

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

DANOS CAUSADOS POR *Mahanarva fimbriolata*
(STÅL, 1854) NA QUALIDADE DA CANA E
PROCESSO FERMENTATIVO

Débora Branquinho Garcia
Engenheira Agrônoma

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2009

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

DANOS CAUSADOS POR *Mahanarva fimbriolata*
(STÅL, 1854) NA QUALIDADE DA CANA E
PROCESSO FERMENTATIVO

Débora Branquinho Garcia

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton.

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2009

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Débora Branquinho Garcia – nasceu aos 30 de abril de 1982, na cidade de Franca, estado de São Paulo. Em março de 2001 ingressou no curso de Agronomia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, campus de Jaboticabal. Durante a faculdade foi bolsista do programa PIBIC/CNPq. De agosto a novembro de 2005 realizou estágio curricular na empresa Monsanto situada em Sorriso - MT na área de melhoramento genético da soja. Em janeiro de 2006 recebeu o título de Engenheira Agrônoma. De agosto de 2006 a fevereiro de 2007 realizou estágio no laboratório de tecnologia do açúcar do álcool do departamento de tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP. Em março de 2007 ingressou no curso de mestrado do Programa de Pós-graduação em Microbiologia (Microbiologia Agropecuária) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP.

“Os ricos não são os que têm posses, mas os que alargam as fronteiras da sua emoção e têm autocontrole. Uma emoção saudável é estável, motivada, protegida, alegre, tranqüila e é capaz de superar os inevitáveis períodos de ansiedade. Seu maior desafio é cuidar e liderar seu próprio ser. O território dos pensamentos e da sua emoção é seu tesouro. Se quiser viver dias felizes, cuide dele mais do que de seus bens.”

Augusto Cury

A minha família, meu espelho e minha alegria de viver - amados pais Marcos e Ana, queridas irmãs Adriana e Gabriela e amado namorado Ruy, obrigada por todo o amor, confiança e dedicação. Minha eterna gratidão por tudo que fazem e fizeram por mim, agradeço a Deus todos os dias por estar nessa família.

Amo muito vocês!

DEDICO

Aos meus queridos avôs Diogo e Aldina, Antônio e Benvinda pelo exemplo de vida, pela luta, paciência, por serem pessoas tão maravilhosas que mesmo distantes ou ausentes sempre estiveram em meus pensamentos e sei que torceram por mim!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar presente em minha vida, principalmente em todos os momentos de alegrias, dificuldades, dúvidas e aflições.

Aos grandes amigos e mestres, pessoas maravilhosas Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton e Prof. Dr. Miguel Angelo Mutton que me proporcionaram grandes ensinamentos, além de orientação, ombro amigo e ajuda em tudo que precisei.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. José Paulo Stupiello e Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes, pelos exemplos de profissionalismo, pelas sugestões e correções deste trabalho.

Aos professores e amigos que contribuíram para minha formação em especial Prof. Dr. Jairo Osvaldo Cazetta, Prof. Dr. Rinaldo Cesar de Paula, Profa. Dra. Teresa Cristina Tarle Pissarra e Prof. Dr. Domingos Fornasieri Filho, Profa. Dra. Mara Cristina Pessoa da Cruz.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal pela oportunidade de crescimento como ser humano e profissional.

Aos queridos e amados amigos, companheiros e irmãos: Cláudia, Marcelo, Ana Carolina, Marcela, Luciana, Aline, Carol, Juliana, Aritana, Dani (Jatinha), Denise, Vanessa, Ana Carolina (Fiona), Dani, Lucas, Dinalva e Melina.

Aos queridos amigos do laboratório; Gisele, Leo, Mari, Cidinha, Aline, Kelly, Lidy, José, Rodrigo, Dani, Juliana, José Humberto, Flávio, Tati, Ruan, Rossato, Vitor, Fabio, Neto, Du Tiraboschi, Cíntia, Sartori, Leandro e Gustavo.

A todos os funcionários da Universidade em especial Wilson (UAD), Sérgio, Mauro, Renata, Bete, Fátima (Lab Pizauro), José Carlos, Karina, Valéria e amigos como Isildinha e Jonas.

À toda família “Branquinhos” e “Garcias” por todo o apoio e carinho.

A TODOS QUE DIRETA OU INDIRETAMENTE CONTRIBUÍRAM PARA ESSA CONQUISTA, MUITO OBRIGADA!!!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	ii
SUMMARY	iii
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Cana-de-açúcar e cigarrinha-das-raízes (<i>Mahanarva fimbriolata</i>)	3
2.2 Qualidade da matéria-prima para o processo fermentativo	6
2.3 Processo fermentativo e seus interferentes	7
2.4 Nutrientes na fermentação	10
2.5 Glicerol e trealose – compostos secundários da fermentação	12
III. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Instalação e condução do experimento	14
3.2 Análises tecnológicas do caldo e cana	16
3.3 Condução do processo fermentativo	16
3.4 Análises microbiológicas	18
3.5 Determinação de compostos secundários – glicerol e trealose	19
3.6 Determinações de macro e micronutrientes	20
3.7 Análise estatística	21
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Avaliações tecnológicas do caldo - parâmetros convencionais e não convencionais	22
4.2 Avaliações microbiológicas do mosto e condução da fermentação	32
4.3 Análises do vinho	48
4.4 Compostos secundários – trealose e glicerol	55
4.5 Composição do destilado final	59
4.6 Avaliação dos nutrientes	66
V. CONCLUSÕES	71
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
VII. APÊNDICE	82

DANOS CAUSADOS POR *Mahanarva fimbriolata* (STÅL, 1854) NA QUALIDADE DA CANA E PROCESSO FERMENTATIVO

