

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITO DA CLARIFICAÇÃO NA MICROBIOTA E QUALIDADE
DA CACHAÇA ORGÂNICA**

Vitor Teixeira

Tecnólogo em Biocombustíveis

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITO DA CLARIFICAÇÃO NA MICROBIOTA E QUALIDADE
DA CACHAÇA ORGÂNICA**

Vitor Teixeira

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton

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

T266e Teixeira, Vitor
Efeito da clarificação na microbiota e qualidade da cachaça orgânica / Vitor Teixeira. -- Jaboticabal, 2016
viii, 63 p. 13 il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientadora: Márcia Justino Rossini Mutton
Banca examinadora: Everlon Cid Rigobelo, Francisco Vicente Gaiotto Cleto
Bibliografia

1. Cana-de-açúcar. 2. Antimicrobiano. 3. *Moringa oleífera* Lamarck. 4. Matéria-prima. 5. *Saccharomyces cerevisiae*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.61

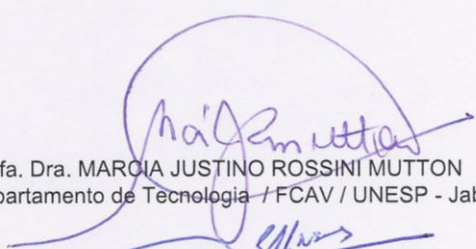
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EFEITO DA CLARIFICAÇÃO NA MICROBIOTA E QUALIDADE DA CACHAÇA
ORGÂNICA

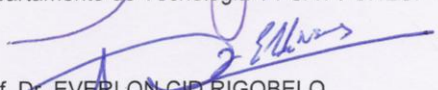
AUTOR: VÍTOR TEIXEIRA

ORIENTADORA: MARCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON

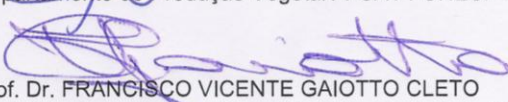
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MICROBIOLOGIA
AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dra. MARCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. EVERLONCID RIGOBELLO
Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



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

Jaboticabal, 12 de dezembro de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

VITOR TEIXEIRA – Nasceu aos 23 de setembro de 1993, na cidade de Novo Horizonte, estado de São Paulo. Em janeiro de 2011 ingressou no curso Superior em Tecnologia em Biocombustíveis na Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal – “Nilo de Stéfani”, Campus de Jaboticabal, recebendo o título de Tecnólogo em Biocombustíveis em 2014. A partir de abril de 2012 passou a integrar aos grupos de pesquisa “Processos Biotecnológicos aplicados à Agroindústria” e “Fisiologia e Manejo Sustentável da cana-de-açúcar”, participando de diversos projetos. Em agosto de 2014 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária da FCAV-UNESP Jaboticabal, SP, obtendo o título de Mestre em dezembro de 2016.

Epígrafe

“Só se pode alcançar um grande êxito quando
nos mantemos fiéis a nós mesmos.”

Friedrich Nietzsche

**A minha família, por todo amor,
apoio, dedicação e incentivo.**

Dedico.

**A Profa. Dra. Márcia Justino
Rossini Mutton e Prof. Dr. Miguel
Angelo Mutton, por toda ajuda,
paciência e conhecimento
profissional e de vida transmitido.**

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por ter-me iluminado e guiado na minha trajetória;

Aos meus pais e irmão, por todo carinho, apoio, incentivo e ajuda nas horas mais difíceis;

A Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton e ao Prof. Dr. Miguel Angelo Mutton, pela oportunidade, orientação e ensinamentos para minha vida profissional e pessoal;

Ao Programa de Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV/UNESP) pela oportunidade de realizar o curso de mestrado;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo;

A equipe do Laboratório de Tecnologia do Açúcar e do Alcool: Aline, Cristhyane, Franciele, Gustavo, Juliana, Karen, Letícia, Lidyane, Marcel, Matheus, Nathieli, Nayara, Osania, Sérgio e Welton, por toda ajuda e amizade durante o curso.

Aos membros da banca examinadora, Francisco Vicente Gaiotto Cleto e Everlon Cid Rigobelo, pela participação, disponibilidade e considerações;

A Usina São Francisco e ao Sr. Eduardo Garcia pelo fornecimento da cana orgânica;

A Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso (UFLA), pelo auxílio nas análises de carbamato de etila;

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

Aos meus amigos Daiane, Gabriela, Marina, Pablo, Raissa e Thiago por toda amizade, conselho, comemorações e momentos que passamos juntos;

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

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. Cachaça.....	11
2.2. Matéria-prima e composição tecnológica.....	12
2.3. Clarificação do caldo.....	15
2.4. Processo fermentativo.....	16
2.5. Compostos secundários e a qualidade da cachaça.....	17
2.5.1. Álcoois superiores.....	20
2.5.2. Ésteres.....	20
2.5.3. Aldeídos.....	21
2.5.4. Furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF).....	21
2.5.5. Ácidos orgânicos.....	21
2.5.6. Metanol.....	22
2.5.7. Carbamato de etila.....	22
2.5.8. Contaminantes inorgânicos.....	23
2.6. <i>Moringa oleifera</i> Lamark.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Delineamento experimental.....	25
3.2. Matéria-prima.....	25
3.3. Preparo do extrato de sementes de moringa.....	25
3.4. Extração e clarificação do caldo.....	26
3.5. Preparo do mosto.....	26
3.6. Preparo do inóculo.....	27
3.7. Processo fermentativo.....	27
3.8. Avaliação microbiológica.....	28

3.9. Caracterização dos vinhos.....	28
3.10. Destilação.....	28
3.11. Determinação e caracterização dos destilados.....	29
3.13. Análise dos resultados.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1. Caracterização tecnológica dos caldos extraídos.....	30
4.2. Clarificação do caldo.....	33
4.3. Caracterização tecnológica do mosto.....	35
4.4. Processo fermentativo.....	39
4.5. Caracterização tecnológica dos vinhos.....	48
4.6. Determinação e caracterização dos destilados.....	51
5. CONCLUSÕES.....	57
6. REFERÊNCIAS.....	58

EFEITO DA CLARIFICAÇÃO NA MICROBIOTA E QUALIDADE DA CACHAÇA ORGÂNICA

RESUMO - Na produção de cachaça, a presença de micro-organismos contaminantes é prejudicial à qualidade da bebida, estes deterioram os colmos e metabolizam os açúcares presentes para a produção de compostos indesejáveis. O objetivo do trabalho foi avaliar a ação da clarificação do caldo e a utilização do extrato de sementes de moringa na redução de micro-organismos contaminantes da fermentação alcoólica e a atividade antimicrobiana do extrato sobre duas matérias-primas diferentes, recém-processada e colmos armazenados por 24h, além dos reflexos dos componentes e caracterização das cachaças. O delineamento experimental foi realizado em parcelas subdivididas com três repetições, empregando-se 3 tratamentos principais: Caldo “in natura”, caldo caleado e caldo caleado com extrato de semente de moringa como floculante. Os tratamentos secundários foram constituídos por colmos recém-colhidos e armazenados por 24 horas. Foram realizadas análises físico-químicas e microbiológicas ao longo do processo de produção, além de análises dos componentes e caracterização das cachaças. A utilização do extrato de semente de moringa na clarificação do caldo resulta em redução significativa de 41,66% na microbiota total do caldo extraído. A matéria-prima não armazenada apresentou menor quantidade de bactérias lácticas e leveduras presente no processo fermentativo. As concentrações dos coeficientes de congêneres diminuíram 5,27% empregando-se o processo de caleagem e 10% com o uso do extrato de sementes de moringa como floculante natural em ambas as matérias-primas. A redução dos compostos deve-se a menor formação dos alcoóis superiores nas cachaças. Conclui-se que o extrato de sementes de *Moringa oleífera* Lamarck apresenta atividade antimicrobiana sobre a microbiota total da matéria-prima, redução de bactérias lácticas durante o processo fermentativo e menor formação de alcoóis superiores na cachaça. O processamento de matéria-prima armazenada acarreta em um processo fermentativo com maiores contaminantes e produção de compostos indesejáveis.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Antimicrobiano; *Moringa oleífera* Lamarck; Matéria-prima; *Saccharomyces cerevisiae*.

EFFECT OF CLARIFICATION IN MICROBIOTE AND QUALITY OF ORGANIC SPIRIT

ABSTRACT- In the production of cachaça, the presence of contaminating microorganisms is detrimental to the quality of the beverage, they deteriorate the stalks and metabolize the sugars present for the production of undesirable compounds. The objective of this work was to evaluate the action of broth clarification and the use of the moringa seed extract in the reduction of microorganisms contaminating the alcoholic fermentation and the antimicrobial activity of the extract on two different raw materials, freshly processed and stored stems For 24 hours, besides the component reflexes and characterization of the cachaças. The experimental design was carried out in subdivided plots with three replicates, using 3 main treatments: "In natura" broth, calyx broth and calyx broth with moringa seed extract as flocculant. Secondary treatments consisted of freshly harvested stalks and stored for 24 hours. Physicochemical and microbiological analyzes were carried out throughout the production process, as well as component analysis and characterization of cachaças. The use of the moringa seed extract in broth clarification results in a significant reduction of 41.66% in the total microbiota of the extracted broth. The non-stored raw material showed less lactic acid bacteria and yeast present in the fermentation process. The concentrations of the congeners coefficients decreased 5.27% using the chalking process and 10% with the use of the moringa seed extract as natural flocculant in both raw materials. The reduction of the compounds is due to the lower formation of the higher alcohols in the cachaças. It is concluded that the *Moringa oleifera* Lamarck seed extract presents antimicrobial activity on the total microbiota of the raw material, reduction of lactic bacteria during the fermentation process and lower formation of higher alcohols in the cachaça. The processing of stored raw material entails a fermentation process with higher contaminants and production of undesirable compounds.

Index terms: Sugar cane; Antimicrobial; *Moringa oleifera* Lamarck; Raw material; *Saccharomyces cerevisiae*.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Principais alcoóis superiores encontrados na cachaça.....	19
Figura 2 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Viabilidade das células, Índice de brotamento e viabilidade dos brotos no inóculo do tratamento do caldo.....	40
Figura 3 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Micro-organismos totais, Bactérias lácticas e Leveduras no inóculo do tratamento do caldo.....	40
Figura 4 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Viabilidade das células, Índice de brotamento e viabilidade dos brotos no inóculo da qualidade da matéria-prima.....	41
Figura 5 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Micro-organismos totais, Bactérias lácticas e Leveduras no inóculo da qualidade da matéria-prima.....	42
Figura 6 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Viabilidade das células, Índice de brotamento e viabilidade dos brotos no início do processo fermentativo do tratamento do caldo.....	43
Figura 7 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Micro-organismos totais, Bactérias lácticas e Leveduras no início do processo fermentativo do tratamento do caldo.....	43
Figura 8 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Viabilidade das células, Índice de brotamento e viabilidade dos brotos no início do processo fermentativo da qualidade da matéria-prima.....	44
Figura 9 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Micro-organismos totais, Bactérias lácticas e Leveduras no início do processo fermentativo da qualidade da matéria-prima.....	44
Figura 10 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Micro-organismos totais, Bactérias lácticas e Leveduras no final do processo fermentativo da qualidade da matéria-prima.....	45
Figura 11 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Viabilidade das células, Índice de brotamento e viabilidade	

dos brotos no final do processo fermentativo da qualidade da matéria-prima.....

Figura 12 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Micro-organismos totais, Bactérias lácticas e Leveduras no final do processo fermentativo do tratamento do caldo..... 47

Figura 13 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Viabilidade das células, Índice de brotamento e viabilidade dos brotos no final do processo fermentativo do tratamento do caldo..... 47

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Limite dos compostos secundários na cachaça.....	18
Tabela 2 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Brix, pH, ART, AR, Acidez Total, Pol e Pureza do caldo extraído para os colmos armazenados.....	30
Tabela 3 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Nitrogênio, Potássio, Cálcio, Magnésio Zinco, Ferro, Cobre, Sódio e Mangânes do caldo extraído para os colmos armazenados.....	31
Tabela 4 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Micro-organismos totais, Bactérias lácticas e Leveduras do caldo extraído.....	32
Tabela 5 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para pH, Acidez Total e ART dos caldos clarificados.....	33
Tabela 6 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Nitrogênio, Potássio, Cálcio, Magnésio Zinco, Ferro, Cobre, Sódio e Mangânes dos caldos clarificados.....	35
Tabela 7 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para pH, Acidez Total e ART dos mostos.....	36
Tabela 8 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Micro-organismos totais, Bactérias lácticas e Leveduras dos mostos.....	37
Tabela 9 – Resultados da interação dos tratamentos TxM para Bactérias lácticas dos mostos.....	37
Tabela 10 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Nitrogênio, Potássio, Cálcio, Magnésio Zinco, Ferro, Cobre, Sódio e Mangânes dos mostos.....	39
Tabela 11 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para pH, Acidez Total, ARRT, Teor Alcoólico e Teor de Glicerol dos vinhos.....	49

Tabela 12 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Nitrogênio, Potássio, Cálcio, Magnésio Zinco, Ferro, Cobre, Sódio e Mangânes dos vinhos.....

Tabela 13 – Análise dos componentes e caracterização das cachaças..... 53

Tabela 14 – Resultados da análise do teor de Nitrogênio, Potássio, Cálcio, Magnésio Zinco, Ferro, Sódio e Mangânes das cachaças..... 55

1. INTRODUÇÃO

Cachaça é a denominação da bebida destilada de mosto fermentado de cana-de-açúcar, produzida exclusivamente no Brasil. Seu consumo, no país de origem, corresponde a 50% de todos os destilados, sendo a segunda bebida alcoólica mais consumida. Mundialmente ocupa a terceira posição no ranking de bebida destilada (IBRAC, 2015; SEBRAE, 2016).

Atualmente, seu consumo tem sido crescente, assim como a busca por produtos de qualidade, que atendam os requisitos de segurança alimentar, nacionais e internacionais, para tanto. Sob este foco as melhorias nos processos de produção são necessárias.

Avaliando-se a cadeia produtiva verifica-se que diversos micro-organismos, como as bactérias lácticas, são encontrados na matéria-prima. Além destas, a presença de leveduras contaminantes, tais como as *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Kloeckera*, dentre outras cepas. Considera-se que estes são indesejáveis quando presentes em níveis acima de 10^8 UFC.mL⁻¹, outra desvantagem é que as leveduras selvagens apresentam baixa taxa de multiplicação, intolerância ao etanol e baixa eficiência fermentativa.

As contaminações ocorrem a partir do corte da cana, quando os colmos podem ser colonizados por essas leveduras e bactérias, iniciando o processo de deterioração, como a formação de compostos indesejáveis e multiplicação dos micro-organismos contaminantes. Após algum tempo observa-se a redução dos açúcares redutores totais, pH e o aumento da acidez do caldo.

Tais compostos são classificados como congêneres (ácidos, ésteres, aldeídos, furfural, entre outros) e contaminantes orgânicos (álcool metílico, carbamato de etila, acroleína, entre outros), que podem impossibilitar a aceitação do mercado consumidor, por influenciar negativamente sobre os aspectos sensoriais do produto, ou ainda, serem tóxicos ao ser humano.

Neste contexto, a utilização de recursos nas etapas da produção pode resultar em um produto de melhor qualidade, Uma alternativa viável para redução

destes micro-organismos contaminantes é o tratamento de caldo que possibilita a remoção das impurezas presente no caldo, tais como ácidos orgânicos, gomas, lipídios, compostos inorgânicos, dentre outros.

Resultados de estudos com o processo de clarificação, empregando fontes naturais que possam substituir a ação coagulante do polímero sintético, estão sendo desenvolvidas atualmente. Dentre as alternativas economicamente promissoras, destaca-se a *Moringa oleifera* Lamark com atividade floculativa similar ao polímero sintético, tanto para a produção de açúcar e etanol. Cabe ainda destacar, além da atividade floculativa, as sementes possuem proteínas características de atividade antifúngica e antibacteriana, tais proteínas pertencem à família das 2S albuminas, apresentam estabilidades a alteração de pH e ponto de fusão de 98°C.

Esta pesquisa objetivou avaliar a ação da clarificação do caldo e a utilização do extrato de sementes de moringa na redução de micro-organismos contaminantes da fermentação alcoólica e a atividade antimicrobiana do extrato sobre duas matérias-primas diferentes, recém-processada e colmos armazenados por 24h, além dos reflexos dos componentes e caracterização das cachaças.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cachaça

Cachaça é a denominação típica e exclusiva de aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38% a 48% (v/v a 20°C), obtida pela destilação de mosto fermentado de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares (BRASIL, 2005).

