, v. 183, p. 163-170, 1989.
- MADALENO, L.L., RAVANELI, G.C., PRESOTTI, L.E, MUTTON, M.A., FERNANDES, O.A.; MUTTON, M.A. Influence of *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) injury on the quality of cane juice. **Neotropical Entomology**, v. 37, n.1, p. 68-73, 2008.
- MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of *Lactobacillus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, p.130-135, 1960.
- MARTINS, C.V.B.; HORII,J.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Characterization of fusion products from protoplasts of yeasts and their segregants by eletrophoretic karyotyping and RAPD. **Revista de Microbiologia**, v.30, p.71-76, 1999.
- MENDONÇA, A.F.; BARBOSA, G.V.S.; MARQUES, E.J. As cigarrinhas da Cana-de-Açúcar (Hemiptera:Cercopidae) no Brasil. In: Mendonça, A.F. (ed.) **Pragas da Cana-de-Açúcar**. Insetos & Cia, Maceió, 200p. ,1996.
- MENDONÇA, A.F.; MENDONÇA, I.C.B.R. Cigarrinha da raiz *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) In: MENDONÇA, A.F. **Cigarrinhas da Cana-de-Açúcar – Controle Biológico**. Insecta, Maceió, 317p., 2005.

MUTTON, M.J.R. *Avaliação da fermentação etanólica do caldo de cana-de-açúcar (Saccharum spp) tratadas com maturadores químicos*.1998, 178p., Tese (Livre Docência - FCAV, UNESP).

MUTTON, M.J.R.; MUTTON, M.A. Maturadores químicos em cana-de-açúcar: III – Efeitos na fermentação etanólica e microbiota do mosto. **8º Congresso Nacional da STAB**. Recife, pp.452-457, 2002.

MUTTON, M.J.R. Reflexos da qualidade da matéria-prima no processo industrial. **II Simpósio Internacional da STAB – Perdas de açúcares: do campo ao produto final**. Águas de São Pedro, 2003 (cd room).

NARENDRANATH, N.V. Bacterial contamination and control in ethanol production. In: JACQUES, K.A.; LYONS, T.P.; KELSALL, D.R. (Ed). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press., p. 287-298, 2003.

NARENDRANATH, N.V.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p.71-177, 2001.

NOVAES, F.V. Processos Fermentativos. In: MUTTON, M.J.R.; MUTTON, M.A. **Aguardente de cana - produção e qualidade**. Jaboticabal: FUNEP, 1992, p.37-65.

OKOLO, B.; JOHNSTON, J.R.; BERRY, D.R. Toxicity of ethanol, n-butanol and iso-amyl alcohol in *Sacch. cerevisiae* when supplied separately and in mixtures. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 9, n. 6, p. 431-434, 1987.

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

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.

PATARO, C.; GUERRA, J.B.; PETRILLO-PEIXOTO, M.L.; MENDONÇA-HAGLER, L.C., LINARDI, V.R.; ROSA, C.A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.24-31, 2000.

PHELPS, C.D.; YOUNG, L.Y. Microbial metabolism of the plant phenolic compounds ferulic and syringic acids under three anaerobic conditions. **Microbial Ecology**, v. 33, p.206-215, 1996.

POLAKOVIC, M.; HANDRIKOVÁ, G.; KOSIK, M. Inhibitory effects of some phenolic compounds on enzymatic hydrolysis of sucrose. **Biomass and Bioenergy**, v. 3, n.5, p.369-371, 1992.

PUIG, S.; QUEROL, A.; BARRIO, E.; PEREZ-ORTIN, J.E. Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p.2057–2061, 2000.

QUESADA, M.P.; CENIS, J.L. Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the characterization of wine yeasts. **American Journal of Enology Viticulture**, v. 46, n.2; p. 204-208, 1995.

QUEROL, A.; FERNANDEZ-ESPINAR, M.T.; OLMOS, M.; BARRIO, E. Adaptive evolution of wine yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 3-10, 2003.

RAVANELI, G.C. *Efeito da cigarrinha-das-raízes com tratamento químico sobre a qualidade da matéria-prima e fabricação de álcool*. Jaboticabal, 2005. 78p. (Dissertação de Mestrado, FCAV, UNESP).

RAVANELI, G.C.; MADALENO, L.L.; PRESOTTI, L.E.; MUTTON, M.A.; MUTTON, M.J.R. Spittlebug infestation in sugarcane affects ethanolic fermentation. **Scientia Agricola**, v.63, n.6, p. 543-546, 2006.