RESUMO – A qualidade da matéria-prima é o fator que define o potencial de produção da indústria. A colheita de cana crua proporcionou um ambiente favorável ao aumento da infestação da *Mahanarva fimbriolata*, praga esta, que suga a planta afetando seu desenvolvimento. O trabalho objetivou avaliar os danos promovidos pela *M. fimbriolata* na qualidade da cana e processo fermentativo. Utilizou-se a variedade SP80-1842, 5º corte. Os tratamentos foram compostos por 4 níveis de danos (0, 15, 30 e 60%) e duas épocas de avaliações (maio/junho e outubro) para as análises tecnológicas e 4 níveis de danos, 4 ciclos fermentativos (1º, 4º, 7º e 10º) e duas épocas de avaliações para as análises microbiológicas com três repetições. Foram determinados os parâmetros tecnológicos e teor de compostos fenólicos totais no caldo. Avaliou-se a fibra presente na cana. No processo fermentativo foram realizadas análises de leveduras e bactérias, e os vinhos foram submetidos a composição do destilado. Determinou-se o glicerol e a trealose e os macro e micronutrientes presentes. Os tratamentos com 60% dos colmos danificados apresentaram menor média de Brix, Pol, Pureza e ART do caldo e aumento do AR caldo e dos teores de compostos fenólicos totais. A viabilidade celular e de brotos foram reduzidas com o aumento dos danos provocados pela *M. fimbriolata*, o processo fermentativo apresentou maiores quantidades de contaminantes. Com os danos a quantidade de ARRT dos vinhos foi maior e houve redução do teor alcoólico. O teor de glicerol e a quantidade de trealose não apresentaram resultados significativos com relação ao ataque da praga, mas quando se observou a reutilização do fermento a levedura acumulou mais deste carboidrato. Nas avaliações realizadas o ataque da praga não apresentou resultados significativos quanto aos nutrientes quantificados na planta. Concluiu-se que os danos causados pela *M. fimbriolata* afetaram a qualidade da matéria-prima, incrementaram a produção de compostos fenólicos e contaminantes, comprometendo o processo fermentativo.

Palavras- chave: cigarrinha-das-raízes, *Saccharum spp*, fermentação etanólica.

DAMAGES CAUSED BY *Mahanarva fimbriolata* (STÅL, 1854) ON SUGARCANE QUALITY AND FERMENTATION PROCESS

SUMMARY – Raw material quality in the industrial process performance is very importance. Sugarcane harvest without burn have caused changes in the sugar cane sector, like the appearance of pests, as *Mahanarva fimbriolata*, which affect the plants development. This research was carried out to evaluate the effects of *M. fimbriolata* on sugarcane quality and fermentation process. The fifth year variety SP80-1842 was used and the experiment was arranged in a completely randomized design, with three replicates. The treatments were compored of four damage levels (0, 15, 30 and 60%) and two evaluation periods (may/ june and october), for the technological analysis and four damage levels, four fermentation cycles (1º, 4º, 7º and 10º) and two evaluation periods for the microbiology analysis with three replications. The tecnologicol parameters and total phenolics compaunds were determinated. The fiber present in the cane was evalueted . In the fermentation process yeast and bacterial analysis were done, and the wines werw submitted to its distillation composition. Glicerol, threalose and macro and micronutriets presents were determinated. The treatments with 60% of the stalks damaged presented the lowest mean a of Brix, Pol, Purity and TRS of juice values and high levels of RS, and total phenolic compounds. The cellular and sprout viabilities were reduced and the fermentation process presented higher concentration of bacteria with increased of damage level by *M. fimbriolata*. This caused higher sugar concentrations (TRRS) and lower wine alcohol content at the end of fermentation. Glycerol and trehalose did not present significant resulting with the damage levels, just when analyzed the reuse of yeast obtained trehalose accumulation. Pests attack did not present significant result for the nutrient content. The damages caused by *M. fimbriolata* affected the quality of the raw material, increase the production of phenolic compounds and contaminators, compromising the fermentative process.

Keywords: Spittlebug infestation, *Saccharum spp*, ethanolic fermentation.

I. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma cultura de grande importância econômica por sua alta eficiência no processo de produção de açúcar e álcool. O Brasil se destaca como o maior produtor mundial dessa cultura e o maior exportador mundial de etanol. A região centro-sul brasileira é uma das maiores produtoras, apresentando grande importância no cenário agrícola.

A ocorrência de fatores limitantes para o desenvolvimento da cultura pode resultar em prejuízos para a qualidade da matéria-prima, com reflexos diretos e indiretos no processamento industrial (MUTTON, 2008). A incidência de pragas como a cigarrinha-das-raízes (*Mahanarva fimbriolata*) se destaca como um desses fatores adversos ao desenvolvimento da planta.

O ataque de ninfas e adultos de *M. fimbriolata* promove a redução dos colmos, tornando estes mais finos e secos, muitas vezes, apresentando rachaduras devido ao sintoma de estresse hídrico que a praga causa (DINARDO-MIRANDA et al., 2000). Esse fator trazido pela mudança do ambiente promove alterações na planta como, por exemplo, maior presença de contaminantes e produção de compostos de defesa que influenciam de maneira negativa nos produtos finais.

A absorção de água e nutrientes pela planta se torna comprometida com o aumento do ataque da praga já que a ninfa se aloja na base da planta sugando intensamente a raiz. Além do sintoma de queima, nota-se através da redução da absorção de água com o comprometimento do colmo, possível redução nos nutrientes que a planta deixa de obter, causando com isso, vários problemas no desenvolvimento da cultura.

A fermentação é um processo muito importante para a produção de álcool e sua condução determina o rendimento industrial. Esse processo é muito influenciado por diversos fatores principalmente a qualidade da matéria-prima que engloba parâmetros como a incidência de pragas (MUTTON & MUTTON, 2002).

Com o ataque da cigarrinha-das-raízes na cana-de-açúcar a qualidade da matéria-prima é afetada, apresentando redução do teor de sacarose (MENDONÇA et al., 1996), e sólidos solúveis (Brix) (GONÇALVES et al., 2003). Os danos causados podem se manifestar quando a cultura está desenvolvida e quando o canavial ainda está em início de crescimento, sendo este o que apresenta maior dano (DINARDO-MIRANDA et al., 1999).

O desempenho das leveduras depende entre outros fatores da composição e condição do meio em que estão inseridas, os compostos presentes juntamente com os contaminantes que competem pelos nutrientes interferem de forma negativa determinando menor eficiência no processo industrial e rendimento alcoólico. Além disso, a menor quantidade de nutrientes no caldo prejudica a atuação das leveduras, pois estes são essenciais aos seus processos metabólicos. Diante de uma situação de estresse elas podem produzir compostos secundários influenciando negativamente na obtenção do produto final da fermentação.