Seu consumo, no país de origem, corresponde a 50% de todos os destilados e a segunda bebida alcoólica mais consumida, mundialmente, a cachaça é a terceira bebida destilada mais consumida (IBRAC, 2015; SEBRAE, 2016).

Embora a legislação não estabeleça distinção entre os produtos finais das destilarias industriais e dos alambiques, existem, na prática, algumas diferenças. A cachaça conhecida como “artesanal” é geralmente produzida por pequenos produtores e em menor escala, com a destilação do vinho em alambiques, havendo a separação de frações (cabeça, coração e cauda), sendo 80% o coração (parte nobre do destilado). A cachaça de coluna é uma bebida produzida geralmente em escala industrial, utilizando-se de colunas para sua destilação (OLIVEIRA, 2010).

O estado de Minas Gerais se destaca como maior produtor de cachaça artesanal de alambique do Brasil, sendo mais de 60% do total produzido, segundo estimativas da Associação Mineira dos Produtores de Cachaça de Qualidade (BARBOSA, 2013).

A cachaça ganhou destaque e qualidade nos últimos anos, antes associada à ideia de bebida desvalorizada e de baixa qualidade. Gradativamente observa-se que os consumidores têm desmistificado este conceito, sendo a bebida hoje comparada a destilados nobres como uísque e vodca (SEBRAE, 2016).

O uso de linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* e os cuidados com a contaminação durante a cadeia produtiva da cachaça são fatores determinantes na qualidade do produto final. Por essa razão a fase fermentativa merece destaque especial, pois nesta fase podem-se formar compostos secundários que afetam diretamente a qualidade do produto final (ALCARDE, 2014).

Diante desse atual cenário, têm-se a necessidade de melhorias e controles mais rígidos que atendam às novas exigências do mercado de forma a estimular a qualidade da bebida.

A qualidade é o fator fundamental para que o produto seja aceito, tendo características e peculiaridades próprias, sendo a da cachaça influenciada por diversos fatores, como matéria-prima, fermentação, destilação, envelhecimento (CARDOSO, 2013).

2.2. Matéria-prima e composição tecnológica

A matéria-prima que chega do campo a indústria está diretamente ligada à qualidade do produto final, pois ao processar matérias que não pertencem à cana-de-açúcar, estas causam desgastes na moenda, entupimentos das tubulações prejudicando tanto o processo fermentativo quanto a produção de açúcar (MARQUES *et al*, 2008).

Mutton & Mutton (1992) ressaltam que para a unidade industrial, a cana-de-açúcar deve atender a um conjunto de parâmetros tecnológicos e microbiológicos, os quais são constituintes de qualidade. Os principais fatores são a cultivar da cana, o meio ambiente, pragas e doenças e, planejamento agrícola, tais como o plantio, maturação e o manejo da colheita.

Outros parâmetros de qualidade da matéria-prima que são avaliados são a genética da planta, tratos culturais, extração do caldo, tratamento do caldo, composição do caldo, entre outros fatores.

A cana-de-açúcar é constituída tecnologicamente por uma parte insolúvel (8-14%) e outra solúvel (86-92%). A parte insolúvel é representada pela fibra, sendo esta composta por celulose, hemicelulose e lignina. A parte solúvel é o caldo (86-92%), sendo este composto por água (75-82%) e de sólidos solúveis (Brix) (18-25%). Os sólidos solúveis são formados por açúcares (15-24%), constituídos pela sacarose (14-24%), glicose (0,2-1%) e frutose (0,2-1%); e por não açúcares (1-2,5%) como compostos orgânicos (0,8-1,8%) e inorgânicos (0,2-0,7%) (DINARDO-MIRANDA *et al.*, 2008).

O caldo da cana possui uma porcentagem significativa de ácidos orgânicos, que podem ser voláteis (encontrados em grandes concentrações em canas já em estado de deterioração) e não voláteis (em maior quantidade em canas em estado sadio) (RIPOLI & RIPOLI, 2009). Este é representado pela acidez titulável do caldo de cana, sendo o principal, o ácido aconítico, porém, o ácido oxálico e o ácido cítrico também são encontrados na cana-de-açúcar (FERMENTEC, 2012).

O colmo de cana com deterioração elevada resulta em caldo com acidez acima de $1,5\text{g.L}^{-1}$ de H_2SO_4 , valores ideais são menores que $0,8\text{g.L}^{-1}$ de H_2SO_4 . Os ácidos orgânicos em quantidade elevada interferem no processo de decantação, e posteriormente a recuperação da fábrica (RIPOLI & RIPOLI, 2009). A concentração de ácido aconítico é maior nas folhas e ponta do que no colmo, por isso, realiza-se o corte da ponta. Quanto mais ácidos presentes no caldo, maior a quantidade de cal necessária para ajustar o pH, pois ocorre a competição deste com o fosfato pelo íon cálcio (FERMENTEC, 2012).

Alguns dos compostos fenólicos presentes no caldo de cana-de-açúcar são os taninos, derivados da d-catequina (Honig, 1969) e a antocianina que pertence ao grupo de polifenóis, são compostos que ao se combinarem com os sais de ferro ocasionam a coloração do caldo (ALBUQUERQUE, 2011).

O teor de sacarose pode ser reduzido através de reações na planta, sendo causada por danos físicos a planta ou influência de pragas, uma das principais reduções é o desvio deste para a síntese de compostos fenólicos, sendo um sistema de defesa da planta contra o ataque de insetos (SILVA *et al.*, 2005). O aumento da concentração dos compostos fenólicos no caldo interfere na cor do cristal de açúcar, gerando conseqüentemente menor qualidade e prejudicando o processo fermentativo, da atividade das leveduras.

Os compostos inorgânicos são os nutrientes presentes no solo que são absorvidos pela planta, são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento da mesma. Estes representam 1% de toda cana-de-açúcar e, mesmo em quantidade baixa no caldo, os compostos inorgânicos influenciam sobre a qualidade do caldo para produção a produção.

Os nutrientes disponíveis no caldo extraído desempenham papel de catalizadores das principais enzimas do processo fermentativo, neste sentido deve-

se observar a necessidade dos diferentes nutrientes no caldo extraído, e no mosto. Segundo Amorim (1985) e Fermentec (2004) as concentrações recomendáveis são de 50 a 150ppm de nitrogênio na forma amoniacal, 700 a 1300ppm de potássio, 200ppm de magnésio, 1 a 5ppm de manganês, zinco, ferro e cobre.

A falta desses nutrientes é prejudicial ao processo, já que o potássio (K) constituem um dos íons mais importantes possibilitando a existência de gradientes iônicos através das membranas celulares, mantendo a pressão osmótica e o pH. O magnésio (Mg) desempenha papel importante como co-fator de diversas reações metabólicas, tal como a produção de citrato na via glicolítica e a exportação de acetato para o exterior da célula

O cálcio (Ca) é um macronutriente fundamental para a cultura da cana-de-açúcar, sendo também constituinte das leveduras. Entretanto, considerando-se o processo produtivo pode ser considerado elemento que tem efeito negativo para a o processo fermentativo, podendo causar impermeabilização das células.

Quanto ao teor de nitrogênio, de acordo com o Lima *et al.* (2001), a fonte de nitrogênio ideal para as leveduras deve ser nas formas amoniacal (NH_4^+), amídica (uréia) ou amínica (aminoácidos).

Estes elementos variam em quantidade no caldo conforme a matéria-prima, havendo predominância dos álcalis óxido de potássio (K_2O) e óxido de sódio (Na_2O) sempre na forma iônica, representando de 50 a 70% do total de cátions dissolvidos no caldo (ALBUQUERQUE, 2011). Além destes, encontra-se ainda os cátions óxido de magnésio (MgO), óxido de cálcio (CaO), óxido de ferro (Fe_2O_3), óxido de alumínio (Al_2O_3). Este compostos apresentam diferentes comportamentos quando submetidos ao processo de clarificação do caldo (HONIG, 1969).

A clarificação do caldo tem por finalidade remover parte destes compostos presentes no caldo que interferem na qualidade e rendimento do produto final. O principal objetivo da clarificação ou tratamento do caldo é a remoção das impurezas presentes no caldo extraído (EGGLESTON *et al.*, 2002).

2.3. Clarificação do caldo

O processo de clarificação consiste em remover impurezas (vegetais, minerais, etc) presentes no caldo, sendo a mais utilizada a caleagem, sendo este um alcalinizante de menor custo. Inicialmente separam-se os compostos insolúveis no caldo, como o bagacilho, através do peneiramento, em seguida, remove-se a terra em suspensão, por ação de um hidrociclone (ALBUQUERQUE, 2011).

Depois da remoção das impurezas insolúveis, é submetido à adição de cálcio, na forma de leite de cal, até faixa de pH 6,0, os quais reagem com fosfatos já presentes na solução, resultando na formação de fosfatos de cálcio (insolúveis). A seguir, o caldo caleado é aquecido até ebulição para acelerar a reação entre o cálcio e o fósforo, e coagular proteínas. Após aquecimento, eliminam-se os gases dissolvidos e o caldo caleado é direcionado para o decantador, para precipitação dos fosfatos de cálcio formados, além das proteínas e, outros compostos, como os ácidos orgânicos (REIN, 2012).

Objetivando acelerar a sedimentação das moléculas insolúveis formadas adicionam-se polieletrólitos. Estes são sintetizados a partir de acrilamidas, resultando em poliacrilamidas parcialmente hidrolisadas. Sua atividade acelera a floculação das impurezas do caldo, obtendo uma clarificação mais rápida e com um menor volume de lodo. O polieletrólito caracteriza-se por ser solúvel em água, apresentar elevado peso molecular e cargas iônicas livres, desestabilizando as partículas em suspensão e dissolvidas, que se ligam as impurezas presentes no caldo e precipitam em grandes flocos, tornando o caldo mais límpido e sem modificar o pH (ALBUQUERQUE, 2011).

Em estudos do processo de clarificação, encontra-se a busca por produtos de fontes naturais, que possam possibilitar em um processo de produção orgânico, a ação coagulante gerada pelo polímero sintético utilizado no caldo de cana atualmente pela indústria. Entre as alternativas economicamente mais promissoras, destaca-se a *Moringa oleifera* Lamark.

2.4. Processo fermentativo

A principal etapa do processo de produção é o processo fermentativo, onde através da oxidação anaeróbica parcial da glicose, pela ação das leveduras, ocorre a formação de etanol, CO₂, além de outros metabólitos, como glicerol, ácidos orgânicos e álcoois superiores (NELSON & COX, 2011). Este processo está diretamente associado à qualidade da cachaça, pois é neste que ocorre a produção da maioria dos compostos formadores do aroma e sabor que caracterizam a bebida (CANUTO, 2013).

Deve-se destacar que para que ocorra a fermentação, é imprescindível a padronização do caldo extraído quanto a determinadas condições físico-químicas (mosto), objetivando a maximização da eficiência fermentativa. Essas adequações são: açúcares (14 a 16°Brix), pH (4,5), acidez (2,5 a 3g.L⁻¹ de H₂SO₄), Nutrientes e Temperatura (28-32°C) (LIMA *et al.*, 2001).

Além do preparo do mosto, deve-se considerar a levedura a ser inoculada, uma vez que estas são fundamentais para a produção de moléculas que conferem as características sensoriais a bebida. Os fermentos são classificados como “selvagem”, prensado e selecionado. O primeiro é derivado das leveduras presentes na matéria-prima, sendo o segundo e o terceiro adquiridos em centros comerciais especializados. Atualmente na cadeia produtiva da cachaça no Brasil utilizam-se os três tipos de leveduras. Entretanto, admite-se que o uso de um micro-organismo selecionado para este processo, promove uma bebida de melhor qualidade (LIMA *et al.*, 2001).

Embora o processo de fermentação alcoólica realizada pela levedura seja a principal via de produção de compostos que caracterizam a bebida, há outras fermentações, promovidas por micro-organismos contaminantes, que também conferem a qualidade do produto final. Neste sentido, podem-se citar as fermentações lácticas, butílicas, entre outras (SOUZA, *et al.*, 2013).

Essas fermentações secundárias podem ser realizadas por 180 diferentes espécies de bactérias. Contudo, os principais agentes presentes nas fermentações da cachaça são dos gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus*, indesejáveis em concentrações de 10⁸ UFC.mL⁻¹, além de algumas leveduras contaminantes, como

as *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Kloeckera*, dentre outras cepas. Essas leveduras apresentam baixa taxa de multiplicação, tolerância ao etanol e baixa eficiência fermentativa (ALCARDE, 2014; AMORIM, 2005).

2.5. Compostos secundários e a qualidade da cachaça

Em condições industriais, há desvios na rota metabólica das leveduras de 10% do açúcar consumido para formação dos compostos secundários, conhecidos como, congêneres (componentes secundários ou voláteis “não álcool”). Sendo estes a soma de: aldeídos, álcool superiores (expressos pela soma dos álcoois superiores, acidez volátil, ésteres totais, furfural + hidroximetilfurfural) (FILHO, 2010).

São justamente estes componentes que dão à cachaça gosto-bouquet especiais, caso ao contrário, seria simplesmente uma solução hidro-alcóolica com gosto e cheiro típicos de álcool (Valsechi, 1960). Oriundos de reações que ocorrem, principalmente, durante o processo fermentativo ou na destilação e armazenamento em barris de madeira. Podem proporcionar ao produto aromas delicados ou agressivos, qualidade desejável ou não, assim a importância do controle de seus teores no produto final (Cardoso, 2013).

Os compostos voláteis destilam segundo três critérios: ponto de ebulição, afinidade com álcool/água e teor alcoólico no vapor durante a destilação, sendo que em função do grau de volatilidade, o destilado é dividido em três frações: cabeça, coração e cauda (Léauté, 1990). Sendo o metanol e acetaldeído destilados principalmente na fração cabeça e os álcoois superiores nas frações coração e cauda.

Conforme preconiza as Instruções Normativas nº 13/2005 e nº 28/2014 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, há limites estabelecidos para dar harmonia ao produto e segurança ao consumidor, no que se refere à toxicidade do elemento. Apresentada como composição química e requisitos de qualidade, a soma dos Congêneres não deverá ser inferior a 200mg e nem superior a 650mg por 100mL de álcool anidro, devendo os componentes estar compreendidos entre os limites expressos na Tabela 1 e estruturas químicas na Figura 1.

Tabela 1 - Limite dos compostos secundários na cachaça.

Componentes	Máximo
Acidez volátil, expressa em ácido acético em mg.100mL ⁻¹ de álcool anidro	150
Ésteres totais, expressos em acetato de etila, em mg.100mL ⁻¹ de álcool anidro	200
Aldeídos totais, em acetaldeído, em mg.100mL ⁻¹ de álcool anidro	30
Soma de Furfural e Hidroximetilfurfural, em mg.100mL ⁻¹ de álcool anidro	5
Soma dos álcoois isobutílico (2-metilpropanol), isoamílicos (2-metil -1- 360 - butanol +3 metil-1-butanol) e n-propílico (1- propanol),em mg.100mL ⁻¹ de álcool anidro	360

(BRASIL, 2005)

Também prevista nas mesmas Instruções Normativas a presença de contaminantes (orgânicos e inorgânicos) são estabelecidos em parâmetros máximos, garantindo assim, maior qualidade e saúde para o consumidor.

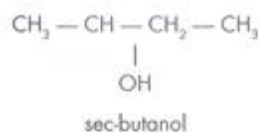
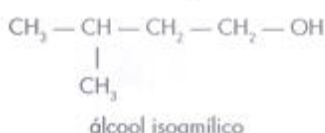
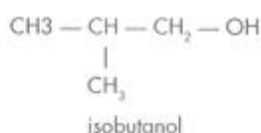
Contaminantes Orgânicos:

- Álcool metílico em quantidade não superior a 20,0mg.100mL⁻¹ de álcool anidro.
- Carbamato de etila em quantidade não superior a 210µg.100L⁻¹.
- Acroleína (2-propenal) em quantidade não superior a 5mg.100mL⁻¹ de álcool anidro.
- Álcool sec-butílico (2-butanol) em quantidade não superior a 10mg.100mL⁻¹ de álcool anidro.
- Álcool n-butílico (1-butanol) em quantidade não superior a 3mg.100mL⁻¹ de álcool anidro.