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

SOUZA, C.S.; THOMAZ, D.; CIDES, E.R.; OLIVEIRA, K.F.; TOGNOLLI, J.O.; LALUCE, C. Genetic and physiological alterations occurring in a yeast population continuously propagated at increasing temperatures with cell recycling. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p.1667–1677, 2007.

STOKES, J.L. Influence of temperature on the growth and metabolism of yeast. *In*: Rose AH; Harrison J S. **The yeast**. Academic Press, New York, p.119- 134; 1971.

STUPIELLO, J.P. Alguns Aspectos de Qualidade da Matéria-Prima. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.7, n. 3/4 e 5, p.542-4. 1989.

STUPIELLO, J.P. Efeitos dos não-açúcares. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.20, n. 3, p.10, 2002.

STUPIELLO, J.P.; HORII, J. Condução da fermentação alcoólica. **Saccharum**, v. 17, p.43-46, 1981.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Artmed. Porto Alegre: 719p, (2004).

TANIMOTO, T. **The press method of cane analysis**. Hawaiian Planter's Record. Aiea, 57, p.133- 150, 1964.

UNICA. **União da Indústria de Cana-de-açúcar**. Disponível em: < <http://www.unica.com.br> >. Acesso em: 25 jun. 2009.

Van DER WALT, R.P.; YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeast. In: KREGER Van RIJ, N.J.W. **The yeast: a taxonomic study**. 3 ed. Amsterdam: Elsevier Science, 1984, p.45-105.

VENTURA, R. *Quantificação do ácido láctico na fermentação etanólica como parâmetro de monitoramento do processo*. Rio Claro, 2007. Dissertação de Mestrado (Instituto de Biociências, UNESP).

VILLANOVA, M.; MASSNEUF-POMADÈRE, I. Characterization of yeast strains from Rías Baixas (NW Spain) and their contribution to the fermentation of Albariño wine. **Annals of Microbiology**, v. 55, n.1, p.23-26, 2005.

VILLELA, G.G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Técnicas e experimentos de bioquímica**. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan S/A, 552p., 1973.

YOKOYA, F. **Fabricação da aguardente da cana**. (Série Fermentações Industriais, 2). Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", 1995.

YOKOYA, F.; OLIVA-NETO, P. Characteristics of yeast flocculation by *Lactobacillus fermentum*. **Revista de Microbiologia**, v. 22, p. 21-27, 1991.

7 – APÊNDICE

Anexo 1. Resultados agrometeorológicos da região de Guariba-SP, para o período de 11/2006 a 05/2007 (Fonte CIIAGRO online, consultado em 20/08/2009).

Resenha: Guariba no período de 01/11/2006 até 01/05/2007								
Período (Mes)	Temperatura Máxima Absoluta	Temperatura Mínima Absoluta	Temperatura Máxima Mensal	Temperatura Mínima Mensal	Temperatura Média	ETP	Precipitação	DCCH
	(°C)					(mm)		
Ano de 2006								
novembro	34,7	11,6	30,1	18,7	24,4	129	42	11
dezembro	32,5	19,5	29,9	21	25,4	149	124,1	21
Ano de 2007								
janeiro	32,6	19,1	28,8	21	24,9	145	644,2	25
fevereiro	33,6	15,6	31	19,1	25	125	124,7	9
março	34,6	16,5	31,8	20	25,9	135	153,2	11
abril	33,5	16,5	30,5	18,8	24,6	101	53,5	5
maio	30,9	6,9	26,5	14,4	20,5	66	105,7	6

CIIAGRO ONLINE

Anexo 2: Número de colônias presentes no caldo e mosto na primeira época de colheita.

Tratamento	Ciclo	Caldo			Mosto		
		PCA	WLN	MRS	PCA	WLN	MRS
		UFC/mL x 10 ⁴			UFC/mL x 10 ⁴		
0%	1	68	78,75	148,5	0,5	64,5	4,5
	3	145,75	59,75	95,75	153,5	74	7,5
	5	>300	17,25	150	9,5	1	1
	7	288	6,75	145,25	107,25	46,5	16
	9	165	12,75	191	60	19	97
15%	1	121	17,5	52,5	7,75	53	0,5
	3	168	103,75	42	100	52,5	4,75
	5	>300	42,25	132	2	0	0
	7	159	44,25	278	83	6,75	0
	9	>300	47	300	0	87	7,5
30%	1	198	17	155,75	129	163,5	0
	3	251	79	94	83	69,5	1
	5	>300	15	102	53,25	0,75	3,25
	7	>300	26	>300	63,25	0	2,5
	9	217	26	192	64	5,5	68
60%	1	84	63,25	98	7	73	0
	3	>300	146	138	182,75	155,5	17,25
	5	>300	17,5	214,5	0,75	0,75	0,75
	7	>300	23	257	67,75	24,75	1,5
	9	144	48,75	218,25	12,75	0,5	1,5