Desenvolveu-se a presente pesquisa com o objetivo de avaliar os danos promovidos pela cigarrinha-das-raízes (*Mahanarva fimbriolata*) na qualidade da matéria-prima obtida pela cana-de-açúcar e os reflexos desse ataque sobre a microbiota fermentadora, quantidades de nutrientes contidos na cana, e no rendimento do processo fermentativo.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cana-de-açúcar e cigarrinha-das-raízes (*Mahanarva fimbriolata*).

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) ocupa atualmente cerca de 7 milhões de hectares ou cerca de 2% de toda a terra arável do Brasil, destacando-se como o maior produtor mundial desta cultura (ÚNICA, 2009). Em média, a produtividade anual brasileira está em entre 70 a 80 t/ha para a região centro-sul do Brasil, onde se localiza a maior parte das usinas brasileiras, enquanto no Estado de São Paulo, principal produtor, situam-se na faixa de 80 t/ha a 85 t/ha, ambos os casos considerando ciclo de cinco cortes (BIOETANOL DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2008).

A cana-de-açúcar se destaca por sua alta eficiência fotossintética, apresentando metabolismo C₄ e potencial geneticamente favorável para acúmulo de açúcares, na forma de sacarose. Ao final do ciclo vegetativo, predomina o processo de maturação, quando o acúmulo de fotossintatos é maximizado pelas plantas (MUTTON, 2008).

A cana-de-açúcar vem passando, nos últimos anos, mudanças profundas de âmbito tecnológico procurando se adaptar às demandas de produção com alta produtividade, competitividade e respeito ao meio ambiente. O aumento da área colhida mecanicamente e a iminente proibição da queima da cana-de-açúcar tem ocasionado, mudanças no manejo dessa cultura (ALMEIDA et al., 2003).

Esta mudança no sistema de produção ocorreu, devido especialmente, ao aspecto da preservação do meio ambiente para atender a legislação ambiental. Além disso, há outras vantagens do sistema de colheita denominado cana crua, tais como: proteção do solo contra erosão, redução dos custos com os tratos culturais (menor incidência de plantas daninhas), maior longevidade da cultura, e ainda a possibilidade de aproveitamento energético da palha (SOUZA et al., 2005).

No sistema de colheita mecânica da cana-de-açúcar, a quantidade de palha que deixa de ser queimada e é depositada sobre o solo pode chegar a 15 t/ha, variando em função da variedade, do estágio fenológico e da produtividade da cultura. Essa mudança no manejo da colheita da cultura teve reflexos imediatos nas características

do agroecossistema da cana-de-açúcar, resultando em alterações no perfil da entomofauna da cultura, principalmente no que se refere à composição das diferentes espécies de pragas e respectivas densidades populacionais (GARCIA & SVERZUT JUNIOR, 2008).

Com a adoção do corte mecanizado da cana-de-açúcar, a espessa camada de palha formada cria um ambiente úmido que proporciona temperatura e umidade favoráveis às cigarrinhas-das-raízes, *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (LOUREIRO et al., 2005). A Praga que vinha sendo contida, particularmente, pelo controle cultural realizado pela despalha da cana a fogo antes da colheita (GARCIA & SVERZUT JUNIOR, 2008).

As ninfas deste inseto começam a ecoldir dos ovos diapáusicos logo após as primeiras chuvas da primavera, na região Centro-Sul, o ciclo vital de *M. fimbriolata* inicia-se em setembro/outubro, com as populações de ninfas atingindo o ápice em dezembro/janeiro e reduzindo-se significativamente em abril, com o final das chuvas e início do inverno (DINARDO-MIRANDA, 2008a). Produzem uma espuma característica que as envolve e protege contra dissecação.

Esta espuma é formada pelo volume de seiva sugado e de substância mucilaginosa excretada pelas glândulas epidérmicas, denominadas glândulas de “Batelli” (GARCIA, 2002). Ao se alimentarem, ocasionam uma desordem fisiológica na planta em decorrência de suas picadas que, ao atingirem os vasos lenhosos da raiz, o deterioram, impedindo ou dificultando o fluxo de água e nutrientes constituindo assim, a fase mais prejudicial da praga, necrosando as raízes e permitindo a entrada de fungos patogênicos à planta (MACEDO, 2005).

Esta fase tem um período médio de 37 dias, dependendo das condições climáticas. Os adultos medem cerca de 12 mm de comprimento, possuem coloração em geral avermelhada, com presença ou não de manchas longitudinais nas asas (MENDONÇA et al., 1996). Existem diferenças entre a coloração de machos, que são avermelhados, e as fêmeas, apresentam coloração mais escura (marrom-avermelhada) (STINGEL, 2005).

Os adultos apresentam longevidade de aproximadamente 20 dias, (GARCIA & SVERZUT JUNIOR, 2008). Ao sugarem a seiva das folhas, injetam saliva nos estomas, local onde são armazenadas a água e as substâncias que se transformam em nutrientes para as plantas durante a fotossíntese. Em consequência do ataque não há acúmulo de açúcares nos colmos e eles se tornam menores e mais finos e com entrenós mais curtos (DINARDO-MIRANDA, 2008a).

A ausência do inseto de maio a setembro é decorrente da associação de falta de água e temperatura mais baixa. Assim, os ovos da geração de março/abril, encontrando déficit de água em abril/maio, permanecem em diapausa (quiescência) até setembro quando se inicia um novo ciclo (GARCIA et al., 2006). Observa-se que altas populações do inseto não estão presentes necessariamente na mesma área em anos consecutivos, ocorrendo migrações de altas infestações de um local para o outro (MACEDO, 2005).

A magnitude dos danos provocados pelo ataque de cigarrinhas-das-raízes varia com diversos fatores, entre os quais a época de colheita da cultura e a variedade cultivada (DINARDO-MIRANDA, 2008a). Os danos provocados no crescimento da cana-de-açúcar podem se manifestar de dois modos na colheita: quando ocorre o aparecimento da praga e a cultura se encontra desenvolvida e quando o canavial ainda está em início de crescimento e será colhido no meio e final de safra (DINARDO-MIRANDA et al. 1999).

O ataque de ninfas e adultos de *M. fimbriolata* resulta em colmos menores e mais finos em relação aos colmos de áreas não atacadas (DINARDO-MIRANDA et al. 2000), que contribuem para redução do teor de sacarose (MENDONÇA et al. 1996). Cerca de 20 ninfas por metro linear de cana (considerada alta infestação) podem causar perdas de 20% na colheita (PINTO, 2008).