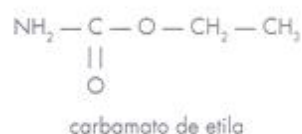
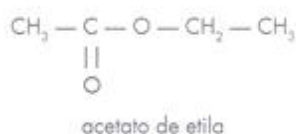
Contaminantes Inorgânicos:

- Cobre (Cu) em quantidade não superior a 5mg.L^{-1} (cinco miligramas por litro)
- Chumbo (Pb) em quantidade não superior a $200\mu\text{g.100L}^{-1}$ (duzentos microgramas por litro).
- Arsênio (As) em quantidade não superior a $100\mu\text{g.100L}^{-1}$ (cem microgramas por litro).

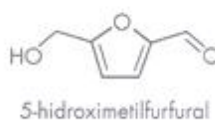
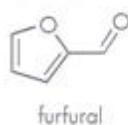
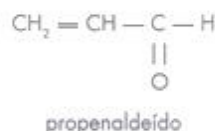
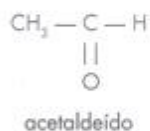
Alcoóis superiores



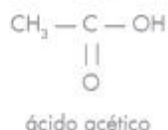
Ésteres



Aldeídos



Ácidos orgânicos



Fonte: Adaptado Alcarde (2014)

Figura 1 – Principais compostos secundários encontrados na cachaça.

2.5.1. Álcoois superiores

Os alcoóis superiores são compostos formados por mais de dois átomos de carbono, sua formação ocorre durante o processo fermentativo, proveniente de reações de degradação de aminoácidos. Esses compostos, formados por até cinco átomos de carbono, tornam-se oleosos e apresentam odores característicos de bebidas destiladas, dando a característica do “buquê” das bebidas, com aroma de flores (ALCARDE, 2014)

Os alcoóis superiores apresentam propriedades biológicas, depressores do sistema nervoso central, entretanto, não provocando acidose nem lesão na retina (CARDOSO, 2013).

Os principais alcoóis superiores encontrados são os isobutílico (2-metil propanol-1), amílico (pentanol-1), isoamílico (3-metilbutanol-1), sec-butilico (butanol-2), propílico (propanol-1) e butílico (butanol-1). A formação destes compostos é maior em leveduras de baixa atividade, elevadas temperaturas, baixo pH do mosto, canas armazenadas e o processamento de pontas, devido a maior quantidade de aminoácidos (CARDOSO, 2013).

2.5.2. Ésteres

Os ésteres compõem a maior classe de compostos aromáticos nas bebidas alcoólicas, apresentando aroma típico, agradável, pungente e suave para a formação do “buquê”, característico frutado.

São compostos formados principalmente por reações de esterificação, através de reações entre alcoóis e ácidos carboxílicos, durante o processo oxidativo (ALCARDE, 2014), sua formação ocorre durante o metabolismo secundário intracelular das leveduras durante o processo fermentativo.

Dentre os ésteres formados, o principal presente nas cachaças é o acetato de etila, seguido pelo lactato de etila, representando 95% destes compostos na bebida, entretanto, em grandes quantidades, confere à bebida um sabor indesejável e enjoativo (ALCARDE, 2014; CARDOSO, 2013).

2.5.3. Aldeídos

Os aldeídos são compostos muito voláteis, encontrados em maior concentração na fração “cabeça”, apresenta odor penetrante, que afetam o “buquê” da bebida. Sua formação ocorre através da levedura, em estágios preliminares ao processo fermentativo. Através de reações de oxidação de aminoácidos, alcoóis ou ácidos graxos, dentre eles, os mais encontrados são o acetaldeído, formaldeído e propenaldeído (2-propenal, acroleína) (ALCARDE, 2014).

Outros aldeídos formados com até oito átomos de carbono apresentam aromas penetrantes e enjoativos. Já os aldeídos com mais de dez átomos de carbono apresentam aroma mais agradável aos consumidores. Sua formação excessiva pode causar intoxicação, levando a sérios problemas relacionados ao sistema nervoso central (CARDOSO, 2013).

2.5.4. Furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF)

O furfural e 5-hidroximetilfurfural são aldeídos que apresentam forma líquida oleosa incolor, com odor peculiar, podendo formar cor amarelada ou castanha mediante a exposição ao ar e luz. Afetam o sistema nervoso central, podendo causar dermatite, irritação da mucosa e trato respiratória. (AZEVEDO *et al.*, 2007).

Sua formação é decorrente pela queima da palha da cana antes da colheita e pela pirogênese de pentoses e hexoses residuais da fermentação durante a destilação do vinho (ALCARDE, 2014).

2.5.5. Ácidos orgânicos

Dentre os ácidos orgânicos, o mais presente é o ácido acético, representando 90 a 93% do conteúdo total de ácidos da bebida. Sua presença dá a bebida uma característica ácida e desagradável ao consumidor (ALCARDE, 2014).

Sua formação é decorrente por contaminação da cana ou do próprio mosto por bactérias acéticas e ou por aeração do mosto durante o processo fermentativo,

estimulando a levedura metabolizar os açúcares para a produção desse composto (ALCARDE, 2014; CARDOSO, 2013)

2.5.6. Metanol

Composto indesejável a bebida, o metanol é uma molécula formada por um único carbono, sua formação é decorrente da degradação da pectina, um polissacarídeo presente na cana-de-açúcar (CARDOSO, 2013).

A molécula da pectina corresponde a um polímero formado pela associação de centenas de moléculas de ácido galacturônico, que possuem fragmentos de moléculas de metanol. Durante o processo fermentativo, a pectina sofre hidrólise ácida ou enzimática, liberando este composto (ZACARONI *et al.*, 2011).

Este composto é metabolizado pelo consumidor da mesma forma que o etanol, sendo tóxico à saúde humana, este composto apresenta velocidade menor de oxidação. O seu consumo excessivo pode causar dores de cabeça, náusea, cegueira e até a morte (CARDOSO, 2013).

2.5.7. Carbamato de etila

O carbamato de etila é um éster etílico do ácido carbâmico, conhecido como uretana ou etiluretana, de aparência incolor, apresenta sabor salino refrescante e levemente amargo (CARDOSO, 2013). Composto natural presente em alimentos proveniente de fermentação, como queijos, pães, bebidas alcoólicas, dentre outros (LACHENMEIER *et al.*, 2010).

Seu controle é de suma importância devido ao seu potencial genotóxico e carcinogênico. Pesquisas indicam que quase a metade das aguardentes e cachaças produzidas no Brasil apresenta concentrações de carbamato de etila acima do limite máximo permitido (Riachi *et al.*, 2014), segundo a Instrução Normativa nº 28/2014, de 210µg.L⁻¹.

Sua formação ainda é incerta, alguns estudos indicam que podem ser formados antes, durante ou depois da destilação, porém seu principal precursor é o

cianeto de hidrogênio, oriundo principalmente da uréia e seus derivados. (ANJOS *et al.*, 2011; MENDONÇA *et al.*, 2016)

2.5.8. Contaminantes inorgânicos

Dentre os contaminantes inorgânicos, os principais encontrados nas cachaças são cobre (Cu), chumbo (Pb) e arsênio (As). Presentes na bebida, esses compostos podem ser oriundos de embalagens, soldas de ligas metálicas do material utilizado na construção do destilador ou até da matéria-prima, com a aplicação de produtos agroquímicos, como herbicidas, inseticidas e fungicidas ou até pelo solo (CARDOSO, 2013; GOMES NETO, 2009).

O cobre é o principal contaminante inorgânico, de presença necessária, este favorece a qualidade da cachaça, atuando como catalisador durante a destilação, eliminando odores desagradáveis, como os sulfetos. Entretanto em concentração máxima exigida pela legislação de 5mg.L^{-1} (BRASIL, 2005). Seu excesso pode ser decorrente de falta de higienização do alambique, com a formação do azinhavre.

2.6. *Moringa oleifera* Lamark

A *Moringa oleifera* Lam. é uma espécie arbórea, originária da Índia, pertence a família Moringaceae, encontrada com frequência na região Nordeste do Brasil. Seu cultivo ocorre em regiões onde ela normalmente é utilizada graças ao valor alimentar das folhas, frutos verdes, flores e sementes. Pode ainda ser utilizado como forrageira, culinária, na indústria de cosméticos e combustíveis (madeira e óleo).

Conhecida como floculante de águas impuras, a moringa é utilizada em processos de clarificação de água, apresentando atividade similar aos floculantes artificiais, tal como o sulfato de alumínio. Suas sementes apresentam proteínas solúveis em água (SCHWARZ, 2000).

Segundo Gallão *et al.* (2006) as sementes da moringa apresentam cerca de 40% de proteína, caracterizada por ser catiônica dimérica de alto peso molecular, que desestabiliza as partículas contidas na água e através de um processo de neutralização e adsorção, floculam e sedimentam os colóides formados.

Freire *et al.* (2015) apontam que em semente de moringa encontram-se até 4 isômeros desta proteína, sendo elas MOCBP3-1, MOCBP3-2, MOCBP3 E MOCBP3-4, que apresentam diferentes aminoácidos. As quais não pertencem a família das proteínas conhecidas pela capacidade floculativa, as 2S albuminas, além de atividade antifúngica e antibacteriana, como relatada por Ullah *et al.* (2015), tais proteínas apresentam estabilidades a alteração de pH e ponto de fusão de 98°C

De acordo com Okuda *et al.* (2001) e Bathia *et al.* (2007) há diversos métodos para extração do princípio ativo responsável pela coagulação das impurezas, sendo a melhor apresentada, com o uso das sementes moídas em agitação em água deionizada, posteriormente, filtrando o extrato. Deve-se destacar ainda, que a extração do princípio ativo da semente da moringa pode ser potencializada utilizando-se soluções salinas (GHEBREMICHAEL *et al.*, 2005). Extrato de sementes apresenta atividade floculativa similar ao polímero sintético (TEIXEIRA, 2013), tanto para a produção de açúcar e etanol (COSTA *et al.*, 2015; MACRI *et al.*, 2014).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia do Açúcar e do Alcool e Microbiologia das Fermentações, do Departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP – Campus de Jaboticabal, na safra 2015/2016.

3.1. Delineamento experimental

O delineamento utilizado foi o em parcelas subdivididas com três repetições, empregado 3 tratamentos principais: Caldo “in natura”, caldo caleado e caldo caleado mais o extrato de semente de *M. oleifera* Lamarck (moringa) como floculante. E 2 tratamentos secundários constituídos por colmos recém colhidos (0 hora) e colmos armazenados (24 horas).

3.2. Matéria-prima

A variedade de cana-de-açúcar utilizada foi a CTC8, livre de pragas e doenças. A cultura foi cultivada no sistema orgânico de produção, colhida manualmente, com prévio desponte e despalha sem queima.

Colhida no período útil de industrialização, segundo recomendável por Coplana (2016), em unidade agroindustrial da região de Sertãozinho – SP. Para avaliar a manutenção das características químico-tecnológicas, a matéria-prima foi mantida em casa de vegetação com temperatura controlada (24 – 36°C), por 24h após a colheita.

3.3. Preparo do extrato de sementes de moringa

O extrato foi preparado de acordo com Okuda *et. al.* (2001), as sementes foram coletadas de plantas cultivadas no município de Taquaritinga – SP. Após as sementes foram secas a 60°C em estufa de fluxo de ar por 24h e armazenadas até utilização. O extrato foi preparado diariamente, as sementes foram maceradas e

imersas em solução de CaCl_2 a $0,1\text{mol.L}^{-1}$, na proporção de 1g de semente por 100g solução. A mistura manteve-se em agitação por 10 minutos, seguindo de uma filtração a vácuo, utilizando-se papel de filtro qualitativo para retenção das partículas grosseiras insolúveis.

3.4. Extração e clarificação do caldo

Nos dias 22, 24 e 26/10/2015, a matéria-prima colhida foi separada em duas amostras de colmos: 1) Recém-cortada e prontamente processada; 2) Armazenada em casa de vegetação com temperatura controlada ($24 - 36^\circ\text{C}$), e processadas 24h após a colheita. Os caldos foram extraídos por moagem e filtrados em membrana de nylon de porosidade de 60 mesh. A seguir quantificou-se os teores de Brix, Açúcares Redutores (AR), Açúcares Redutores Totais (ART), Acidez Total, Pol, Pureza (CTC, 2005), além dos Compostos inorgânicos (Na, Fe, Zn, Mn, Cu, Mg, Ca e K), segundo A.O.A.C. (1997), Teor de Nitrogênio (MALAVOLTA *et al.*, 1997) e pH.

Para os tratamentos em que se realizou a clarificação do caldo, padronizou-se o teor de sólidos solúveis a 16° Brix, ajustou-se o pH 6,0 (hidróxido de cálcio 6°Bé). O caldo caleado foi aquecido até ponto de ebulição, sendo resfriado a 80°C e transferido para decantadores, permanecendo por 2 horas.

Para o tratamento em que se empregou o extrato de moringa, adicionou-se nos decantadores a dosagem de 1300mg.L^{-1} , com duração de 20 minutos do processo de decantação. Os caldos clarificados foram analisados quanto aos teores de Acidez Total, ART (CTC, 2005), Compostos inorgânicos (Na, Fe, Zn, Mn, Cu, Mg, Ca e K), segundo A.O.A.C. (1997), Teor de Nitrogênio (MALAVOLTA *et al.*, 1997) e pH.

3.5. Preparo do mosto

O aquecimento do processo de clarificação, os caldos apresentam aumento na concentração dos sólidos solúveis. Com isso, para o preparo do mosto os caldos

clarificados e o “in natura”, foram ajustados a 16°Brix, com adição de água destilada, temperatura de 32°C e sem correção do pH.

Os mostos foram analisados quanto ao teor de acidez total, ART (CTC, 2005), compostos inorgânicos (Na, Fe, Zn, Mn, Cu, Mg, Ca e K), segundo A.O.A.C. (1997), Teor de Nitrogênio (MALAVOLTA *et al.*, 1997) e pH.

3.6. Preparo do inóculo

O preparo da levedura UFLA CA-11 iniciou-se com a hidratação das células liofilizadas, adaptação ao mosto e multiplicação, segundo LNF Latino Americano (2011). Foram realizadas avaliações microbiológicas para monitoramento da levedura.

Ao final da multiplicação, o inóculo foi centrifugado a 2500g/30°C e mantido em solução salina 0,75% até o início do processo fermentativo. Para a primeira fermentação, o inóculo foi diluído em 1,5 litros de mosto a 6°Brix.

3.7. Processo fermentativo

O processo fermentativo foi realizado em sistema de batelada alimentada em dornas de inox de fundo cônico, com capacidade útil de 6 litros. O inóculo foi utilizado na concentração de 8%.

Foram realizadas duas alimentações, com 30 minutos realizou-se a primeira com 2 litros de mosto a 16°Brix e 90 minutos depois com 2,5 litros de mosto a 16°Brix.

Os finais das fermentações foram estabelecidos quando o Brix dos vinhos apresentavam $\leq 1^\circ\text{Brix}$, com duração média de 12 horas. Após o término, 2/3 da dorna eram sifonado pela abertura lateral, retirando-se o vinho, que era enviado para o processo de destilação.

3.8. Avaliação microbiológica

Durante o processo fermentativo (inóculo, início e final), foram quantificados a viabilidade de células de levedura, índice de brotamento e viabilidade dos brotos (LEE *et al.*, 1991).

A quantificação dos micro-organismos no processo produtivo foi realizada através do método indireto, por plaqueamento em meios seletivos em duplicata. O meio Man Rogosa e Sharpe (MRS) (MAN *et al.*, 1960) foi utilizado para bactérias lácticas, o Wallerstein Laboratories Nutrient (WLN) (GREEN & GRAY, 1950, modificado por OLIVEIRA & PAGNOCA, 1988) para leveduras e fungos totais com adição de ampicilina e ácido nalidíxico, ambos na dosagem de 50 mg.L⁻¹, e o Plate Count Agar (PCA) (USFDA, 1995) para enumeração de micro-organismos totais.

3.9. Caracterização dos vinhos

Ao final das fermentações, os vinhos delevedurados foram quantificados quanto aos teores de Açúcares Redutores Residuais Totais (ARRT) (CTC, 2005), Compostos inorgânicos (Na, Fe, Zn, Mn, Cu, Mg, Ca e K), segundo A.O.A.C. (1997), Teor de Nitrogênio (MALAVOLTA *et al.*, 1997), Teor de glicerol (FERMENTEC, 2003) e Teor alcoólico (densímetro digital).