Anexo 3: Número de colônias presentes no caldo e mosto na segunda época de colheita

Nível de Dano	Ciclo	Caldo			Mosto		
		PCA	WLN	MRS	PCA	WLN	MRS
		UFC/mL x 10 ⁴			UFC/mL x 10 ⁴		
0%	1	58	17	49	6	0	1
	3	46,5	35,75	62,8	6,5	4,5	0
	5	48	36,5	116	0,75	0	6,75
	7	100,5	54,5	128,25	74	1,5	0
	9	97	105,75	208	3,5	18,25	2
15%	1	149,5	103	62	0	0	1
	3	91,5	98,5	215	13,75	7,5	0
	5	>300	183	119,25	14	33,25	1,5
	7	>300	50	112	32,75	1,25	0
	9	127,5	46,5	127,75	75,5	1	0
30%	1	186,75	105	188,75	1,5	21,25	67,75
	3	496	157	118	1,5	2,25	1,5
	5	224	159	156	1	0,5	1
	7	86,5	74	79,87	7,5	15,25	75
	9	>300	72,75	84	1,25	20,5	0
60%	1	>300	94,25	61	0	3	0
	3	107,5	103,75	140	103,25	2	1,75
	5	>300	114	>300	0,5	150	0,25
	7	158	99	224	192	122	112
	9	137,5	175,25	84	3,75	15	50,5

Anexo 4: Colônias presentes na fermentação na primeira época de colheita.

Tratamento	Ciclo	Início			Final		
		PCA	WLN	MRS	PCA	WLN	MRS
		UFC/mL x 10 ¹⁰		UFC/mL x 10 ⁶	UFC/mL x 10 ¹⁰		UFC/mL x 10 ⁶
0%	1	90,75	88,25	1	169	31	0
	2	180	110	12,75	40	30,25	65,75
	3	96,25	124,25	9	120,5	108,75	1,5
	4	39,5	48,5	0	45,75	26	24,5
	5	8,25	5,25	79,75	96,5	89	126
	6	99,25	103,75	115	110,5	5,25	0
	7	117,75	143	2	49	67	1
	8	49,5	88	8	85,75	81,75	2
	9	52,25	8,75	4	41,5	112	52
	10	38,5	3	146	19,75	28,5	286
15%	1	215	193,5	0,5	76	86,75	2,25
	2	33,5	>300	2,5	23	58,25	1,25
	3	70,25	60,25	0,5	26,5	31	0
	4	29,5	54,5	7	38,5	12	2
	5	6,75	29	0,5	35	105	15
	6	122	88	111	40,5	48,75	0
	7	17,5	11,5	74,25	37,75	31,75	168,5
	8	>300	50	2	114,25	79,25	2
	9	8,5	8,5	83	22	59	148
	10	276	82	292	26	28,25	300
30%	1	25,75	25,5	5,5	167,25	49,75	1,75
	2	>300	208	83	145,5	108,5	5,25
	3	69	42,75	5,25	139	92,75	117,5
	4	2	25,25	0,25	89	112,5	0
	5	101	60	124	143	18,75	0
	6	102,75	61,5	0	80	13,25	0
	7	1,25	87,25	>300	2,75	6,75	0,5
	8	204	113,5	0,5	11,25	7	2
	9	74,5	17,5	133	65,75	26,25	58
	10	116	5,25	85	37,75	1,5	>300
60%	1	94,75	99	0,75	0,5	0	4,25
	2	216	170	21,25	6	11	2,5
	3	49,25	24,25	7,25	18,5	10,75	15
	4	131	41	0	56,25	48	66,5
	5	13,5	13	11,5	3,5	27	0
	6	43	14,75	>300	28	24	>300
	7	50	39,25	>300	260	15	>300
	8	11,5	109	2	4	52,5	149
	9	26,75	8,5	1	41,25	63,75	5
	10	210	49,75	38	13,25	4	>300

Anexo 5: Colônias presentes na fermentação na segunda época de colheita.