Experimentos conduzidos por DINARDO-MIRANDA et al. (2006) apontaram redução de 25% na produtividade de parcelas infestadas que não receberam controle da praga em relação às parcelas tratadas, utilizando a variedade SP80-1842 considerada susceptível. Além da redução da produtividade de colmos, quando em altas populações, a planta atacada teve reduzidos teores de Brix e Pol do caldo, e aumento do teor de fibra dos colmos em GONÇALVES et al. (2003).

2.2 Qualidade da matéria-prima para o processo fermentativo

A matéria-prima utilizada na indústria sucroalcooleira corresponde a todo material vegetal e impurezas agregadas. A qualidade representa o conjunto de características que atende as exigências da indústria por ocasião do processamento (MUTTON, 2008). Essas são intrínsecas, podendo ser alteradas pelo manejo agrícola e definem seu potencial para a produção de açúcar e álcool (FERNANDES, 2006).

A ocorrência de fatores limitantes para o desenvolvimento da cana-de-açúcar pode resultar em prejuízos para a qualidade, com reflexos diretos e indiretos sobre o processamento industrial dos colmos (MUTTON, 2008). A matéria-prima de baixa qualidade reduz a velocidade do processamento na indústria, e com isso reduz também a qualidade e a quantidade dos produtos finais (CLARK & LEGENDRE, 1999).

Os fatores responsáveis pela qualidade da matéria-prima são: variedade da cana, condições climáticas, pragas e doenças e planejamento agrícola incluindo a maturação e o manejo da colheita (STUPIELLO, 1992).

A sanidade da cultura afeta significativamente a qualidade da matéria-prima, uma vez que em situações de estresse a planta utiliza suas reservas de açúcares para produção de biomoléculas que auxiliarão no processo de defesa contra o agente agressor (MUTTON, 2008). A cigarrinha-das-raízes tornou-se uma das principais pragas da cana-de-açúcar, em função do aumento da colheita sem queima, o ataque das ninfas e adultos causa danos que interferem negativamente na qualidade do produto que será entregue à indústria.

O problema decorrente do ataque da cigarrinha-das-raízes é a mudança do metabolismo secundário da planta, resultando na produção de compostos relacionados ao estresse ou responsáveis pela proteção, destacando-se os compostos fenólicos que possuem características adstringentes para insetos e patógenos (TAIZ & ZEIGER, 2004). O aumento da concentração desses compostos no caldo é um fator associado ao escurecimento do cristal de açúcar que será produzido (SIMIONI et al., 2006). Além disso, esses compostos podem atuar como inibidores do metabolismo das leveduras

durante o processo fermentativo, o que reflete em perdas no rendimento alcoólico e alterações na composição do destilado (RAVANELI et al., 2006).

Segundo DINARDO-MIRANDA (2003), com o ataque da praga o processo de fotossíntese é reduzido não acumulando açúcares nas folhas, conseqüentemente nos colmos, reduz a produtividade, e quando em altas populações, a cigarrinha-das-raízes é responsável pela redução do teor de sólidos solúveis (Brix), o teor de açúcar nos colmos (Pol cana) e elevação do teor de fibra na cana (DINARDO-MIRANDA et al., 2000; GONÇAVES et al., 2003). Além disso, através das injúrias causadas a ação de contaminantes é favorecida e estes introduzem produtos de metabolismos indesejáveis dificultando o processo de fermentação

2.3 Processo fermentativo e seus interferentes

A fermentação alcoólica é um processo bioquímico, no qual os microrganismos transformam os açúcares em etanol e CO₂. Este dissacarídeo é convertido em piruvato que sofre uma descarboxilação reduzindo o acetaldeído formado o etanol (LEHNINGER et al., 1995). É a principal etapa do processo de produção de álcool, já que nela o açúcar e outros componentes do mosto são transformados em álcool etílico, gás carbônico e outras substâncias que são responsáveis pela qualidade ou defeito do produto final (YOKOYA, 1995).

A eficiência da fermentação é diretamente afetada pelos componentes do caldo proveniente da matéria-prima entregue na indústria (MUTTON & MUTTON, 2002). Além da qualidade da matéria-prima, outros fatores afetam o processo fermentativo, dentre estes se destacam: pH, acidez, presença de microrganismos contaminantes, temperatura, concentração de açúcares do meio, etanol e disponibilidade de nutrientes.

O pH é um fator que possui grande importância no controle da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica (AMORIM et al., 1996). O tratamento ácido na indústria é utilizado de forma a controlar a contaminação bacteriana, por isso a correção do pH do meio durante a fermentação é uma etapa importante do processo de multiplicação e fermentação (MUTTON, 1998). Uma fermentação ideal ocorre com pH

entre 3,5 e 4,5, sendo esta correção realizada na prática com ácido sulfúrico (ANGELIS, 1992).

Embora algumas vezes o tratamento ácido se mostre estressante para a levedura, esse fator retarda a multiplicação das bactérias minimizando a contaminação, que é extremamente prejudicial à levedura e ao processo, reduzindo a eficiência fermentativa (AMORIM et al., 1996). As leveduras são células consideradas acidófilas, ou seja, são altamente tolerantes as variações de pH do meio, trabalham em faixas de pH que variam desde 2,4 a 8,6 (ANGELIS, 1992).

A maioria dos ácidos presentes no caldo de cana-de-açúcar está em baixas concentrações, são ácidos orgânicos que representam a maior proporção da acidez titulável do caldo. Os principais ácidos encontrados no caldo são: o aconítico, cítrico, málico, oxálico, succínico, fumárico e fosfórico, e eles tem um importante efeito nas reações de clarificação e na limitação da recuperação do açúcar (MUTTON, 1998).

Os microrganismos contaminantes afetam diretamente a fermentação, dentre eles destacam-se fungos, bactérias e leveduras, os quais não são direcionados para o processo da fermentação (MUTTON, 1998). Leveduras contaminantes são aquelas presentes no processo fermentativo que não foram selecionadas para a condução da produção de álcool, as quais prejudicam o processo causando problemas e aumentando o tempo de fermentação (CABRINI & GALLO, 1999).