3.10. Destilação

Os vinhos sifonados pela lateral das dornas, não foram centrifugados devido à atividade flocculativa da levedura UFLA CA-11. Estes foram destilados aos finais das fermentações em alambique de cobre, com capacidade total de 10 litros, aquecido através de fogo direto. Sendo adicionados volumes entre 3,5 - 4 litros de vinho.

As destilações foram conduzidas separando-se as frações de cabeça, coração e cauda, dentre as porcentagem de 10%, 80% e 10%, respectivamente e

realizando amostra composta da fração de coração dentre as repetições de cada tratamento.

3.11. Determinação e caracterização dos destilados

As amostras de cachaças foram submetidas à quantificação de componentes em cromatógrafo gasoso GC Varian 3900, acoplado com software Galaxie Chromatography, coluna Varian Capillary Column, CP – Wax 52 CB, (L= 30 m; Di= 0,53 mm; Ef =1 μ m) #CP8738. Injetou-se 1 μ L de cada amostra nas seguintes condições: temperatura do injetor: 175°C, temperatura do detector: 210°C, empregando-se como gás de arraste: ar sintético. Determinou-se os teores de acroleína, aldeído, ésteres, metanol, álcoois superiores (propílico, isobutílico e isoamílico).

A determinação do carbamato de etila foi realizada segundo Anjos *et al.* (2011), utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. O equipamento empregado foi um cromatógrafo Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão, modelo SPD-M20A, degaseificador modelo DGU-20A3, interface modelo CBM-20A e injetor automático modelo SIL-10AF.

Além destes componentes, o destilado foi analisado quanto ao Teor alcoólico, Acidez volátil (BRASIL, 2005), Condutividade, Turbidez (INMETRO, 2005), Cobre (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005), Compostos inorgânicos (Na, Fe, Zn, Mn, Cu, Mg, Ca e K), segundo A.O.A.C. (1997), Teor de Nitrogênio (MALAVOLTA *et al.*, 1997) e pH.

3.12. Análise dos resultados

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

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização tecnológica dos caldos extraídos

Os resultados para Brix, pH, ART, AR, Acidez Total, Pol e Pureza dos caldos extraídos da matéria-prima recém processada e dos colmos armazenados estão apresentados na Tabela 2. A comparação entre as matérias-primas não apresentaram diferença significativa, com resultados médios de 19,5°Brix, pH 5,22, 16,4% ART, 0,22% AR, 1,02gH₂SO₄.L⁻¹ Acidez Total, 16,78% Pol e 85,82% de pureza.

De acordo com os resultados, pode-se afirmar que as matérias-primas estavam aptas ao processamento por apresentarem valores superiores de 16°Brix, 14% Pol, 15% ART e Pureza acima de 85%, e valores inferiores de 0,8% de AR e 0,8gH₂SO₄.L⁻¹ de Acidez Total (RIPOLI & RIPOLI, 2009).

Tabela 2 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Brix, pH, ART, AR, Acidez Total, Pol e Pureza dos caldos extraídos recém processados e colmos armazenados.

	Brix (°)	pH	ART (%)	AR (%)	Acidez Total (g.L ⁻¹ H ₂ SO ₄)	Pol (%)	Pureza (%)
0h	19,4	5,23	17,39	0,23	0,96	17,05	87,59
24h	19,6	5,21	15,41	0,24	1,08	16,51	84,05
Teste F	0,38ns	0,53ns	0,57ns	1,12ns	1,48ns	0,16ns	0,33ns
DMS	0,74	0,08	7,29	0,02	0,27	3,69	17,05
CV	1,68	0,75	19,60	4,78	11,61	9,69	8,76

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

Em estudos avaliando o armazenamento dos colmos por 24 horas a 30°C, Oliveira Filho (2015) observou aumento significativo do Brix. Krishnakumar *et al.* (2013) obteve redução do pH de 5,72 para 3,77. Comportamento estes, diferente aos obtidos no presente estudo, mesmo não apresentando diferença significativa, ocorreu redução de 11,38% para o ART e 3,54% quando avaliado a pureza.

Este comportamento é decorrente das condições do armazenamento, em ambos os estudos com temperaturas mais elevadas. Em menores temperaturas acarretam em um ambiente menos favorável a multiplicação e ação dos contaminantes sobre a matéria-prima.

Os resultados dos nutrientes (N, K, Ca, Mg, Zn, Fe, Cu, Na e Mn) dos caldos extraídos estão apresentados na Tabela 3. Dentre os valores, exceto so N, não apresentaram diferença significativa entre o caldo proveniente de colmos armazenados e não armazenados.

Tabela 3 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Nitrogênio, Potássio, Cálcio, Magnésio Zinco, Ferro, Cobre, Sódio e Mangânes dos caldos extraídos recém processados e colmos armazenados.

	N	K	Ca	Mg	Zn (mg.L ⁻¹)	Fe	Cu	Na	Mn
0h	38,50B	34,66	8,83	7,33	3,16	5,33	2,16	6,83	3,16
24h	59,50A	37,33	7,66	7,16	2,83	5,16	2,66	7,33	3,50
Teste F	27,00**	0,42ns	0,25ns	0,04ns	0,28ns	0,09ns	0,12ns	0,23ns	0,40ns
DMS	11,23	11,42	6,45	2,22	1,73	1,53	3,98	2,85	1,46
CV	10,10	13,98	34,46	13,50	25,46	12,90	72,66	17,76	19,36

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

O cálcio (Ca) apresentou resultado médio entre as matérias-primas de 8,24mg.L⁻¹. Este sendo um macronutriente fundamental para a cultura da cana-de-açúcar, também constituinte das leveduras, em excesso pode causar impermeabilização das células.

Quanto ao teor de nitrogênio (Tabela 3), o caldo proveniente de colmos armazenados apresenta resultado significativamente maior aos colmos recém-processados, estando dentre o recomendável na concentração de 50 a 150mg.L⁻¹ (AMORIM, 1985; FERMENTEC, 2004). Resultados estes diferentes ao obtido por Oliveira (2016), utilizando uma matéria-prima orgânica (RB867515), apresentou teor de nitrogênio de 108mg.L⁻¹.

Quanto aos teores de Mn, Zn e Cu, entre as matérias-primas, apresentaram resultados médios de 3,33mg.L⁻¹, 2,99mg.L⁻¹, 2,41mg.L⁻¹, respectivamente. Estes estão dentro dos teores sugeridos (1 a 5ppm). Entretanto, quando avaliado o K

(concentração média de $35,99\text{mg.L}^{-1}$) e Mg ($7,24\text{mg.L}^{-1}$) não estão dentre os recomendáveis citados por Amorim (1985) e Fermentec (2004) de 200 e 1 a 5ppm, respectivamente. A falta desses nutrientes é prejudicial ao processo, já que desempenham atividades importantes para o inóculo como controle da pressão osmótica, pH e co-fator de diversar reações metabólicas.

Para quantificação microbiológica e a atividade antimicrobiana da *M. oleifera* Lamarck, também foram determinados a concentração de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL para os micro-organismos totais, bactérias lácticas e leveduras do caldo extraído (Tabela 4).

Tabela 4 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Micro-organismos totais, Bactérias lácticas e Leveduras do caldo extraído.

	Micro-organismos Totais (UFC.mL ⁻¹ x 10 ⁵)	Bactérias Lácticas (UFC.mL ⁻¹ x 10 ⁵)	Leveduras (UFC.mL ⁻¹ x 10 ⁴)
0h	5,58A	5,58B	4,87A
24h	6,59A	6,56A	4,60A
Teste F	5,69ns	7,40*	0,68ns
DMS	1,03	0,87	0,80
CV	9,83	8,34	9,76

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

Os resultados referentes à microbiota do caldo extraído apresentaram diferença significativa para as bactérias lácticas (MRS), aumentando significativamente em 17,56% unidades formadoras de colônias com o armazenamento dos colmos por 24 horas.

As demais avaliações não apresentaram diferença significativa, entretanto o armazenamento dos colmos resultou em uma maior concentração de 18,10% para os micro-organismos totais (PCA) e redução de 5,54% para as leveduras (WLN). Esta variação ocorre devido à interação da microbiota presente no ecossistema da matéria-prima (MADIGAN *et al.*, 2016), resultando na deterioração dos colmos, com a metabolização dos açúcares presentes e a multiplicação, aumentando sua população até o processamento destes colmos (CARDOSO, 2013).

4.2. Clarificação do caldo

Os resultados para pH, Acidez Total e ART dos caldos clarificados estão apresentados na Tabela 5. O extrato de semente de moringa não influenciou a remoção dos ácidos presentes no caldo, estes permaneceram equivalentes nos tratamentos, com ou sem extrato de moringa, através dos resultados de pH e Acidez Total.

Avaliando o tratamento do caldo, através do emprego da clarificação, o uso ou não do extrato de sementes de moringa, não foram observados resultados com diferenças significativas para ART, não ocorrendo perda de açúcares na decantação do lodo. Atividade de suma importância, o processo de decantação não remover os açúcares a serem metabolizados e sim os compostos que interferem negativamente no processo, comportamento semelhante encontrado por Costa *et al.* (2014), que ao utilizar extrato de semente de moringa também não obteve redução do ART.

Tabela 5 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para pH, Acidez Total e ART dos caldos clarificados.

	pH	Acidez Total (g.L ⁻¹ H ₂ SO ₄)	ART (%)
Tratamento do caldo (T)			
Caldo clarificado	5,72	0,73	14,25
Caldo clarificado + MO	5,74	0,78	14,26
Teste F	0,01ns	0,23ns	0,0002ns
DMS	0,47	0,30	2,12
CV	5,17	25,15	9,27
Matéria-prima (M)			
0h	5,83	0,65	15,17A
24h	5,63	0,86	13,35B
Teste F	1,72ns	3,90ns	9,15*
DMS	0,43	0,29	1,67
CV	4,71	24,15	7,30
Inter. TxM	0,005ns	0,19ns	0,75ns

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 < p < 0,05$); ns = não significativo; CV = Coeficiente de variação; DMS = Diferença Mínima Significativa; MO = extrato de sementes de moringa.

Quanto à matéria-prima empregada (Tabela 5), não houve diferenças significativas entre elas em relação à presença de ácidos, não interferindo nos

resultados de pH e Acidez Total. Entretanto, quando avaliado o teor de açúcares redutores totais (ART), a matéria-prima armazenada apresentou uma redução significativa de 12% com o armazenamento dos colmos por 24 horas.

Este resultado é prejudicial, pois ocasiona diminuição dos rendimentos do processo, os açúcares perdidos poderiam ser metabolizados em álcool para a cachaça, além da produção de compostos indesejáveis pelo aumento dos micro-organismos contaminantes, como apresentado na Tabela 4.

Em estudos em condições semelhantes, Krishnakumar *et. al.* (2013) apresenta redução de 23,63% dos açúcares redutores totais. Isso acarreta em impactos nas próximas etapas do processo, como os açúcares redutores totais do mosto, teor alcoólico do vinho e compostos secundários da cachaça.

Os nutrientes avaliados na Tabela 6 (N, K, Ca, Mg, Zn, Fe, Cu, Na e Mn), presentes no caldo clarificado, não apresentaram diferenças significativas nos resultados em relação ao processo de clarificação empregado. Dentre os tratamentos dos caldos, apresentaram resultados médios de 35,51mg.L⁻¹ de N, 61,25mg.L⁻¹ K, 13,85mg.L⁻¹ Ca, 13,16mg.L⁻¹ Mg, 2,84mg.L⁻¹ Zn, 3,45mg.L⁻¹ Fe, 4,45mg.L⁻¹ Cu, 6,33mg.L⁻¹ Na e 3,39mg.L⁻¹ Mn. Mesmo comportamento encontrado no caldo extraído, com aumento no teor de cálcio, em ambos os tratamentos, devido aos resíduos do acréscimo de hidróxido de cálcio para a realização da clarificação, além do aumento no teor de Cu, K e Mg, nutrientes que podem ser acrescentados junto a solução para o processo de caleagem.

Quanto ao teor de Fe e N, houve um decréscimo dos teores em consequência da reação de clarificação do caldo, com remoção de 34,16% de ferro e 27,53% de nitrogênio, parte desses nutrientes junto à borra. Para os demais nutrientes não houve grandes alterações na concentração, devido ao processo de clarificação não remover esses nutrientes, comportamento este semelhante encontrado por Costa (2015), que ao utilizar o extrato de sementes de moringa em solução salina a 1300mg.L⁻¹, obteve remoção significativa apenas para o zinco.

Para o teor de nutrientes de acordo com a matéria-prima utilizada, os resultados mostram que todos, exceto o ferro (redução de 11,20%), não apresentaram diferenças significativas, com o mesmo comportamento de alterações

das concentrações em comparação ao caldo extraído apresentado no tratamento do caldo (Tabela 6).

Tabela 6 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Nitrogênio, Potássio, Cálcio, Magnésio Zinco, Ferro, Cobre, Sódio e Mangânes dos caldos clarificados.

	N	K	Ca	Mg	Zn (mg.L ⁻¹)	Fe	Cu	Na	Mn
Tratamento do caldo (T)									
Caldo clarificado	31,79	58,00	9,83	12,83	3,15	3,62	4,83	6,08	3,20
Caldo clarificado + MO	39,23	64,50	17,87	13,50	2,54	3,29	4,08	6,58	3,58
Teste F	2,15ns	1,61ns	2,86ns	1,23ns	0,18ns	1,88ns	0,23ns	0,52ns	0,43ns
DMS	14,06	14,20	13,20	1,66	3,97	0,67	4,27	1,90	1,57
CV	24,69	14,46	59,43	7,91	86,88	12,17	59,78	18,79	28,91
Matéria-prima (M)									
0h	34,56	67,25	17,08	13,83	2,95	3,66A	4,41	5,91	3,66
24h	36,45	55,25	10,62	12,50	2,75	3,25B	4,50	6,75	3,12
Teste F	0,22ns	2,91ns	1,85ns	2,28ns	0,08ns	10,00*	0,002ns	7,14ns	2,19ns
DMS	11,17	19,54	13,18	2,45	1,93	0,36	4,87	0,86	1,01
CV	19,62	27,64	59,32	11,60	42,33	6,60	68,14	8,53	18,65
Inter. TxM	0,10ns	11,64ns	0,21ns	0,14ns	5,73ns	6,40ns	0,99ns	0,00ns	1,05ns

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 < p < 0,05$); ns = não significativo; CV = Coeficiente de variação; DMS = Diferença Mínima Significativa; MO = extrato de sementes de moringa.

4.3. Caracterização tecnológica do mosto

Os resultados das análises dos mostos, quanto a pH, Acidez Total e Açúcares Redutores Totais (ART) estão apresentados na Tabela 7. Os tratamentos empregados no caldo e a matéria-prima utilizada, não apresentaram resultados com diferenças significativas para pH e a Acidez Total, não reduzindo significativamente os ácidos no processo de clarificação, estando entre os resultados recomendáveis para o processamento (AMORIM, 2005). Além de não apresentar elevação nos teores de ácidos devido a maior presença de contaminantes, comportamento este diferente ao encontrado por Krishnakumar *et. al.* (2013), com redução do pH de 5,72 para 3,77 com o armazenamento dos colmos por 24h a 30°C.

Tabela 7 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para pH, Acidez Total e ART dos mostos.

	pH	Acidez Total (g.L ⁻¹ H ₂ SO ₄)	ART (%)
Tratamento do caldo (T)			
Caldo “in natura”	5,28A	0,91A	13,97A
Caldo clarificado	5,58A	0,64A	13,38A
Caldo clarificado + MO	5,61A	0,75A	13,77A
Teste F	4,42ns	4,20ns	0,17ns
DMS	0,37	0,28	3,08
CV	3,84	20,72	12,70
Matéria-prima (M)			
0h	5,62A	0,70A	14,61A
24h	5,35A	0,83A	12,80B
Teste F	3,72ns	1,55ns	7,81*
DMS	0,33	0,26	1,59
CV	5,33	30,04	10,06
Inter. TxM	0,69ns	0,66ns	0,44ns

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 < p < 0,05$); ns = não significativo; CV = Coeficiente de variação; DMS = Diferença Mínima Significativa; MO = extrato de sementes de moringa.