Nível de Dano	Ciclo	Início			Final		
		PCA	WLN	MRS	PCA	WLN	MRS
		UFC/mL x 10 ¹⁰	UFC/mL x 10 ¹⁰	UFC/mL x 10 ⁶	UFC/mL x 10 ¹⁰	UFC/mL x 10 ¹⁰	UFC/mL x 10 ⁶
0%	1	>300	31,5	0,25	76,25	164,5	1,25
	2	108,25	62	0,25	101,25	84,5	0,5
	3	30,25	25,25	0,5	120,5	78,5	47
	4	>300	178	>300	31,5	78,25	0,5
	5	41	73,5	3,75	32,25	32,75	2,75
	6	51	18	80	109,75	107,5	19,5
	7	>300	112	0	19,5	152	6,5
	8	22,5	171,5	11,5	22,5	130,5	34,75
	9	15,75	15,75	18,5	12,75	63,75	32
	10	>300	6	8,5	43	20,25	16,5
15%	1	12,75	19,5	75,5	>300	92,5	4
	2	208	105,5	0	150	56	150
	3	128	83,5	1	103,25	72,5	8,5
	4	85,75	22	0	176	156	>300
	5	22,5	18	2,25	7	5,5	66
	6	9	7,5	0,5	212	174	>300
	7	236	132	0	108	39	75,75
	8	24,5	21,5	113,75	70,5	67,5	19
	9	19	9,5	1	34	70,75	7
	10	11	77	20	180	78,25	5
30%	1	6	97,25	0	>300	140,25	2,25
	2	>300	143,5	0	234	85	0
	3	61,5	64,5	0,25	42,5	38,75	1
	4	76	63,5	32,25	41,5	76,75	0
	5	16	67,25	16,5	91,75	90,5	>300
	6	30	23,5	>300	92,5	54	>300
	7	3	21,75	0,5	89,5	105,25	42
	8	118,5	62,5	>300	4	19,5	73,5
	9	31	5	4,5	>300	78,5	>300
	10	3,25	5,5	44	10	18	82
60%	1	61,5	57	0,5	138	61,75	1,75
	2	227	23,5	14,25	241	168	2,5
	3	38,75	47,25	0,5	146,5	150	21
	4	11,5	5	4	104	97	188
	5	32	5	0,5	102,5	83,5	5,25
	6	9	4,5	0,5	32	57,75	20
	7	25	23,25	>300	45,5	37,75	11,5
	8	19	66	22,5	30	23,5	77,5
	9	140,5	66,5	41,75	12,5	36	>300
	10	4	55,5	104,5	8	36,5	87

Anexo 6: Perfis de colônias de leveduras isoladas dos processos fermentativos, na concentração de 10^7 UFC/mL.

Isolado	Trat.	Ciclo/Período	Época	Perfil PFGE	Isolado	Trat.	Ciclo/Período	Época	Perfil PFGE
1	0%	1º/Início	maio/junho	1	41	15%	7º/Início	maio/junho	1
2	0%	1º/Início	maio/junho	1	42	15%	8º/Início	maio/junho	6
3	0%	2º/Início	maio/junho	1	43	15%	9º/Início	maio/junho	5
4	0%	2º/Início	maio/junho	1	44	15%	9º/Início	maio/junho	7
5	0%	2º/Início	maio/junho	1	45	15%	10º/Início	maio/junho	1
6	0%	3º/Início	maio/junho	1	46	15%	10º/Início	maio/junho	1
7	0%	4º/Início	maio/junho	1	47	15%	10º/Início	maio/junho	1
8	0%	4º/Início	maio/junho	2	48	30%	1º/Início	maio/junho	1
9	0%	4º/Início	maio/junho	1	49	30%	1º/Início	maio/junho	1
10	0%	4º/Início	maio/junho	1	50	30%	1º/Início	maio/junho	1
11	0%	5º/Início	maio/junho	1	51	30%	1º/Início	maio/junho	1
12	0%	6º/Início	maio/junho	1	52	30%	2º/Início	maio/junho	1
13	0%	6º/Início	maio/junho	1	53	30%	2º/Início	maio/junho	1
14	0%	7º/Início	maio/junho	1	54	30%	2º/Início	maio/junho	1
15	0%	7º/Início	maio/junho	1	55	30%	3º/Início	maio/junho	1
16	0%	7º/Início	maio/junho	1	56	30%	3º/Início	maio/junho	1
17	0%	7º/Início	maio/junho	1	57	30%	4º/Início	maio/junho	1
18	0%	8º/Início	maio/junho	3	58	30%	4º/Início	maio/junho	6
19	0%	8º/Início	maio/junho	1	59	30%	4º/Início	maio/junho	1
20	0%	9º/Início	maio/junho	1	60	30%	5º/Início	maio/junho	1
21	0%	9º/Início	maio/junho	2	61	30%	5º/Início	maio/junho	1
22	0%	9º/Início	maio/junho	4	62	30%	5º/Início	maio/junho	1
23	0%	10º/Início	maio/junho	5	63	30%	5º/Início	maio/junho	1
24	0%	10º/Início	maio/junho	1	64	30%	6º/Início	maio/junho	1
25	15%	1º/Início	maio/junho	1	65	30%	6º/Início	maio/junho	1
26	15%	1º/Início	maio/junho	6	66	30%	6º/Início	maio/junho	1
27	15%	1º/Início	maio/junho	1	67	30%	6º/Início	maio/junho	1
28	15%	2º/Início	maio/junho	1	68	30%	6º/Início	maio/junho	1
29	15%	2º/Início	maio/junho	1	69	30%	7º/Início	maio/junho	8
30	15%	3º/Início	maio/junho	1	70	30%	7º/Início	maio/junho	1
31	15%	4º/Início	maio/junho	1	71	30%	7º/Início	maio/junho	1
32	15%	4º/Início	maio/junho	1	72	30%	8º/Início	maio/junho	10
33	15%	5º/Início	maio/junho	1	73	30%	8º/Início	maio/junho	10
34	15%	5º/Início	maio/junho	5	74	30%	9º/Início	maio/junho	9
35	15%	6º/Início	maio/junho	1	75	30%	9º/Início	maio/junho	9
36	15%	6º/Início	maio/junho	6	76	30%	9º/Início	maio/junho	1
37	15%	6º/Início	maio/junho	6	77	30%	10º/Início	maio/junho	1
38	15%	7º/Início	maio/junho	1	78	30%	10º/Início	maio/junho	2
39	15%	7º/Início	maio/junho	7	79	60%	1º/Início	maio/junho	1
40	15%	7º/Início	maio/junho	1	80	60%	1º/Início	maio/junho	1