A contaminação bacteriana é considerada o maior agente estressante no processo fermentativo, ela compete com a levedura na dorna para consumir os açúcares existentes no mosto (AMORIM et al., 1996). Esta infecção acarreta prejuízo ao rendimento da fermentação já que esses microrganismos ao degradarem o açúcar do meio, liberam metabólitos indesejáveis como ácidos orgânicos que podem agir como inibidores da fermentação, além disso, causam a floculação do fermento pela formação de gomas e espumas (YOKOYA, 1991; MUTTON, 1998).

Estes microrganismos contaminantes são trazidos por meios indiretos de contaminação como na realização do corte e colheita da cana-de-açúcar. A infestação pode aumentar durante os processos de corte e moagem do colmo, pois microrganismos do solo encontram condições favoráveis para seu desenvolvimento

(STUPIELLO & HORII, 1981). Além disso, o caldo da cana é rico em nutrientes, tem elevado teor de água, pH e temperatura favoráveis, constituindo um bom substrato para o crescimento de microrganismos.

A elevada população de bactérias pode resultar em aumentos significativos na formação do ácido láctico e às vezes de acético. O ácido láctico é o principal metabólito produzido pelas bactérias lácticas e pode ser considerado um indicador mais preciso da contaminação, pois reflete a atividade metabólica desses microrganismos (AMORIM et al., 1996), o ácido acético é um produto formado em pequenas quantidades na fermentação, ambos são inibidores do crescimento das leveduras (NARENDRANATH, et al., 2001).

SILVA (2000) relata que as leveduras são mais efetivas quando trabalham na faixa de temperatura entre 26 e 32 °C. Temperaturas inferiores a 30-32 °C prolongam o tempo de fermentação enquanto temperaturas elevadas inibem o crescimento celular, especialmente na presença de elevados teores de etanol (STUPIELO & HORII, 1981).

Quando a temperatura está abaixo da ideal para as leveduras é necessário um maior gasto de energia para completar o ciclo celular, já que diminui o crescimento aumentando o tempo de geração. Além disso, em temperaturas muito elevadas, acima de 40 °C a maioria das leveduras deixa de se multiplicar e perde a viabilidade, além de favorecerem o desenvolvimento de bactérias, a evaporação do álcool, além da produção de diversos metabólitos (ANGELIS, 1992).

Se a quantidade de bastonetes está controlada em 10^6 ml^{-1} a temperatura máxima a que se pode chegar na fermentação é de 35 °C, na qual se obtém uma diminuição na produção de biomassa e um aumento no rendimento fermentativo sem esgotamento do substrato pela levedura, isto ocorre com boa parte das linhagens de leveduras isoladas nas destilarias (AMORIM et al., 1996).

Segundo ANGELIS, (1992) a concentração de açúcares presentes no meio afeta tanto a produção de biomassa celular como o processo fermentativo. Quando a levedura está se multiplicando na dorna é preciso manter baixa a alimentação com açúcares para evitar a fermentação, no momento em que se atinge a massa de células

desejada, eleva-se a concentração de açúcares para inverter o processo e ocorrer à fermentação.

O aumento da concentração de açúcares no meio reprime a respiração nas células de leveduras decorrendo a inibição da síntese de enzimas respiratórias e inatividade das mitocôndrias, a este efeito se dá o nome de Efeito Crabtree (STUPIELLO & HORI, 1981). Através do processo de adaptação que envolve a transferência gradual da levedura para o meio contendo concentrações de glicose mais elevadas, é possível aumentar a tolerância do inoculo a concentrações mais altas de açúcares no substrato (MUTTON, 1998).

O etanol possui influência negativa nas células de leveduras, pois promove uma ação inibitória do metabolismo das leveduras já que como produto da fermentação, ele tende a se acumular no interior da célula, tornando-se limitante para sua própria produção (TROYER, 1953).

Uma concentração relativamente baixa de etanol no meio já é suficiente para inibir o crescimento das células de leveduras. Na fermentação, as células parecem ser tolerantes ao etanol até que este atinja aproximadamente concentração de 20% (v/v) (NAGODAWITHANA & STEINKRAUS, 1976). A ação estressante do etanol na levedura pode ser potencializada ainda mais, pelo excesso de acidez e temperaturas inadequadas na fermentação (AMORIM et al., 2005).

2.4 Nutrientes na fermentação

As leveduras são agentes biológicos e para metabolizarem o substrato, precisam se nutrir adequadamente. Suas células exigem diversos íons inorgânicos (minerais) para produzirem ótimos crescimentos e rendimentos fermentativos. O desequilíbrio entre os nutrientes minerais provoca alterações metabólicas significativas (AMORIM et al., 1996). Na etapa de multiplicação das células do fermento há maior exigência em compostos nitrogenados (proteínas e ácidos nucleicos) fundamentais à biossíntese da estrutura celular (ANGELIS, 1992).

Os principais alimentos da levedura são os açúcares e o nitrogênio, mas para sua sobrevivência ela necessita de outros elementos, tais como o fósforo, potássio, cobre, enxofre, magnésio e zinco, que participam dos processos vitais da célula (AMORIM et al., 2005).

O nitrogênio é um elemento essencial não apenas para o crescimento como para uma fermentação adequada. Em quantidade insuficiente pode aumentar o tempo de fermentação e reduzir o rendimento, se for acima da quantidade ideal, a levedura irá se multiplicar, desviando o açúcar para a produção de biomassa. A quantidade ideal de nitrogênio assimilável na fermentação é de 300 a 350 ppm de N total no mosto. (STUPIELLO & HORI, 1981).

O fósforo possui grande importância para a levedura com relação ao crescimento e metabolismo de carboidratos (STUPIELLO & HORI, 1981) participando ativamente nos processos de transformação e transferência de energia química, além de integrar as moléculas informacionais (DNA, RNA) e estrutura das membranas celulares. Sua composição no mosto varia muito e, freqüentemente exige complementação, a recomendação no mosto varia de 125 a 150 ppm de P_2O_5 (AMORIM et al., 1996; 2005, STUPIELLO & HORI, 1981).