Avaliando os açúcares redutores totais (ART), o tratamento dos caldos comprova que o processo de clarificação não removeu os açúcares. Entretanto, o armazenamento dos colmos de cana por 24h promoveu redução de 12,38% de ART. Krishnakumar *et. al.* (2013) em condições semelhantes, apresentou redução de 23,63% de ART. Essa redução ocorre devido à metabolização desses açúcares pela maior quantidade de micro-organismos contaminantes presentes nos colmos, conforme apresentado na Tabela 4, tornando-se prejudicial o armazenamento.

Os mostos também foram quantificados quanto aos micro-organismos totais, bactérias lácticas e leveduras, cujos resultados estão apresentados na Tabela 8. Comparando-se o caldo “in natura” com o caldo clarificado, todos apresentaram redução significativa média de 33,96% dos contaminantes em todos os meios cultivados, este comportamento ocorre devido às condições do processo de clarificação, como o aquecimento e a precipitação de impurezas, ocorrendo à remoção dos contaminantes microbiológicos presentes no caldo. Este comportamento é benéfico, visto que estes contaminantes são prejudiciais ao processo produtivo.

Tabela 8 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Micro-organismos totais, Bactérias lácticas e Leveduras dos mostos.

	Micro- organismos Totais (UFC.mL ⁻¹ x 10 ⁵)	Bactérias Lácticas (UFC.mL ⁻¹ x 10 ⁵)	Leveduras (UFC.mL ⁻¹ x 10 ⁴)
Tratamento do caldo (T)			
Caldo “in natura”	6,00A	5,99A	5,04A
Caldo clarificado	4,25B	3,89B	3,12B
Caldo clarificado + MO	3,50C	3,70B	2,84B
Teste F	54,46**	87,00**	8,31**
DMS	0,68	0,53	1,63
CV	10,72	8,50	31,99
Matéria-prima (M)			
0h	4,27B	4,09B	3,16B
24h	4,89A	4,97A	4,18A
Teste F	17,25**	15,54**	8,92*
DMS	0,33	0,50	0,77
CV	8,00	11,99	22,80
Inter. TxM	3,30ns	4,33*	0,30ns

**significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 < p < 0,05$); ns = não significativo; CV = Coeficiente de variação; DMS = Diferença Mínima Significativa; MO = extrato de sementes de moringa.

Tabela 9 – Resultados da interação dos tratamentos TxM para Bactérias lácticas dos mostos.

	0h	24h	
Caldo “in natura”	5,98aA	6,01aA	0,87
Caldo clarificado	3,40bB	4,39bA	
Caldo clarificado + MO	2,90bB	4,51bA	
	0,86	DMS	

Colunas classificadas com letra minúscula; Linhas classificadas com letra maiúsculas; DMS = Diferença Mínima Significativa; MO = extrato de sementes de moringa.

A utilização do extrato de semente de moringa, na clarificação do caldo (Caldo clarificado + MO) apresenta uma redução significativa de 41,66% para a microbiota total quando comparado ao tratamento do caldo “in natura” e 17,64% quando comparado com o caldo clarificado, comprovando sua atividade antimicrobiana, como relatada por Ullah *et al.* (2015) e de maior eficiência para o processo fermentativo.

De acordo com a matéria-prima processada (Tabela 4), devido o aumento dos contaminantes no armazenamento dos colmos, como relatado no caldo extraído (Tabela 2), conseqüentemente o mosto proveniente dos colmos deteriorados apresenta aumento significativo na média de 23,06% para todos os micro-organismos avaliados.

Para as bactérias lácticas, de acordo com os resultados da interação dos tratamentos (Tabela 9), para ambas as matérias-primas empregadas, a clarificação apresenta remoção significativa. Porém mesmo com o tratamento, a matéria-prima armazenada apresenta valor significativamente maior quando avaliada a contaminação por bactérias.

Uma alternativa viável para a utilização de matéria-prima de má qualidade é a aplicação do processo de clarificação junto ao extrato de semente de moringa como floculante, proporcionando maior redução dos micro-organismos presentes e um menor tempo de decantação.

Para os tratamentos dos caldos e as matérias-primas empregadas, avaliando os nutrientes dos mostos produzidos (Tabela 10), não foram observados resultados com diferenças significativas, somente para o cálcio, nos tratamentos dos caldos, decorrente de resíduos do processo de caleagem. Esses valores como discutidos no caldo extraído estão dentro dos recomendáveis, segundo Amorim (1985) e Fermentec (2004) para o manganês, zinco, ferro e cobre, com o teor abaixo do recomendável para os demais nutrientes.

Tabela 10 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Nitrogênio, Potássio, Cálcio, Magnésio Zinco, Ferro, Cobre, Sódio e Mangânes dos mostos.

	N	K	Ca	Mg	Zn (mg.L ⁻¹)	Fe	Cu	Na	Mn
Tratamento do caldo (T)									
Caldo in natura	38,20	50,25	6,83B	9,08	3,50	11,25	1,08	5,91	3,50
Caldo clarificado	28,00	50,95	17,41A	10,58	1,91	3,58	1,25	6,08	2,54
Caldo clarificado + MO	43,02	52,75	15,70A	10,91	2,25	3,87	1,58	5,75	2,50
Teste F	3,27ns	0,17ns	9,03*	3,71ns	1,36ns	0,88ns	0,18ns	0,60ns	2,95ns
DMS	18,38	13,55	8,20	2,19	3,09	20,07	2,57	0,93	1,42
CV	28,50	14,91	34,75	12,18	68,40	181,65	111,29	8,91	28,30
Matéria-prima (M)									
0h	34,80	52,38	12,27	10,16	3,00	8,83	1,61	5,83	3,00
24h	38,01	50,25	14,36	10,22	2,11	3,63	1,00	6,00	2,69
Teste F	0,40ns	0,33ns	1,51ns	0,02ns	1,50ns	0,98ns	1,63ns	0,28ns	3,45ns
DMS	12,39	9,03	4,13	0,91	1,77	12,80	1,16	0,76	0,40
CV	29,52	15,26	26,94	7,75	60,13	178,05	77,65	11,27	12,24
Inter. TxM	0,36ns	0,80ns	7,24*	1,68ns	2,12ns	1,10ns	7,18*	4,87ns	6,20*

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 < p < 0,05$); ns = não significativo; CV = Coeficiente de variação; DMS = Diferença Mínima Significativa; MO = extrato de sementes de moringa.

4.4. Processo fermentativo

Os resultados das avaliações do tratamento do caldo no inóculo, quanto à viabilidade celular, índice de brotamento e viabilidade dos brotos estão apresentados na Figura 2. Os valores não obtiveram diferença significativa, com resultados médios de viabilidade celular de 86%, índice de brotamento de 21% e viabilidade dos brotos de 83%.

Juntamente ao inóculo, foram quantificados os micro-organismos totais, bactérias lácticas e leveduras (Figura 3), estes não apresentaram diferença significativa entre os resultados e ambos nas concentrações de 10^7 UFC.mL⁻¹. Sendo que, estes resultados estão dentre os recomendáveis para iniciar o processo fermentativo de modo adequado, com viabilidade superior a 85% e contaminação inferior a 10^8 UFC.mL⁻¹ (ALCARDE, 2014; AMORIM, 2005).

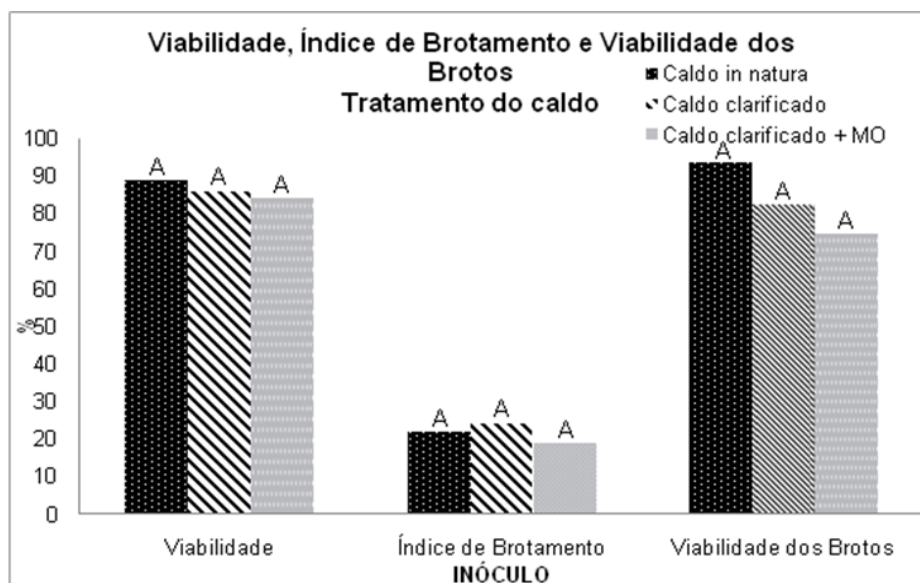


Figura 2 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Viabilidade das células, Índice de brotamento e viabilidade dos brotos no inóculo do tratamento do caldo.

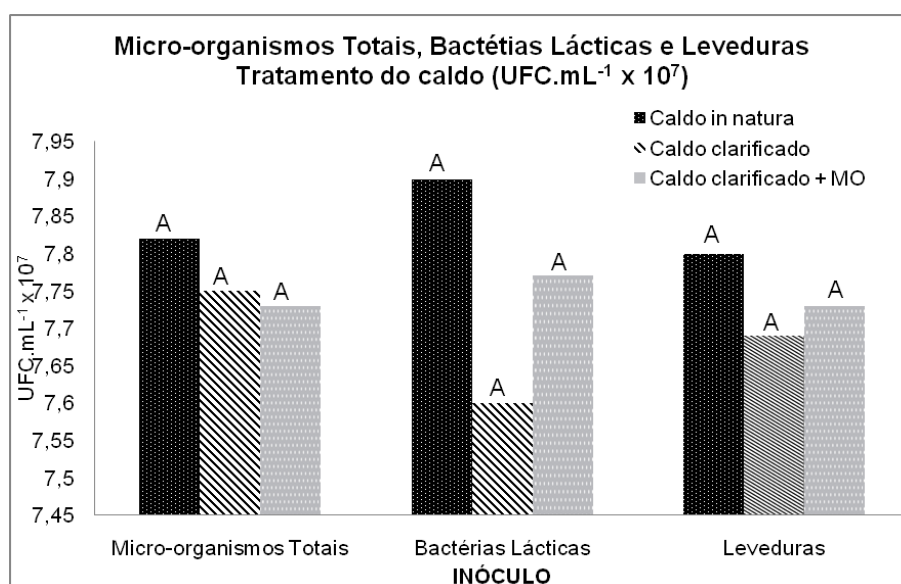


Figura 3 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Micro-organismos totais, Bactérias lácticas e Leveduras no inóculo do tratamento do caldo.

Avaliando a matéria-prima utilizada no inóculo, os resultados da viabilidade celular, índice de brotamento e viabilidade dos brotos estão apresentados na Figura

4. Estes não apresentaram diferença significativa nos valores, não causando diferença de colmos recém processados e colmos armazenados.

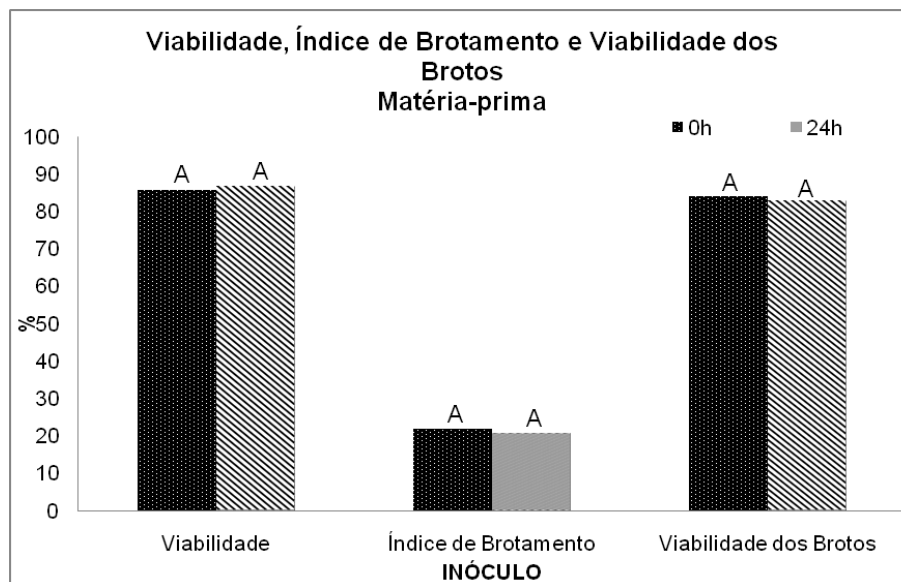


Figura 4 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Viabilidade das células, Índice de brotamento e viabilidade dos brotos no inóculo da qualidade da matéria-prima.

Quando avaliado os micro-organismos totais, bactérias lácticas e leveduras, de acordo com a matéria-prima utilizada (Figura 5), não apresentaram diferença significativa para micro-organismos totais e bactérias lácticas, ambos com resultados médios de $7,76 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹. Para a concentração de leveduras, os colmos armazenados apresentam uma concentração superior significativa de 3,81%. Este aumento é decorrente de leveduras contaminantes provenientes da matéria-prima.

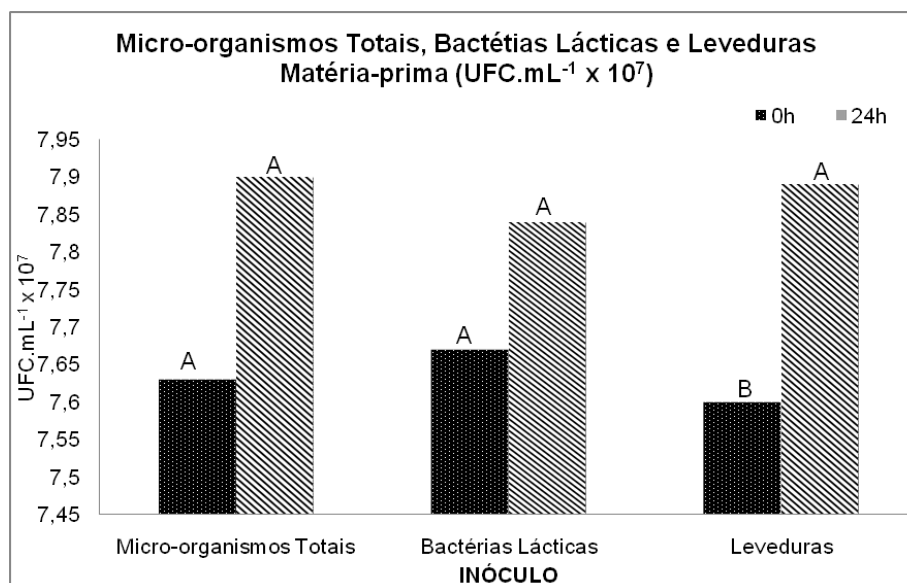


Figura 5 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Micro-organismos totais, Bactérias lácticas e Leveduras no inóculo da qualidade da matéria-prima.

Ao início do processo fermentativo, a levedura inoculada apresentou queda nos teores de viabilidade celular e índice de brotamento em comparação ao inóculo, porém não houve diferença significativa dentre os tratamentos dos caldos. Com viabilidade média de 78%, índice de brotamento de 15% e viabilidade dos brotos de 78% (Figura 6).

Além de não apresentar diferença significativa quanto aos micro-organismos totais (Figura 7). Entretanto, para as bactérias-lácticas e leveduras, os tratamentos utilizados apresentaram resultados inferiores em comparação ao caldo “in natura”. Destacando as bactérias-lácticas com a utilização do extrato de moringa, devido a sua atividade antibacteriana presente na clarificação do caldo, resultando uma fermentação inicial com uma contaminação 4,65% inferior.