Isolado	Trat.	Ciclo/Período	Época	Perfil PFGE	Isolado	Trat.	Ciclo/Período	Época	Perfil PFGE
81	60%	2º/Início	maio/junho	1	121	0%	9º/Final	maio/junho	3
82	60%	2º/Início	maio/junho	1	122	0%	9º/Final	maio/junho	18
83	60%	3º/Início	maio/junho	1	123	0%	10º/Final	maio/junho	10
84	60%	3º/Início	maio/junho	6	124	0%	10º/Final	maio/junho	3
85	60%	3º/Início	maio/junho	1	125	15%	1º/Final	maio/junho	3
86	60%	4º/Início	maio/junho	1	126	15%	1º/Final	maio/junho	6
87	60%	4º/Início	maio/junho	1	127	15%	1º/Final	maio/junho	1
88	60%	4º/Início	maio/junho	1	128	15%	2º/Final	maio/junho	9
89	60%	5º/Início	maio/junho	1	129	15%	2º/Final	maio/junho	4
90	60%	5º/Início	maio/junho	1	130	15%	2º/Final	maio/junho	1
91	60%	6º/Início	maio/junho	1	131	15%	2º/Final	maio/junho	1
92	60%	6º/Início	maio/junho	1	132	15%	2º/Final	maio/junho	1
93	60%	6º/Início	maio/junho	1	133	15%	3º/Final	maio/junho	1
94	60%	7º/Início	maio/junho	1	134	15%	3º/Final	maio/junho	1
95	60%	7º/Início	maio/junho	1	135	15%	4º/Final	maio/junho	1
96	60%	8º/Início	maio/junho	1	136	15%	4º/Final	maio/junho	1
97	60%	8º/Início	maio/junho	1	137	15%	4º/Final	maio/junho	1
98	60%	8º/Início	maio/junho	1	138	15%	5º/Final	maio/junho	1
99	60%	9º/Início	maio/junho	1	139	15%	5º/Final	maio/junho	1
100	60%	9º/Início	maio/junho	18	140	15%	5º/Final	maio/junho	1
101	60%	10º/Início	maio/junho	18	141	15%	6º/Final	maio/junho	1
102	60%	10º/Início	maio/junho	18	142	15%	6º/Final	maio/junho	12
103	0%	1º/Final	maio/junho	1	143	15%	6º/Final	maio/junho	1
104	0%	1º/Final	maio/junho	1	144	15%	6º/Final	maio/junho	1
105	0%	1º/Final	maio/junho	1	145	15%	7º/Final	maio/junho	1
106	0%	2º/Final	maio/junho	3	146	15%	7º/Final	maio/junho	1
107	0%	3º/Final	maio/junho	1	147	15%	7º/Final	maio/junho	1
108	0%	4º/Final	maio/junho	1	148	15%	8º/Final	maio/junho	1
109	0%	4º/Final	maio/junho	1	149	15%	8º/Final	maio/junho	1
110	0%	5º/Final	maio/junho	1	150	15%	8º/Final	maio/junho	1
111	0%	5º/Final	maio/junho	1	151	15%	9º/Final	maio/junho	1
112	0%	5º/Final	maio/junho	1	152	15%	9º/Final	maio/junho	1
113	0%	6º/Final	maio/junho	1	153	15%	9º/Final	maio/junho	1
114	0%	6º/Final	maio/junho	1	154	15%	9º/Final	maio/junho	1
115	0%	6º/Final	maio/junho	2	155	15%	10º/Final	maio/junho	1
116	0%	6º/Final	maio/junho	1	156	15%	10º/Final	maio/junho	1
117	0%	7º/Final	maio/junho	3	157	15%	10º/Final	maio/junho	1
118	0%	7º/Final	maio/junho	3	158	15%	10º/Final	maio/junho	1
119	0%	7º/Final	maio/junho	5	159	30%	1º/Final	maio/junho	1
120	0%	8º/Final	maio/junho	12	160	30%	1º/Final	maio/junho	1