A quantidade necessária de enxofre no mosto é relativamente pequena, acima do nível ideal aumenta a produção de glicerol e inibe o desenvolvimento das leveduras. A quantidade ideal de potássio varia de 700 a 1000 mg/L no mosto, possui a função de estabilizar as membranas e agir como ativador enzimático, além de controlar o pH interno da célula e influenciar na absorção de fósforo e zinco. Outros minerais atuam como ativadores enzimáticos à multiplicação e a fermentação, destacando-se o magnésio, cerca de 100 a 200 mg/L, que atua em mais de duzentas reações enzimáticas, o zinco, cobre, manganês necessários em torno de 1 a 5 mg/L e outros minerais que afetam a viabilidade, a multiplicação de células e o rendimento (AMORIM et al., 2005).

As concentrações de nutrientes encontradas apresentam uma relação direta com a variedade estudada, o tipo de solo e adubação, dentre outros fatores. Graças à composição química e tecnológica do caldo de cana de açúcar o fornecimento dos

elementos minerais necessários ao uso das leveduras, se dá quase que naturalmente (MUTTON, 1998), mas com a utilização de mostos esgotados desses nutrientes, e a reutilização constante da levedura é necessária a complementação do meio.

2.5 Glicerol e trealose – compostos secundários da fermentação

Nem todo açúcar presente no mosto é transformado em álcool e gás carbônico. Parte é utilizada para a multiplicação do fermento na dorna, bem como para a formação de carboidratos como a trealose e produtos secundários, como glicerol, ácidos, aldeídos, ésteres, álcoois superiores, etc (AMORIM et al., 2005).

O composto secundário formado em maior quantidade nas células de leveduras é o glicerol, este subproduto da fermentação compete com a produção de etanol pela utilização do poder redutor do NADH, pois está presente na mesma via de obtenção do etanol. Sua produção é inversamente proporcional à de álcool, ou seja, quando há o aumento da produção de glicerol tem-se menos etanol produzido (AMORIM et al., 2005).

É um composto volátil que contribui para a qualidade de bebidas, como vinho e destilados, pois tem um gosto ligeiramente adocicado e ajuda a melhorar a viscosidade e o sabor apreciado na boca (REMIZE et al., 2000; AMORIM et al., 2005).

A produção de glicerol é uma característica inerente à levedura *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, excreta este composto enquanto que outras leveduras o armazenam. Em meios com alta pressão osmótica (baixa atividade de água) forma-se glicerol em maiores quantidades, assim como, quando ocorrem processos oxidativos decorrentes da produção de biomassa ou formação de ácidos orgânicos como o ácido succínico e o ácido acético, a produção de glicerol é aumentada. Tem-se que para cada grama de ácido acético produzido, três gramas de glicerol devem ser formados (AMORIM et al., 1996). A produção de glicerol está relacionada com a levedura utilizada no processo e com o ambiente de fermentação, sendo que para sobreviver em meios muito concentrados, por exemplo, a base de melaço, ela produz mais glicerol (AMORIM et al., 2005).

A trealose é um dissacarídeo não redutor constituído de duas moléculas de glicose, encontrado diversos organismos incluindo bactérias, fungos, nematóides e plantas (NEVES & FRANCOIS, 1992). Originalmente era considerada substância de reserva energética para a levedura, vários autores destacam que a trealose possui função de proteção para a célula da levedura. Durante processos de estresses, tais como, altas temperaturas, choque osmótico, efeitos tóxicos do etanol e desidratação (ALCARDE & BASSO, 1997).

CROWE et al. (1984) propuseram que a função primária da trealose na levedura é de agente protetor das membranas celulares e das proteínas que em baixas concentrações esgotam a atividade intracelular do citoplasma. Nas leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae* a trealose é acumulada durante períodos de crescimento reduzido como, por exemplo, na falta de nitrogênio, enxofre e fósforo, assim como durante a fase estacionária de crescimento em glicose (LILLIE & PRINGLE, 1980; FRANÇOIS et al., 1991). Segundo ALCARDE & BASSO (1997) após o esgotamento da glicose do meio a trealose se acumulará, atingindo alta concentração dentro da célula.

A capacidade de adaptação das leveduras isoladas dos processos fermentativos e sua relação entre acumular trealose, podem ser um mecanismo importante para a sobrevivência e predominância das linhagens nas dornas de fermentação (PATARO et al., 2002). A presença de contaminantes na matéria-prima prejudica o processo fermentativo pelo consumo de açúcares e nutrientes presentes no meio, liberando compostos, este fato podem estar relacionado com o acúmulo de trealose pela levedura em função do estresse causado.

Observa-se que muitos fatores são de fundamental importância para o bom desempenho de um processo industrial e obtenção de um produto final de qualidade. O estudo destes torna-se necessário, pois influencia de forma significativa em novas técnicas que visam o aprimoramento e melhoria dos processos.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Instalação e condução do experimento

O experimento foi realizado na safra de 2007/2008, sendo instalado em área pertencente à Louis Dreyfus Commodities Bioenergia S/A – Usina São Carlos, no município de Guariba-SP. As análises foram conduzidas nos Laboratórios de Tecnologia do Açúcar e Alcool e Microbiologia das Fermentações do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Jaboticabal - SP.

Utilizou-se a variedade SP 80-1842 de 5º corte, precoce considerada suscetível ao ataque da praga, cuja colheita anterior foi realizada mecanicamente e sem queima prévia da palha. As avaliações foram realizadas em duas épocas, no final das chuvas em maio/junho (inverno) e no período pós-seca em outubro (primavera) de 2007 para melhor visualização dos danos causados.

A área experimental foi monitorada para verificar a infestação de cigarrinha-das-raízes a partir de dezembro de 2006 e não houve nenhum tipo de controle químico da área. Em fevereiro de 2007 realizou-se a contagem de ninfas na base da planta em 9 amostragens ao acaso na área experimental com o afastamento e posterior reposição da palha (Tabela 01). A contagem de ninfas foi realizada em dois metros lineares, na linha central de nove parcelas previamente distribuídas na área.

Tabela 01. Valores médios da infestação de cigarrinha-das-raízes (ninfas/m) na área experimental. Guariba-SP (2007/2008).

Data	Ninfas/m
10/11/2006	10,6
11/01/2007	17,8
09/02/2007	4,83
02/03/2007	5,33
23/03/2007	14,61
13/04/2007	6,67
04/05/2007	0,39
25/05/2007	0,11

Para composição dos tratamentos utilizou-se a metodologia proposta por GONÇALVES et al. (2003) que estabeleceu a classificação dos colmos baseada no grau de comprometimento que estes apresentavam em função do ataque da praga (Tabela 02).