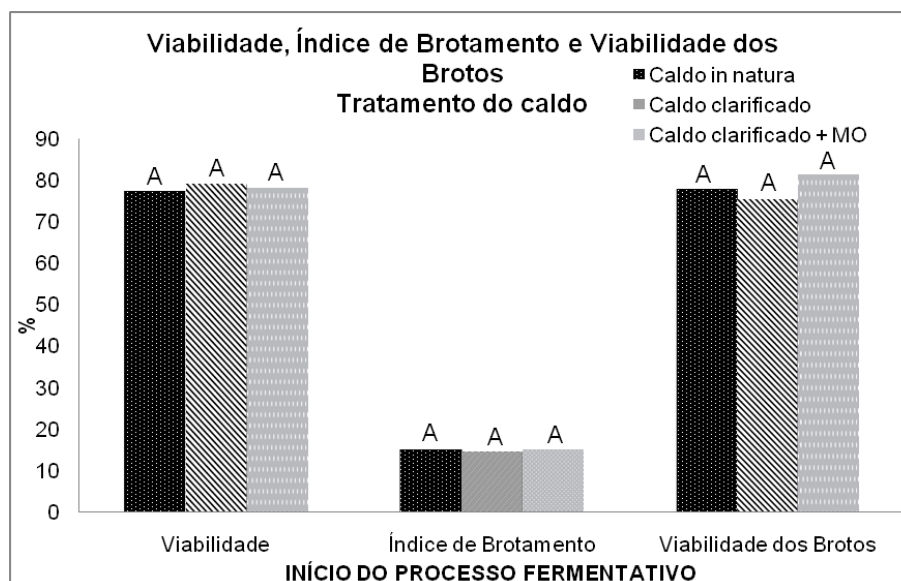


Figura 6 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Viabilidade das células, Índice de brotamento e viabilidade dos brotos no início do processo fermentativo do tratamento do caldo.

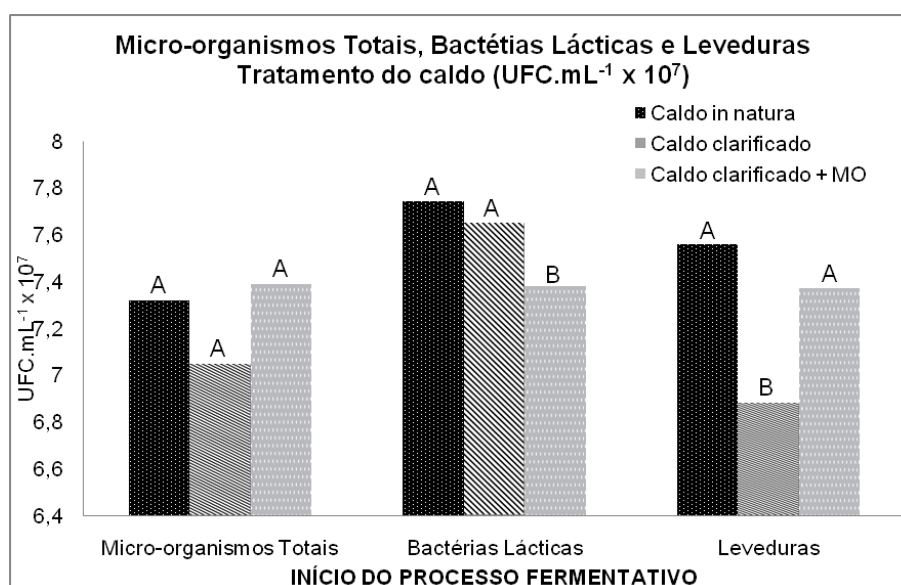


Figura 7 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Micro-organismos totais, Bactérias lácticas e Leveduras no início do processo fermentativo do tratamento do caldo.

Com relação à matéria-prima recém-processada e armazenada por 24h, no início da fermentação, não apresentaram diferenças significativas quanto à viabilidade das células e o índice de brotamento, entretanto com redução

significativa da viabilidade dos brotos (Figura 8), está queda pode ser justificada pela maior presença (5,09%) de micro-organismos totais no processo fermentativo (Figura 9).

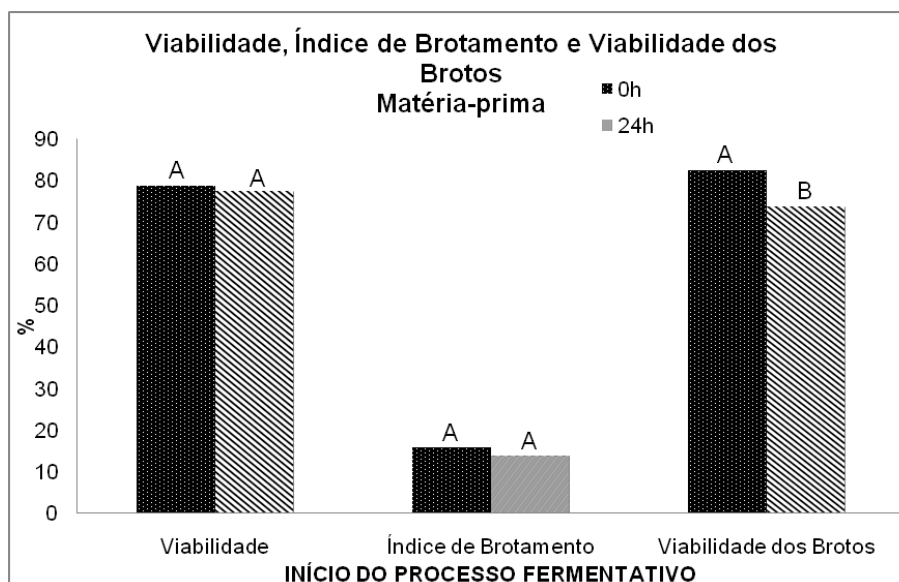


Figura 8 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Viabilidade das células, Índice de brotamento e viabilidade dos brotos no início do processo fermentativo da qualidade da matéria-prima.

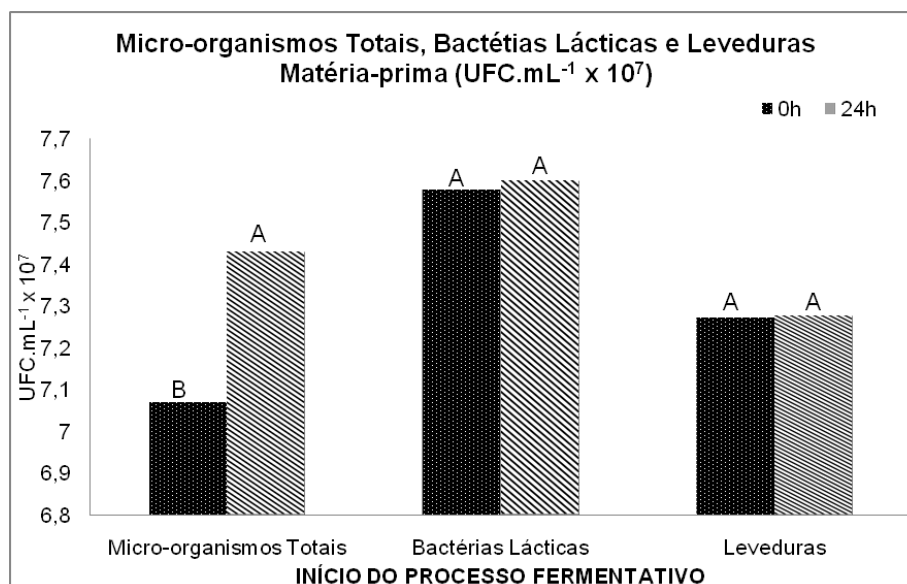


Figura 9 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Micro-organismos totais, Bactérias lácticas e Leveduras no início do processo fermentativo da qualidade da matéria-prima.

Ao final da fermentação, entre as matérias-primas empregadas, os colmos armazenados acarretaram (Figura 10) em resultados significativamente superiores de 4,09% para os micro-organismos totais, 5,13% para bactérias lácticas e 14,83% para leveduras. Este comportamento ocorre devido ao desenvolvimento dos contaminantes na deterioração dos colmos e sua presença ao longo de todo processo produtivo, impactando em uma redução significativa de 17,64% na viabilidade e de 52,40% no índice de brotamento, não ocorrendo diferença significativa na viabilidade dos brotos (Figura 11).

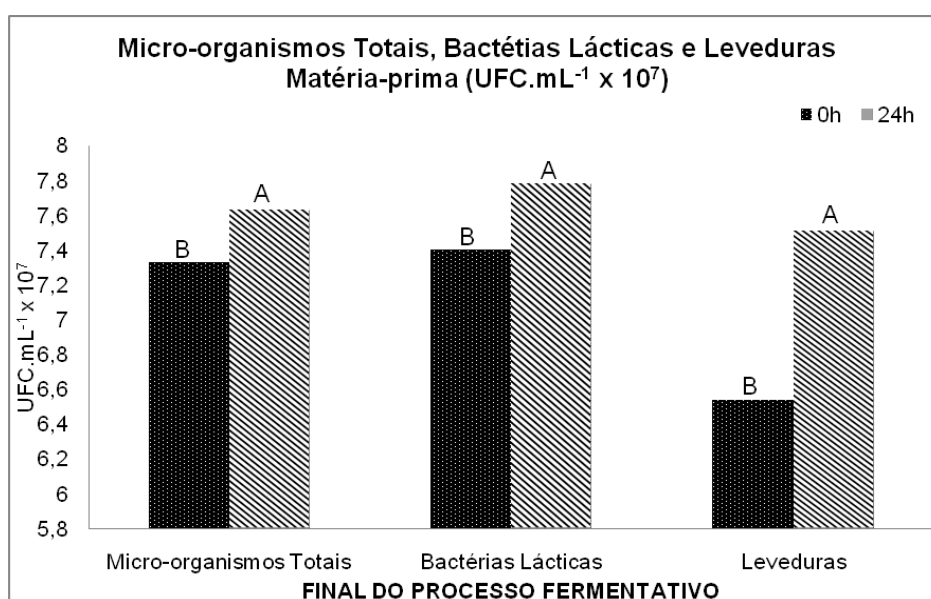


Figura 10 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Micro-organismos totais, Bactérias lácticas e Leveduras no final do processo fermentativo da qualidade da matéria-prima.

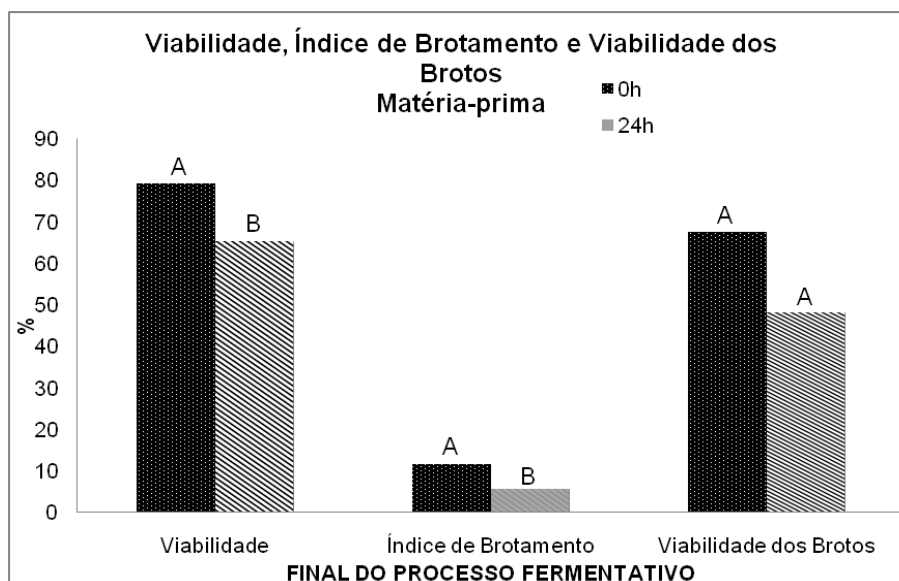


Figura 11 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Viabilidade das células, Índice de brotamento e viabilidade dos brotos no final do processo fermentativo da qualidade da matéria-prima.

Os processos de clarificações empregados (Figura 12) não apresentaram diferenças significativas para as leveduras, porém resultaram em menor contaminação bacteriana (1,82%) no processo fermentativo, além de uma redução significativa de 6,25% na microbiota total no caldo caleado. A atividade antimicrobiana do extrato de sementes de moringa não se manteve até o final da fermentação, com o desenvolvimento das contaminações bacterianas se igualando ao caldo clarificado sem floculante.

A levedura manteve a viabilidade média do início, com 72%, índice de brotamento de 9% e viabilidade dos brotos de 58%, porém com baixo índice de brotamento e viabilidade dos brotos (Figura 13), comportamento este, não esperado, já que ao final da fermentação, em baixas concentrações de açúcares, a levedura utiliza sua rota metabólica aeróbica, destinando a produção de ATP para multiplicação (MADIGAN *et al.*, 2016).

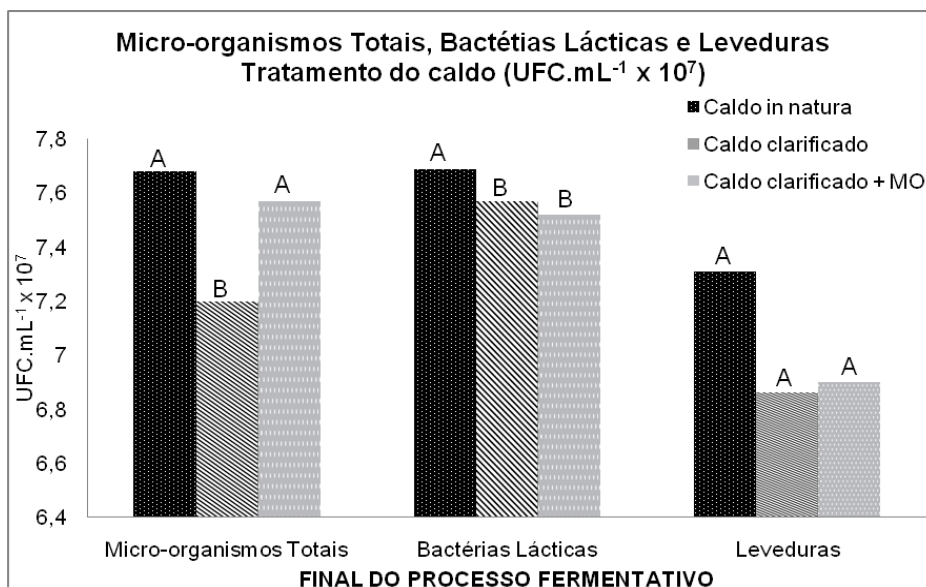


Figura 12 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Micro-organismos totais, Bactérias lácticas e Leveduras no final do processo fermentativo do tratamento do caldo.

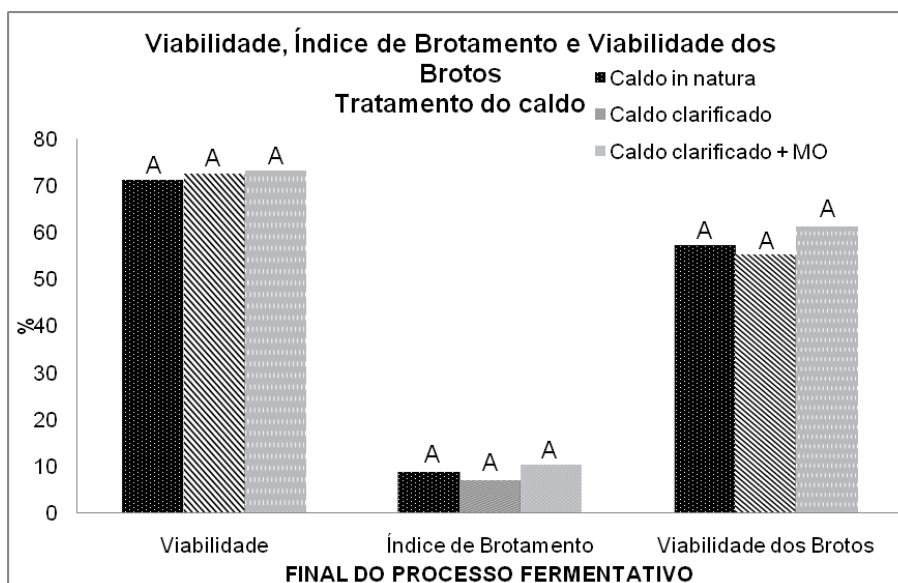


Figura 13 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Viabilidade das células, Índice de brotamento e viabilidade dos brotos no final do processo fermentativo do tratamento do caldo.

Ao longo do processo fermentativo, os resultados para a viabilidade da levedura CA-11 foram diferentes aos obtidos por Montijo *et. al.* (2014), ao qual manteve-se com viabilidade superior a 85% (AMORIM, 2005).

Deve-se levar em consideração, que para os resultados da quantificação dos micro-organismos, os mesmos apresentaram valores recomendáveis, inferiores a 10^8 (ALCARDE, 2014).