Isolado	Trat.	Ciclo/Período	Época	Perfil PFGE	Isolado	Trat.	Ciclo/Período	Época	Perfil PFGE
161	30%	1º/Final	maio/junho	1	201	60%	8º/Final	maio/junho	1
162	30%	2º/Final	maio/junho	3	202	60%	8º/Final	maio/junho	12
163	30%	2º/Final	maio/junho	3	203	60%	9º/Final	maio/junho	1
164	30%	2º/Final	maio/junho	3	204	60%	9º/Final	maio/junho	1
165	30%	3º/Final	maio/junho	1	205	60%	9º/Final	maio/junho	1
166	30%	4º/Final	maio/junho	9	206	60%	9º/Final	maio/junho	1
167	30%	4º/Final	maio/junho	1	207	60%	10º/Final	maio/junho	1
168	30%	5º/Final	maio/junho	3	208	60%	10º/Final	maio/junho	9
169	30%	5º/Final	maio/junho	3	209	0%	1º/Início	outubro	1
170	30%	6º/Final	maio/junho	1	210	0%	1º/Início	outubro	1
171	30%	6º/Final	maio/junho	1	211	0%	1º/Início	outubro	1
172	30%	6º/Final	maio/junho	1	212	0%	1º/Início	outubro	3
173	30%	6º/Final	maio/junho	1	213	0%	2º/Início	outubro	1
174	30%	7º/Final	maio/junho	3	214	0%	2º/Início	outubro	1
175	30%	7º/Final	maio/junho	3	215	0%	3º/Início	outubro	3
176	30%	7º/Final	maio/junho	3	216	0%	3º/Início	outubro	1
177	30%	7º/Final	maio/junho	1	217	0%	3º/Início	outubro	1
178	30%	8º/Final	maio/junho	1	218	0%	4º/Início	outubro	1
179	30%	9º/Final	maio/junho	3	219	0%	4º/Início	outubro	1
180	30%	9º/Final	maio/junho	3	220	0%	4º/Início	outubro	9
181	30%	9º/Final	maio/junho	3	221	0%	4º/Início	outubro	1
182	30%	10º/Final	maio/junho	1	222	0%	5º/Início	outubro	12
183	30%	10º/Final	maio/junho	1	223	0%	5º/Início	outubro	3
184	60%	1º/Final	maio/junho	1	224	0%	5º/Início	outubro	9
185	60%	1º/Final	maio/junho	1	225	0%	5º/Início	outubro	1
186	60%	2º/Final	maio/junho	1	226	0%	5º/Início	outubro	3
187	60%	2º/Final	maio/junho	1	227	0%	5º/Início	outubro	3
188	60%	2º/Final	maio/junho	1	228	0%	5º/Início	outubro	9
189	60%	3º/Final	maio/junho	1	229	0%	5º/Início	outubro	12
190	60%	3º/Final	maio/junho	1	230	0%	6º/Início	outubro	9
191	60%	4º/Final	maio/junho	4	231	0%	6º/Início	outubro	9
192	60%	4º/Final	maio/junho	1	232	0%	6º/Início	outubro	1
193	60%	5º/Final	maio/junho	1	233	0%	7º/Início	outubro	4
194	60%	5º/Final	maio/junho	1	234	0%	7º/Início	outubro	1
195	60%	5º/Final	maio/junho	3	235	0%	7º/Início	outubro	12
196	60%	6º/Final	maio/junho	1	236	0%	8º/Início	outubro	1
197	60%	6º/Final	maio/junho	1	237	0%	8º/Início	outubro	10
198	60%	7º/Final	maio/junho	1	238	0%	9º/Início	outubro	10
199	60%	7º/Final	maio/junho	1	239	0%	9º/Início	outubro	1
200	60%	8º/Final	maio/junho	4	240	0%	10º/Início	outubro	1