Tabela 02. Metodologia de composição dos tratamentos

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

Foram denominados de colmos “aparentemente sadios”: perfilhos que apresentavam a parte externa sem danos e com o meristema apical vivo; “com danos”: colmos cuja aparência externa apresentava-se danificada, com o meristema apical seco, mas com a parte basal ainda verde; e colmos “secos”: aqueles que ainda estavam ligados à touceira, mas completamente secos, cada tratamento era composto por um feixe de 20 colmos representando os seguintes níveis de danos: 0 % de danos, 15 % de danos, 30 % de danos e 60 % de danos.

O delineamento experimental utilizado para as análises tecnológicas do caldo foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 2, sendo os tratamentos primários os níveis de danos promovidos pela praga (0, 15, 30 e 60%), e os secundários as duas épocas (maio/junho e outubro), com três repetições.

Os colmos colhidos nas épocas determinadas foram removidos do canavial para o carreador onde foram despalhados e despontados na altura da gema apical e a seguir os tratamentos foram compostos, identificados e encaminhados para extração do caldo no laboratório de PCTS (pagamento de cana pelo teor de sacarose) da Usina São Carlos segundo TANIMOTO (1964). Logo após a extração do caldo, este foi acondicionado e encaminhado ao Laboratório de Tecnologia do Açúcar e Álcool da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Jaboticabal, onde foram realizadas as

análises tecnológicas. O resíduo fibroso resultante da prensagem foi pesado para cálculo da fibra % cana.

3.2 Análises Tecnológicas do caldo e da cana

O Brix e a Pol foram determinados segundo SCHENEIDER (1979), a Pureza aparente do caldo através do cálculo ($\text{Pol} \times 100/\text{Brix}$). O pH foi determinado por leitura direta em medidor digital Digimed DMPH – 2, com temperatura corrigida em 25°C. Os açúcares redutores totais do caldo (ART) foram dosados pelo método volumétrico de LANE & EYNON (1934) e açúcar redutor (AR) do caldo calculador por CONSECANA (2008).

Acidez volátil determinada por VILLELA et al. (1973) A acidez total determinada através da titulação do caldo em agitação com NaOH padrão 0,05N (COPERSUCAR, 2001). Os compostos fenólicos totais foram determinados segundo FOLIN & CIOCALTEAU (1927). A Fibra da cana foi calculada segundo CONSECANA (2008) e TANIMOTO (1964). A Umidade foi determinada através da secagem da cana desfibrada em estufa a 65°C por 48 horas. Após a secagem, o material seco foi pesado e a umidade calculada.

3.3 Condução do processo fermentativo

A fermentação foi avaliada em quatro ciclos fermentativos utilizando o esquema fatorial 4 x 4 x 2 sendo os tratamentos primários os níveis de danos promovidos pela cigarrinha-das-raízes (0, 15, 30 e 60%), os tratamentos secundários quatro ciclos fermentativos (1º, 4º, 7º e 10º) e os terciários as duas épocas de avaliação (maio/junho e outubro).

Para obtenção do mosto o caldo extraído foi clarificado adicionando-se 300mg L⁻¹ de P₂O₅ aplicados na forma de ácido fosfórico (H₃PO₄), para auxílio da decantação, ajustando-se a seguir o pH a 7, através da adição de leite de cal [Ca(OH)₂] (6ºBé). O caldo tratado foi aquecido até 100 a 105°C, acrescentando-se 2mg L⁻¹ de polímero

(Mafloc 985), e transferindo-se para proveta de 1L, para decantação das impurezas em sistema de decantação aquecido por lâmpadas por 10 minutos. A borra decantada foi retirada através de filtração, esse procedimento foi adotado para retirada de impurezas do caldo que podem interferir na fermentação. O caldo clarificado foi padronizado para 13º Brix e 14º Brix na primeira e segunda épocas respectivamente. A seguir padronizou-se o pH a 3,5 ($\pm 0,3$) com ácido sulfúrico e a temperatura a 32º C, obtendo-se o mosto para o processo fermentativo.

O inóculo constituiu-se do fermento prensado biológico na concentração de 30 g L⁻¹. Realizaram-se duas alimentações de mosto com intervalos de 30 minutos totalizando um volume final de 500 mL no frasco. Os frascos foram mantidos em estufas tipo B.O.D, com a temperatura mantida em 32º C, e as fermentações monitoradas (a cada 4 horas) com o auxílio de densímetro de ºBrix. O final das fermentações foi estabelecido quando o Brix apresentou valores menores ou iguais a 1, ou com a estabilização da leitura em intervalo de 30 minutos.

Ao término de cada fermentação, recuperou-se o fermento por centrifugação a 1650g, por 5 minutos a 25ºC. Este foi lavado com solução salina 0,85%, esterilizada e submetido à agitação por 1 hora a 32ºC, com 0,5% de glicose e acidificação com H₂SO₄ para reduzir o pH, quando se encontrava acima de 3,5. Obtinha-se então, o inóculo que era utilizado no novo ciclo de fermentação.

No início (10 minutos após a segunda alimentação) e final da fermentação foram retiradas alíquotas do mosto e vinho para determinações microbiológicas.

O vinho foi submetido a quantificação do teor alcoólico em densímetro digital, (AMORIM, et al. 1979), e açúcares redutores residuais totais (ARRT) por LANE & EYNON, 1934. A Eficiência Fermentativa (EF) foi calculada pela relação (Álcool produzido x 100) / Álcool teórico (MUTTON, 1998) e o Álcool teórico foi calculado com base na equação estequiométrica, considerando-se que 1g de ART produz 0,6475mL de etanol (rendimento estequiométrico).

Os componentes voláteis presentes nos vinhos foram recuperados por destilação. As amostras foram submetidas à análise de componentes em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 2014, acoplado com software GC Solution com uma coluna

Restec modelo Rtx[®]-1301, 60m x 0,25mm. Injetou-se 1µL de cada amostra nas condições de temperatura do injetor, 200°C temperatura do detector, 240°C, gás de arraste Nitrogênio; pressão 186,6kPa; fluxo 47,2mL/min.; fluxo da coluna 1,7mL/min; velocidade linear 30cm/seg. A temperatura da coluna permaneceu por 7,5 minutos a 40°C, aumentando até 220°C, com uma taxa de 10°C/min. Os compostos avaliados foram: acetaldeído, acetato de etila, etanol, álcool n-propílico, álcool isobutílico e álcool isoamílico.