4.5. Caracterização tecnológica dos vinhos

Ao final das fermentações, os vinhos delevedurados foram quantificados com relação ao pH, acidez total, ARRT, teor alcoólico e de glicerol, os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Os resultados para pH e acidez total não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos empregados no caldo e o armazenamento da matéria-prima, Oliveira Filho (2015) avaliando o armazenamento em condições semelhantes não observou redução significativa do pH, com valor médio próximo do encontrado, já a acidez total apresentou aumento significativo de 3,19 para $3,30\text{gH}_2\text{SO}_4.\text{L}^{-1}$, resultado próximo ao encontrado no presente estudo.

Avaliando os resultados dos açúcares redutores residuais totais (ARRT), entre as matérias-primas utilizadas não houve diferenças significativas, comportamento oposto ao encontrado por Oliveira Filho (2015), que ao armazenar os colmos por até 96 horas, observou aumento no valor médio encontrado de ARRT. Já para o processo de clarificação, o caldo “in natura” apresentou resultado inferior em comparação aos outros tratamentos utilizados, esse resultado pode ser justificado de acordo com a maior presença de micro-organismos, principalmente por bactérias lácticas, como apresentado na Figura 18.

Para os teores alcoólicos, não houve diferenças significativas para o tratamento do caldo e matéria-prima empregada, resultados estes não esperados, pois o aumento dos micro-organismos contaminantes no processo fermentativo interferem negativamente ao desempenho do inóculo.

Mesmo não apresentando redução significativa, os colmos armazenados acarretaram em uma redução de 4,9% no teor alcoólico, contudo, esse efeito pode ser acumulativo quando realizados consecutivos ciclos fermentativos. A redução nos teores alcoólicos foi superior ao encontrado por Oliveira Filho (2015), com o armazenamento dos colmos por 24 horas, com redução de 2,45% no teor alcoólico.

Dentre os resultados, estes são superiores aos obtidos por Montijo *et. al.* (2014) e Bergamo & Uribe (2013), utilizando a levedura CA-11, onde apresentam teor alcoólico na ordem de 6 a 7%.

Tabela 11 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para pH, Acidez Total, ARRT, Teor Alcoólico e Teor de Glicerol dos vinhos.

	pH	Acidez Total (g.L ⁻¹ H ₂ SO ₄)	ARRT (%)	Teor Alcoólico (%v/v)	Glicerol (%)
Tratamento do caldo (T)					
Caldo in natura	3,62A	3,56A	0,29B	8,01A	0,86A
Caldo clarificado	3,72A	3,32A	0,58A	8,00A	1,00A
Caldo clarificado + MO	3,72A	3,71A	0,53A	7,93A	0,95A
Teste F	2,25ns	0,86ns	21,04**	0,05ns	2,12ns
DMS	0,09	0,75	0,12	0,62	0,17
CV	3,17	25,75	30,93	9,44	22,00
Matéria-prima (M)					
0h	3,70A	3,46A	0,50A	8,18A	0,90B
24h	3,69A	3,60A	0,44A	7,78A	0,98A
Teste F	0,24ns	1,57ns	1,73ns	2,32ns	7,79*
DMS	0,04	0,22	0,09	0,55	0,06
CV	2,21	11,29	37,52	12,33	11,34
Inter. TxM	0,34ns	1,03ns	1,59ns	0,28ns	0,44ns

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 < p < 0,05$); ns = não significativo; CV = Coeficiente de variação; DMS = Diferença Mínima Significativa; MO = extrato de sementes de moringa.

O glicerol é um composto produzido na rota metabólica da via do etanol, suas formações são inversamente proporcionais. Comportamento este apresentado nos resultados das matérias-primas utilizadas, no qual o maior teor alcoólico, consequentemente obteve menor teor de glicerol.

A matéria-prima recém-processada e a menor quantidade de bactérias lácticas e leveduras presente no processo fermentativo, acarretou em menor formação de glicerol, com valor de 0,90%, com aumento de 8,8% neste teor devido à metabolização dos açúcares em compostos indesejáveis para a fermentação alcoólica (AMORIM, 2005).

Para os tratamentos de clarificação, os resultados não apresentaram diferença significativa, teores superiores aos por Montijo *et. al.* (2014) com resultados médios de 0,59%.

Os vinhos delevedurados também foram quantificados quanto ao teor de nutrientes (N, K, Ca, Mg, Zn, Fe, Cu, Na e Mn), apresentados na Tabela 12. De acordo com o tratamento do caldo de cana, estes não apresentaram diferença significativa dentre os resultados. Em comparação aos nutrientes disponíveis no mosto (Tabela 10), houve uma redução no teor de cálcio, magnésio e manganês. Essa redução deve-se a metabolização desses nutrientes pelos micro-organismos ao longo do processo fermentativo.

Cabe resaltar que o cálcio e magnésio constituem os íons mais importantes possibilitando a existência de gradientes iônicos através das membranas celulares, mantendo a pressão osmótica e o pH, além do Mg ser um co-fator de reações metabólicas de importância para a via glicolítica. O manganês atua como ativadores enzimáticos na glicólise, como a transforação de acetaldeído em etanol (AMORIM, 2004).

Tabela 12 – Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para Nitrogênio, Potássio, Cálcio, Magnésio Zinco, Ferro, Cobre, Sódio e Mangânes dos vinhos.

	N	K	Ca	Mg	Zn (mg.L ⁻¹)	Fe	Cu	Na	Mn
Tratamento do caldo (T)									
Caldo in natura	20,02A	54,63A	7,91A	6,94A	4,50A	37,75A	1,77A	15,61A	2,61A
Caldo clarificado	16,43A	51,00A	9,52A	6,50A	2,38A	28,33A	1,61A	13,44A	1,47A
Caldo clarificado + MO	21,00A	56,25A	11,63A	6,58A	3,33A	36,94A	1,72A	15,08A	1,77A
Teste F	1,42ns	0,14ns	2,28ns	0,29ns	0,94ns	0,27ns	0,01ns	0,24ns	2,48ns
DMS	8,72	25,25	4,35	1,53	3,84	35,09	2,59	7,99	1,31
CV	25,71	56,24	54,04	27,64	135,65	122,82	182,79	65,29	81,10
Matéria-prima (M)									
0h	21,38A	47,16B	10,00A	6,48A	2,74A	24,42B	1,53A	16,33A	1,68B
24h	16,91A	60,75A	9,38A	6,87A	4,07A	44,25A	1,87A	13,09B	2,22A
Teste F	0,94ns	4,84*	0,33ns	1,03ns	3,38ns	5,57*	0,63ns	9,47**	4,60*
DMS	11,22	12,74	2,18	0,78	1,49	17,35	0,86	2,17	0,51
CV	50,84	42,03	40,12	21,02	78,11	89,91	90,43	26,29	47,08
Inter. TxM	0,33ns	0,49ns	0,24ns	0,65ns	1,34ns	0,53ns	1,42ns	0,35ns	1,58ns

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 < p < 0,05$); ns = não significativo; CV = Coeficiente de variação; DMS = Diferença Mínima Significativa; MO = extrato de sementes de moringa.

Quando avaliado os nutrientes de acordo com a matéria-prima utilizada, o cálcio, cobre, magnésio e zinco não apresentaram diferenças significativas com o armazenamento ou não dos colmos. Já para a concentração de ferro, potássio e manganês a cana armazenada apresentou um maior índice desses nutrientes residuais no vinho, comportamento este, diferente do sódio, com maior presença no vinho produzido pela matéria-prima não deteriorada.

Resultados estes diferentes aos obtidos por Oliveira (2016), em estudos para a produção de cachaça orgânica utilizando tratamento físico-químico, antimicrobianos e a levedura CA-11, obteve ao final das fermentações vinho com baixos índices de nutrientes, com concentração média de $0,16\text{mg.L}^{-1}$ de ferro, $0,11\text{mg.L}^{-1}$ de cobre, e concentrações inferiores a $0,2\text{mg.L}^{-1}$ para cálcio, magnésio, manganês e zinco. Esse comportamento pode variar de acordo com a matéria-prima empregada e a concentração de nutrientes disposta no meio para a levedura.

4.6. Determinação e caracterização dos destilados

As cachaças também foram determinadas quanto aos componentes em cromatografia gasosa (aldeídos, acroleína, esteres, metanol, 2-butanol, 1-propanol, isobutanol, 1-butanol, isoamilico e furfural) e cromatografia líquida (carbamato de etila). Além de teor alcoólico, acidez volátil, condutividade, turbidez, pH e teor de cobre apresentados na Tabela 13.

De acordo com os resultados para a graduação alcoólica das cachaças, devido ao mecanismo de destilação e a intenção de obter as cachaças com maior teor alcoólico possível, os resultados apresentaram uma pequena variação. Entretanto, com resultados próximos com média de 42,18% V/V, atendendo a legislação, estabelecendo a graduação alcoólica entre 38 a 48% V/V (BRASIL, 2005). Além da pequena variação de resultado, comportamento semelhante foi observado quando avaliado a condutividade elétrica, com resultado médio de $15,59\mu\text{g.L}^{-1}$ e ao pH com resultado médio de 4,5.

Para a avaliação da turbidez da cachaça, de acordo com os tratamentos empregados no caldo de cana, ha um pequeno aumento da turbidez em ambas as matérias-primas, significando um maior aumento de compostos que dispersão a luz.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 13, a soma do coeficiente de congêneres (acidez volátil, aldeídos totais, ésteres totais, furfural + hidroximetil, álcoois superiores) para as cachaças produzidas de colmos não armazenados para o caldo “in natura” foi de $212,65\text{mg}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ de álcool anidro. Para o caldo clarificado a soma apresentou resultados 6,62% inferior e para o caldo clarificado utilizando o extrato de sementes de moringa foi 9,59% inferior.

Para as cachaças produzidas com os colmos armazenados por 24 horas, a soma para o caldo “in natura” foi de $221,57\text{mg}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ de álcool anidro. Para o caldo clarificado os congêneres apresentaram redução de 3,92% e para o caldo clarificado utilizando o extrato de sementes de moringa com redução de 10,39%. As cachaças produzidas apresentaram resultados dentro ou próximas do recomendável da soma dos congêneres entre 200 a $650\text{mg}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ de álcool anidro.

Resultados estes próximos aos obtidos por Garcia (2016), que observou redução de 11,34% do coeficiente de congêneres utilizando a clarificação do caldo para a produção de cachaça orgânica. Este comportamento em ambas as matérias-primas, com a redução na soma dos congêneres produzidos deve-se à menor formação de alcoóis superiores.

A soma dos alcoóis superiores, e os compostos pertencentes à soma, isoamílico e isobutanol, apresentaram comportamento semelhante à redução da soma dos congêneres. Para as cachaças produzidas sem o armazenamento dos colmos, em comparação a bebida produzida com o caldo “in natura”, utilizando à clarificação do caldo, para a soma dos alcoóis foi de 19,17%, com o emprego do extrato de sementes de moringa, a redução foi de 27,03%. Com os colmos armazenados por 24 horas, a redução utilizando o processo de caleagem foi de 12,24% e a clarificação com o floculante natural foi de 17,34%.

Os resultados mostraram-se satisfatórios, como uma solução para a produção de cachaça de qualidade em matérias-primas com alto índice de alcoóis superiores

Tabela 13 - Quantificação dos componentes e caracterização das cachaças.

Componentes Analisados	Legislação		0h		24h	
	Min.	Máx.	Caldo "in natura"	Caldo clarificado + MO	Caldo "in natura"	Caldo clarificado
Compostos secundários						
Acidez volátil ¹	150	53,03	61,49	67,3	60,51	66,54
Aldeídos totais ¹	30	6,12	5,73	5,31	4,04	3,94
Ésteres totais ¹	200	5,06	4,55	5,44	3,91	3,28
Furfural + Hidroximetil ¹	5	9,86	14,79	13,08	14,32	17,34
Álcoois superiores ¹	360	138,58	112,01	101,12	138,79	121,79
Coefficiente de congêneres¹	200	650	212,65	198,57	221,57	212,89
Contaminantes orgânicos						
Metanol ¹	20	0,00	0,00	0,00	1,23	0,00
Álcool sec. Butílico ¹	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
n-butanol ¹	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Carbamato de Etila ²	210	<6,23	<6,23	<6,23	<6,23	<6,23
Acroleína ¹	5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Gradação alcoólica ³	38	48	42,43	41,90	42,64	42,38
Condutividade elétrica ⁴			16,18	16,05	15,71	15,84
Turbidez ⁵			0,15	0,22	0,10	0,18
pH			4,62	4,53	4,62	4,50
Álcoois superiores						
n-propanol ¹			13,30	14,30	13,13	13,71
Isobutanol ¹			41,54	28,72	39,66	33,38
Isoamílicos ¹			83,74	58,10	86,00	74,70
Cobre	5		4,80	3,80	3,80	4,70

¹mg.100mL⁻¹ de álcool anidro; ²µg.L⁻¹; ³% V/V; ⁴µs à 25°C; ⁵NTU; ⁶mg.L⁻¹

Os resultados mostraram-se satisfatórios, como uma solução para a produção de cachaça de qualidade em matérias-primas com alto índice de alcoóis superiores. Este fato ocorre devido à remoção de aminoácidos através do processo de clarificação, sendo que estes são os precursores para a formação desses compostos durante o processo fermentativo, de odor característico de bebidas destiladas, o isoamilico apresenta aroma de flores característico do “buquê” das bebidas (ALCARDE, 2014).

Outros fatores que influenciam a formação de alcoóis superiores são elevadas temperaturas, baixo pH do mosto, leveduras de baixa atividade e canas armazenadas (CARDOSO, 2013). Essa porcentagem de redução é superior ao apresentado por Garcia (2016), utilizando levedura CA-11 e o processo de clarificação, a soma dos alcoóis superiores apresentou resultado 5,59% inferior.

Dentre os compostos, os ésteres apresentaram resultados semelhantes nos tratamentos utilizados, entretanto com um baixo teor médio de $4,38\text{mg.100mL}^{-1}$ de álcool anidro, resultado este prejudicial a bebida, já que o grupo dos ésteres compõem a maior classe de compostos aromáticos, que dão a característica de frutado a bebida.

O furfural, composto secundário que apresenta odor peculiar, podendo formar cor mediante a exposição ao ar e luz (AZEVEDO *et al.*, 2007), apresentou índices acima do recomendável em ambos tratamentos empregados. Sua produção poder ser justificada pelo resíduo de pentoses e hexoses da fermentação durante a destilação (Tabela 11), ocorrendo à formação de furfural (ALCARDE, 2014).

Dentre os demais compostos secundários, estes não apresentaram alguma variabilidade nos resultados de acordo com os tratamentos empregados, com resultado médio da acidez volátil de $61,88\text{mg.100mL}^{-1}$ de álcool anidro e para os aldeídos totais com resultado médio de $4,99\text{mg.100mL}^{-1}$ de álcool anidro, resultados estes dentro do ideal segundo a Instruções Normativas nº 13/2005.

Para garantir maior qualidade e saúde para os consumidores, também previsto nas legislações, a presença de contaminantes (orgânicos e inorgânicos) são estabelecidos em parâmetros máximos. Avaliando os contaminantes orgânicos nas cachaças (Tabela 13), não houve a produção de álcool sec. butílico, n-butanol e

acroleína. A presença de metanol só foi encontrada na cachaça produzida com colmos armazenados por 24 horas com o caldo “in natura”.

Para a produção de carbamato de etila, em todas as cachaças avaliadas não foi possível quantificar, quanto a esse teor devido a análise permitir resultados superiores a $6,23\mu\text{g.L}^{-1}$, resultados estes satisfatórios, já que a produção de carbamato de etila vem sendo muito estudada devido ao seu potencial genotóxico e carcinogênico, sendo que metade das aguardentes e cachaças produzidas no Brasil apresentam concentrações acima do limite de $210\mu\text{g.L}^{-1}$ (RIACHI *et al*, 2014; BRASIL, 2014). Em estudos Masson *et al*. (2014) apresenta uma avaliação no estado de Minas Gerais, uma variabilidade no teor de 23 a $930\mu\text{g.L}^{-1}$.

Quanto aos contaminantes inorgânicos, foi avaliado o teor de cobre nas cachaças produzidas (Tabela 13), de acordo com a legislação. Todas se mantiveram dentro do recomendável e em níveis próximos, aparentemente não influenciado pelos tratamentos utilizados, apresentando uma média de $4,25\text{mg.L}^{-1}$.