Isolado	Trat.	Ciclo/Período	Época	Perfil PFGE	Isolado	Trat.	Ciclo/Período	Época	Perfil PFGE
241	0%	10º/Início	outubro	3	281	30%	4º/Início	outubro	17
242	0%	10º/Início	outubro	1	282	30%	4º/Início	outubro	4
243	15%	1º/Início	outubro	1	283	30%	5º/Início	outubro	9
244	15%	1º/Início	outubro	3	284	30%	5º/Início	outubro	4
245	15%	2º/Início	outubro	1	285	30%	5º/Início	outubro	4
246	15%	2º/Início	outubro	3	286	30%	6º/Início	outubro	1
247	15%	2º/Início	outubro	1	287	30%	6º/Início	outubro	4
248	15%	3º/Início	outubro	3	288	30%	6º/Início	outubro	3
249	15%	3º/Início	outubro	1	289	30%	6º/Início	outubro	12
250	15%	4º/Início	outubro	3	290	30%	7º/Início	outubro	1
251	15%	4º/Início	outubro	1	291	30%	7º/Início	outubro	3
252	15%	4º/Início	outubro	2	292	30%	7º/Início	outubro	3
253	15%	5º/Início	outubro	13	293	30%	8º/Início	outubro	12
254	15%	5º/Início	outubro	1	294	30%	8º/Início	outubro	15
255	15%	5º/Início	outubro	3	295	30%	9º/Início	outubro	15
256	15%	5º/Início	outubro	3	296	30%	9º/Início	outubro	9
257	15%	5º/Início	outubro	6	297	30%	9º/Início	outubro	19
258	15%	5º/Início	outubro	6	298	30%	10º/Início	outubro	19
259	15%	6º/Início	outubro	3	299	30%	10º/Início	outubro	2
260	15%	6º/Início	outubro	6	300	30%	10º/Início	outubro	6
261	15%	6º/Início	outubro	1	301	30%	10º/Início	outubro	1
262	15%	7º/Início	outubro	1	302	60%	1º/Início	outubro	3
263	15%	7º/Início	outubro	6	303	60%	1º/Início	outubro	9
264	15%	7º/Início	outubro	6	304	60%	1º/Início	outubro	1
265	15%	8º/Início	outubro	3	305	60%	2º/Início	outubro	3
266	15%	8º/Início	outubro	1	306	60%	2º/Início	outubro	3
267	15%	9º/Início	outubro	1	307	60%	2º/Início	outubro	1
268	15%	9º/Início	outubro	14	308	60%	3º/Início	outubro	1
269	15%	10º/Início	outubro	6	309	60%	3º/Início	outubro	3
270	15%	10º/Início	outubro	6	310	60%	4º/Início	outubro	12
271	30%	1º/Início	outubro	16	311	60%	4º/Início	outubro	1
272	30%	1º/Início	outubro	3	312	60%	4º/Início	outubro	1
273	30%	1º/Início	outubro	1	313	60%	4º/Início	outubro	1
274	30%	2º/Início	outubro	3	314	60%	5º/Início	outubro	9
275	30%	2º/Início	outubro	1	315	60%	5º/Início	outubro	10
276	30%	3º/Início	outubro	1	316	60%	5º/Início	outubro	1
277	30%	3º/Início	outubro	15	317	60%	6º/Início	outubro	12
278	30%	3º/Início	outubro	3	318	60%	6º/Início	outubro	9
279	30%	4º/Início	outubro	1	319	60%	7º/Início	outubro	3
280	30%	4º/Início	outubro	1	320	60%	7º/Início	outubro	1

Isolado	Trat.	Ciclo/Período	Época	Perfil PFGE	Isolado	Trat.	Ciclo/Período	Época	Perfil PFGE
321	60%	7º/Início	outubro	6	361	15%	1º/Final	outubro	6
322	60%	7º/Início	outubro	6	362	15%	1º/Final	outubro	1
323	60%	7º/Início	outubro	3	363	15%	2º/Final	outubro	1
324	60%	7º/Início	outubro	17	364	15%	2º/Final	outubro	1
325	60%	8º/Início	outubro	1	365	15%	3º/Final	outubro	1
326	60%	8º/Início	outubro	17	366	15%	3º/Final	outubro	3
327	60%	8º/Início	outubro	1	367	15%	4º/Final	outubro	1
328	60%	8º/Início	outubro	6	368	15%	4º/Final	outubro	1
329	60%	9º/Início	outubro	1	369	15%	5º/Final	outubro	3
330	60%	9º/Início	outubro	1	370	15%	5º/Final	outubro	6
331	60%	10º/Início	outubro	6	371	15%	5º/Final	outubro	1
332	60%	10º/Início	outubro	1	372	15%	6º/Final	outubro	1
333	0%	1º/Final	outubro	12	373	15%	6º/Final	outubro	19
334	0%	1º/Final	outubro	1	374	15%	7º/Final	outubro	3
335	0%	2º/Final	outubro	1	375	15%	7º/Final	outubro	3
336	0%	2º/Final	outubro	3	376	15%	7º/Final	outubro	11
337	0%	2º/Final	outubro	1	377	15%	8º/Final	outubro	1
338	0%	3º/Final	outubro	3	378	15%	9º/Final	outubro	6
339	0%	4º/Final	outubro	1	379	15%	9º/Final	outubro	1
340	0%	4º/Final	outubro	1	380	15%	9º/Final	outubro	17
341	0%	5º/Final	outubro	1	381	15%	10º/Final	outubro	6
342	0%	5º/Final	outubro	1	382	15%	10º/Final	outubro	1
343	0%	5º/Final	outubro	1	383	30%	1º/Final	outubro	3
344	0%	6º/Final	outubro	1	384	30%	2º/Final	outubro	6
345	0%	6º/Final	outubro	1	385	30%	2º/Final	outubro	1
346	0%	7º/Final	outubro	1	386	30%	3º/Final	outubro	1
347	0%	7º/Final	outubro	1	387	30%	4º/Final	outubro	1
348	0%	7º/Final	outubro	1	388	30%	4º/Final	outubro	3
349	0%	7º/Final	outubro	1	389	30%	4º/Final	outubro	1
350	0%	8º/Final	outubro	1	390	30%	5º/Final	outubro	1
351	0%	8º/Final	outubro	1	391	30%	5º/Final	outubro	9
352	0%	8º/Final	outubro	1	392	30%	5º/Final	outubro	1
353	0%	9º/Final	outubro	1	393	30%	6º/Final	outubro	1
354	0%	9º/Final	outubro	1	394	30%	6º/Final	outubro	1
355	0%	9º/Final	outubro	1	395	30%	6º/Final	outubro	1
356	0%	9º/Final	outubro	1	396	30%	7º/Final	outubro	3
357	0%	10º/Final	outubro	1	397	30%	7º/Final	outubro	6
358	0%	10º/Final	outubro	3	398	30%	7º/Final	outubro	6
359	0%	10º/Final	outubro	3	399	30%	7º/Final	outubro	6
360	15%	1º/Final	outubro	9	400	30%	7º/Final	outubro	1

Isolado	Trat.	Ciclo/Período	Época	Perfil PFGE
401	30%	8º/Final	outubro	3
402	30%	8º/Final	outubro	3
403	30%	8º/Final	outubro	1
404	30%	9º/Final	outubro	6
405	30%	9º/Final	outubro	1
406	30%	10º/Final	outubro	1
407	30%	10º/Final	outubro	6
408	30%	10º/Final	outubro	12
409	30%	10º/Final	outubro	1
410	60%	1º/Final	outubro	13
411	60%	1º/Final	outubro	1
412	60%	1º/Final	outubro	17
413	60%	1º/Final	outubro	3
414	60%	2º/Final	outubro	13
415	60%	2º/Final	outubro	1
416	60%	3º/Final	outubro	1
417	60%	3º/Final	outubro	1
418	60%	4º/Final	outubro	12
419	60%	4º/Final	outubro	3
420	60%	4º/Final	outubro	1
421	60%	4º/Final	outubro	3
422	60%	5º/Final	outubro	1
423	60%	5º/Final	outubro	1
424	60%	6º/Final	outubro	1
425	60%	6º/Final	outubro	1
426	60%	7º/Final	outubro	9
427	60%	7º/Final	outubro	1
428	60%	7º/Final	outubro	1
429	60%	7º/Final	outubro	6
430	60%	8º/Final	outubro	1
431	60%	8º/Final	outubro	4
432	60%	8º/Final	outubro	1
433	60%	8º/Final	outubro	1
434	60%	8º/Final	outubro	6
435	60%	9º/Final	outubro	1
436	60%	9º/Final	outubro	6
437	60%	9º/Final	outubro	6
438	60%	9º/Final	outubro	1
439	60%	10º/Final	outubro	1
440	60%	10º/Final	outubro	11
441	60%	10º/Final	outubro	6