Para os demais nutrientes, mesmo não fazendo parte da Instrução Normativa, é de importância a avaliação para analisar os reflexos do modo de produção e a interferência causada pelos tratamentos propostos. Sendo assim, os nutrientes nas cachaças (N, K, Ca, Mg, Zn, Fe, Na e Mn) estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Resultados da análise do teor de Nitrogênio, Potássio, Cálcio, Magnésio Zinco, Ferro, Sódio e Mangânes das cachaças.

	N	K	Ca	Mg (mg.L^{-1})	Zn	Fe	Na	Mn
0h								
Caldo “in natura”	0,00	0,00	0,00	0,00	57,00	0,00	3,50	0,00
Caldo clarificado	0,00	0,00	1,00	0,00	86,50	0,00	4,50	0,00
Caldo clarificado + MO	0,00	0,00	1,50	0,00	109,00	0,00	5,50	0,00
24h								
Caldo “in natura”	0,00	0,00	0,00	0,00	89,50	0,00	3,50	0,00
Caldo clarificado	0,00	0,00	0,00	0,00	82,00	0,00	4,00	0,00
Caldo clarificado + MO	0,00	0,00	0,00	0,00	76,50	0,00	3,00	0,00

MO = extrato de sementes de moringa.

Avaliando o teor de ferro, potássio, magnésio, manganês e nitrogênio não foram encontrados nas cachaças. Na quantificação de cálcio foi encontrado um pequeno teor de 1 e 1,5mg.L⁻¹ nas cachaças produzidas com colmos não armazenados, para o caldo clarificado e caldo clarificado + MO. Para os demais nutrientes, foram encontrados dosagens médias de 4,00mg.L⁻¹ para o sódio e 83,42mg.L⁻¹ para zinco, de acordo com os resultados, sem interferência dos colmos e ou tratamento do caldo.

Resultados estes diferentes aos obtidos por Oliveira (2016), ao produzir cachaça de forma orgânica, apresentou teores inferiores a 0,78mg.L⁻¹ quando quantificado o teor de zinco e resultados inferiores a 0,05mg.L⁻¹ para o potássio, manganês e ferro. Essa diferença é causada pelas condições do processo, causando concentrações diferentes de nutrientes dês da matéria-prima utilizada.

5. CONCLUSÕES

Considerando os resultados apresentados e discutidos, pode-se concluir que:

- a) O extrato de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck apresenta atividade antimicrobiana sobre a microbiota total da matéria-prima;
- b) O processamento de matéria-prima armazenada acarreta em um processo fermentativo com maiores contaminantes e produção de compostos indesejáveis;
- c) O extrato de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck possui atividade antimicrobiana durante o processo fermentativo, com redução na concentração de bactérias lácticas;
- d) O processo de clarificação e a utilização do extrato de sementes de moringa resultam em menor formação de alcoóis superiores na cachaça;

6. REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, L. M. **Processo de Fabricação de Açúcar**. 3º ed. UFPE: Recife, 2011, 273 p.
- ALCARDE, A. R. **Cachaça**: Ciência, tecnologia e arte. Editora Edgard Blucher Ltda, São Paulo, 2014. 96 p.
- AMORIM, H. V. **Fermentação alcoólica**: ciência & tecnologia. Fermentec: Piracicaba, 2005. 448 p.
- AMORIM, V.H. Nutrição mineral da levedura, aspectos teóricos e práticos. In: SEMANA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA “JAIME ROCHA DE ALMEIDA”, 4. Piracicaba. 1985. Anais. Piracicaba: ESALQ, 1985. p.144-148.
- ANJOS, J. P.; CARDOSO, M. G.; SACZK, A. A.; ZACARONI, L. M.; SANTIAGO, W. D.; DÓREA, H. S.; MACHADO, A. M. R. Identificação do carbamato de etila durante o armazenamento da cachaça em tonel de carvalho (*Quercus* sp) e recipiente de vidro. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 874-878, 2011
- AOAC. **Association of Oficial Analytical Chemists - Official methods of analysis**. 18. ed. AOAC: Gaithersburg, 1997.
- AZEVEDO, L. C; REIS, M. M.; SILVA, L. A. da; ANDRADE, J. de. Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. **Química nova**, v. 30, nº 8, p. 1968-1975, 2007.
- BARBOSA, E. A. **Caracterização molecular e bioquímica de linhagens de *saccharomyces cerevisiae* da região de salinas para fins de identificação geográfica**. 2013. 143 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Ouro Preto, 2013.
- BATHIA, S.; OTHMAN, Z.; AHMAD, A.L. Pretreatment of palm oil Mill effluent (POME) using *Moringa oleífera* seeds as natural coagulant. **Journal of Hazardous Materials**, v.145, p.120-126. 2007.
- BERGAMO, A. R, URIBE, R. A. M. **Desenvolvimento e otimização de produção de etanol por processo fermentativo com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* em substrato de melaço de cana-de-açúcar**. In: VII WORKSHOP AGROENERGIA, 2013, Ribeirão Preto.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº. 13, de 29 de junho de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça. **Diário Oficial da União** de 30/06/2005, Seção 1, p. 3.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa nº 28, de 8 de agosto de 2014. **Diário Oficial da União** de 11/08/2014, Seção 1.

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

CARDOSO, Maria das Graças. Produção de aguardente de cana. 3º Ed. Lavras: Editora UFLA, 2013. 340 p.

COPLANA – Características das variedades CTC. Disponível em: http://www.coplana.com/gxpfiles/ws001/design/Download/VariedadesCana/Variedad_e_CTC_115.pdf. Acesso em: 04 de janeiro de 2017.

COSTA, G. H. G.; MASSON, I. S.; FREITA, L. A.; ROVIERO, J. P.; MUTTON, M. J. R. Reflexos da clarificação do caldo de cana com moringa sobre compostos inorgânicos do açúcar VHP. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.19, n.2, p.154–159, 2015.

COSTA, G. H. G., **Emprego do extrato de moringa (*Moringa oleífera* Lamarck) na clarificação do caldo de cana para produção de açúcar e etanol**. 2015. 128 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP Jaboticabal, 2015.

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

COSTA, G. H. G.; MASSON, I. S.; FREITA, L. A.; ROVIERO, J. P.; MUTTON, M. J. R. Use of *Moringa oleífera* Lamarck leaf extract as sugarcane juice clarifier: effects on clarified juice and sugar. **Food Science and Technology**, v.34, n.1, 2014.

CTC - Centro de Tecnologia Canavieira. **Manual de métodos de análises para açúcar**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Canavieira, 2005.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, G. A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, p. 882, 2008.

EGGLESTON, G.; MONGE, A. PEPPERMAN, A. Preheating and incubation of cane juice to liming: a comparison of intermediate and cold lime clarification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 484-490, 2002.

FERMENTEC – **Métodos analíticos para o controle da produção de açúcar e álcool**. 3º ed. Piracicaba – SP, 2003.

FERMENTEC. Centro de pesquisas e consultoria para usinas e destilarias. Ácido aconítico é o principal ácido da cana-de-açúcar. **Fermentec News**, 17 de jul. de 2012. Disponível em: <http://fermentecnews.com.br/2012/07/17/acido-aconitico/>. Acesso em: 09 de outubro de 2016.

FERMENTEC, 25, 2004, São Pedro. Resumos. Piracicaba: Fermentec, p. 8-9, 2004.

FILHO, J.H.O. Atividade antimicrobiana de própolis sobre contaminantes da fermentação alcoólica destinada a produção de cachaça. 2010. Tese (Mestrado Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp. Jaboticabal.

FREIRE, J. E., VASCONCELOS, I. M.; MORENO, F. B.; BATISTA, A. B.; LOBO, M. D.; PEREIRA, M. L.; , LIMA, J. P.; ALMEIDA, R. V.; SOUSA, A. J.; MONTEIROMOREIRA, A. C.; OLIVEIRA, J. T.; GRANGEIRO, T. B. Mo-CBP3, an antifungal chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds, is a member of the 2S albumin family. **PLoS One**, v.10, n.3, 2015.

GALLÃO, M. I.; DAMASCENO, L. F.; BRITO, E. S. de. Avaliação química e estrutural da semente de moringa. **Ciência Agronômica**, Fortaleza, n. 1, pg. 106 – 109, 2006. Disponível em: <http://www.ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/view/224/219>. Acesso em: 13 de outubro de 2016.

GARCIA, G. Tratamento de caldo e tipos de fermentos sobre os componentes secundários e qualidade da cachaça de alambique. 2016. Dissertação (Mestrado Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp. Jaboticabal.

GHEBREMICHAEL, K. A.; GUNARATNA, K. R.; HENRIKSSON, H.; BRUMER, H.; DALHAMMAR, G.; A simple purification and activity assay of the coagulant protei from *Moringa oleífera* seed. **Water Research**, v. 39, p 2338 – 2344, 2005.

HONIG, P. Princípios de Tecnologia Azucareira, Editora Continental, Volume I, 1969.

IBRAC – Instituto Brasileiro da Cachaça. Informações a imprensa. Disponível em: http://ibrac.net/images/PDF/Informacoes_Imprensa_IBRAC_Cachaca_2015.pdf Acessado em: 09 de maio de 2016.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas**. 4. ed. São Paulo, 2005. v. 1, p. 407-441.

INMETRO. Portaria nº 126, de 2005. Aprova o Regulamento de avaliação da conformidade da cachaça. DOU, Brasília. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Disponível em: www.inmetro.gov.br. Acesso em 04 de março de 2015.

JANZANTTI, N. S.; GARCIA, C. C. T. Influência da expectativa do consumidor de cachaça orgânica. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 3, p. 1069-1082, 2011.

KRISHNAKUMAR, T., THAMILSELVI, C., DEVADAS, C. T. Effect of delayed extraction and storage on quality of sugarcane juice. **African Journal of Agricultural Research**, v.8, p. 930-935, 2013.

LACHENMEIER, D. W.; LIMA, M. C. P.; NOBREGA, I. C. C. PEREIRA, J. A. P.; KERR-CORRÊA, F.; KANTERES, F. e REHM, J. Cancer risk assessment of ethyl carbamate in alcoholic beverages from Brazil with special consideration to the spirits cachaça and tiquira. **BMC Cancer**, London, v.10, p. 1-15, 2010.

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

LEE, S. S; ROBINSON, F. M; WONG, H.Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, n.11, 1981.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIN, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U.A. **Biotecnologia**. São Paulo: E. Blucher, 2001. v. 3, cap. 1, p. 1-43.

LNF Latino Americana. **Manual de uso da LNF CA-11**. Bento Gonçalves – RS: LNF, 2011.

MACRI, R. C. V; COSTA, G. H. G; MONTIJO, N. A. ; FERREIRA, A. S.; MUTTON, M. J. R. Moringa extracts used in sugarcane juice treatment and effects on ethanolic fermentation, **African Journal of Biotechnology**, v.13, p. 4121-4130, 2014.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de brock**. Editora: Artmed, Porto Alegre, 14^o Edição, p. 1032, 2016.

MAN, J. C; ROGOSA, M; SHARP, M. E. A médium for the cultivation of *Lactobacillus*, **Journal applied bacteriology**, v. 23, p. 130-135, 1960.

MASSON, J.; CARDOSO, M. das G.; ZACARONI, L. M.; ANJOS, J. P. dos; SANTIAGO, W. G.; MACHADO, A. M. de R.; SACZK, A. A.; NELSON, D. L. GC-MS analysis of ethyl carbamate in distilled sugar cana spirits from the northern and southern regions of Minas Gerais. **Institute of Brewing & Distilling**, v. 120, p. 516-520, 2014.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba: **Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato**, 1997. Cap.6, p.231-307: Metodologia para análise de nutrientes em material vegetal.

MARQUES, M. O.; MUTTON, M. A.; NOGUEIRA, T. A. R.; JÚNIOR, L. C. T.; NOGUEIRA, G. de A.; BERNARDI, J. H. **Tecnologias na agroindústria canavieira**, Jaboticabal – SP, Multipress Ltda., 166 p, 2008.

MENDONÇA, J. G. P., CARDOSO, M. das G.; SANTIAGO, W. D.; RODRIGUES, L. M. A.; NELSON, D. L.; BRANDÃO, R. M.; SILVA, B. L. da. Determination of ethyl carbamate in cachaças produced by selected yeast and spontaneous fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, vol. 122, p. 63-68, 2016.

MONTIJO, N. A.; SILVA, A. F.; COSTA, G. H. G.; FERREIRA, O. E.; MUTTON, M. J. R. Yeast CA-11 fermentation in musts trates with brown and green própolis. **African Journal of Microbiology Research**, vol. 8, n. 39, pág. 3515 – 3522, 2014.

MUTTON, M. J. R. & MUTTON, M. A. **Aguardente de cana - produção e qualidade**. Jaboticabal: FUNEP. 1992.

NELSON, D. L., COX, M. M., **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5 ed. São Paulo: Artmed, 2011.

OLIVEIRA, A. M. L; **O processo de produção da cachaça artesanal e sua importância comercial**. 2010. 55 f. (Trabalho de conclusão de curso) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

OLIVEIRA, M. de C., **Avaliação da qualidade físico-química e sensorial da cachaça orgânica envelhecida**. 2016. 81 f. Tese (Doutorado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP Jaboticabal, 2016.

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.

OLIVEIRA FILHO, J. H. de, **Qualidade pós-colheita de colmos de cana armazenados e seus reflexos na produção de cachaça**. 2015. 101 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ Piracicaba, 2015.

OKUDA, T.; BAES, A. U.; NISHIJIMA, W.; OKADA, M. Coagulation mechanism of salt solution extracted active component in Moringa oleifera seeds. **Water Research**, v.35, n.3, 2001.

REIN, P. **Cane Sugar Engineering**. 2ed. Bartens: Berlin, 2012.

RIPOLI T. C. C.; RIPOLI M. L. C. **Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente**. 2ª edição. Barros & Marques Editoração eletrônica. Piracicaba, 333 p., 2009.

SCHWARZ, D. **Water Clarification using Moringa oleifera**. Technical Information. 2000. Disponível em:

<http://www.gateinternational.org/documents/techbriefs/webdocs/pdfs/w1e_2000.pdf>. Acesso em: 01/11/2013.

SEBRAE (Serviço Brasileiro de Apoio as Micro e Pequenas Empresas). Sebrae Nacional. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/saiba-mais-sobre-tendencia-do-mercado-de-cachaca,39aa6a2bd9ded410VgnVCM1000003b74010aRCRD>>. Acessado em: 07 de maio de 2016.

SILVA, R. J. N.; GUIMARÃES, E. R.; GARCIA, J. F.; BOTELHO, P. S. M.; FERRO, M. I. T.; MUTTON, M. A., MUTTON, M. J. R. Infestation of froghopper nymphs change de amounts of total phenolics in sugarcane. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 6., p. 543-546, 2005.

SOLOMON, S. Post-harvest deterioration of sugarcane. **Sugar tech**, India, v. 11, nº 2, p. 109-123, 2009.

SOUZA, L. M. de; ALCARDE, A. R.; LIMA, F. V. de; BORTOLETTO, A. M. **Produção de cachaça de qualidade**. ESALQ/USP: Piracicaba, SP, 72 p., 2013.

TEIXEIRA, V. Extratos de semente de *Moringa* (*Moringa Oleifera* Lam) como flocculante na clarificação do caldo de cana-de-açúcar. 2013 45 f. Trabalho de Graduação (Tecnologia em Biocombustíveis) - Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal "Nilo de Stéfani", Jaboticabal, 2013.

ULLAH, A., MARIUTTI, R. B., MASOOD, R., CARUSO, I. P., COSTA, G. H. G., FREITA, C. M. de, SANTOS, C. R., ZANPHORLIN, L. M., MUTTON, M. J. R., MURAKAMI, M. T., ARNI, R. K. Crystal structure of mature 2S albumin from *Moringa oleifera* seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 468, p.365-371, 2015.

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

VALSECHI, O. Aguardente de cana-de-açúcar. Piracicaba: ESALQ/USP, 1960.

VILLANUEVA, N. D. M.; PETENATE, A. J.; SILVA, M. A. A. P. P. Performance of the hybrid hedonic scale as compared to the traditional hedonic, self-adjusting and ranking scales. **Food Quality and Preference**, v. 16, p. 691-703, 2005.

ZACARONI, L. M.; CARDOSO, M. das G.; SACZK, A. A.; SANTIAGO, W. D.; ANJOS, J. P. dos; MASSON, J.; DUARTE, F. C.; NELSON, D. L. Caracterização e quantificação de contaminantes em aguardentes de cana. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, nº 2, p. 320-324, 2011.