3.4 Análises microbiológicas

Para avaliação da viabilidade do fermento utilizado, realizou-se contagem em Câmara de Neubauer (LEE et al., 1981) obtendo-se média de 98% de viabilidade nas duas avaliações e posterior cálculo para verificação da quantidade de células vivas inoculadas nas duas épocas.

O monitoramento da fermentação através das análises de viabilidade foi realizado com a retirada de uma alíquota do vinho no início do processo que foi estabelecido aos 50 minutos após a inoculação do fermento e outra avaliação ao final do processo, com contagens de células em Câmara de Neubauer. Os parâmetros microbiológicos avaliados foram: viabilidade celular das leveduras, viabilidade de brotos, índice de brotamentos e concentração de bactérias contaminantes, que foram calculados através das seguintes fórmulas:

- Número de células (células/mL) = células totais/16 x $2,5 \cdot 10^7$
- Viabilidade Celular % = células vivas x 100/células vivas + mortas
- Viabilidade de Brotos % = brotos vivos x 100/ brotos vivos + mortos
- Índice de Brotamentos % = brotos vivos x 100/ células vivas + mortas
- Concentração de Bactérias (cel/mL x 10^8) = nº bactérias x diluição x $2,5 \cdot 10^5/16$

No caldo, mosto, início e final da fermentação, os microrganismos foram quantificados por plaqueamento. No caldo e mosto foram realizados plaqueamentos somente nos ciclos ímpares.

Para contagem de bactérias lácticas empregou-se o meio MRS Agar (Man, Rogosa e Sharp - peptona 1%, extrato de carne 1%, extrato de levedura 0,5%, glicose 2%, hidrogenofosfato de potássio 0,2%, tween 80 1%, citrato de diamônio 0,2%, acetato de sódio 0,5%, sulfato de magnésio heptahidratado 0,01%, sulfato de manganês tetra hidratado 0,005%, agar 1,2%) (MAN et al., 1960) com adição de cicloheximida (100mg/L).

A quantificação de leveduras foi realizada utilizando o meio WLN (Wallerstein Laboratories Nutrient Agar - glicose 5%, KH_2PO_4 55mg, KCl 42,5mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 12,5mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12,5mg, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,25g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,25g, extrato de levedura 0,4%, caseína 0,5%, verde de bromocresol 2,2mg, agar 2%, água destilada 1000mL) (GREEN & GRAY, 1950, modificado por OLIVEIRA & PAGNOCA, 1988) com adição dos antibióticos ampicilina e ácido nalidíxico (100mg/L cada).

Para microrganismos totais empregou-se o meio PCA (Plate Count Agar - triptona 0,5%, extrato de levedura 0,25%, glicose 0,1%, agar 1,5%). De cada meio, foram utilizadas duas placas, com uma repetição correspondente a cada diluição seriada de 10^{-5} e 10^{-6} para o meio MRS e 10^{-9} e 10^{-10} para os meios WLN e PCA. No caldo e mosto, foram utilizadas as diluições 10^{-3} e 10^{-4} . As placas foram incubadas em estufas tipo B.O.D. com controle de temperatura a 32 °C por três dias.

3.5 Determinação de compostos secundários – glicerol e trealose

O teor de glicerol determinado após no vinho delevurado, segundo COPERSUCAR (1988). Para trealose foram retiradas alíquotas no início e final de cada ciclo fermentativo que foram imediatamente congeladas para posterior avaliação. A trealose foi extraída com ácido tricloroacético – CCl_3COOH 0,5 M (TCA) a frio (TREVELYAN & HARRISON, 1956) e determinada pelo método da antrona (BRIN,

1966) e a leitura feita em espectrofotômetro a 620nm. A trealose foi expressa em mg de trealose/mg de proteína.

3.6 Determinações de macro e micronutrientes

A metodologia utilizada para avaliação de nutrientes está descrita em MALAVOLTA et al., 1997. Para determinação de nitrogênio total na massa seca retirou-se uma amostra da cana desfibrada que foi seca em estufa a 65°C por 48 horas. Para o caldo, a amostra foi retirada após extração pela prensa e uma alíquota do mosto foi separada logo após sua preparação. Utilizou-se o método de Kjeldahl-Rittenberg que converte o N combinado da amostra à amônia, que é destilada e recebida em solução ácida.

A digestão da amostra inclui a conversão do N-combinado ou orgânico à N-amoniacal com ácido sulfúrico concentrado e a quente. Concluída a digestão ácida da amostra, o NH_4^+ resultante deve ser separado dos reagentes usados para a sua conversão, e também dos outros constituintes do extrato.

A amostra a ser destilada é baseificada com solução concentrada de NaOH (18 M). A amônia é destilada por arraste de vapor, sendo recebida em solução de ácido bórico contendo indicador e titulada diretamente com ácido sulfúrico ou clorídrico padronizado. Nesse ponto, determina-se a concentração de N-total da amostra (TRIVELIN et al., 1973).

Os demais nutrientes foram determinados por digestão nitroperclórica. Após a digestão, com o extrato obtido, realizou-se a determinação de fósforo total por colorimetria do metavanadato que se baseia na formação de um composto amarelo formado no sistema vanadomolibdofosfórico em acidez de 0,2 a 1,6 N. O Enxofre por turbidimetria do sulfato de bário que se baseia na turbidez formada pela precipitação do enxofre pelo cloreto de bário, na forma de sulfato de bário medida por colorímetro ou espectrofotômetro na forma de transmitância ou absorbância. Potássio, cálcio,

magnésio, ferro, manganês e zinco por espectrometria de absorção atômica (MALAVOLTA et al., 1997).

3.7 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo Teste F e a comparação entre médias realizadas pelo teste de Tukey ($P=0,05$) (BANZATTO & KRONKA, 2006) sendo os dados da contagem de bactérias transformados em $\text{Log}(x+5)$.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliações tecnológicas do caldo - parâmetros convencionais e não convencionais

Como se pode verificar, houve efeito significativo para os níveis de danos e épocas de colheita. Os resultados observados para Brix e Pol do caldo (Tabela 03, Figura 01) demonstraram que o tratamento com 60% dos colmos danificados apresentou menor média com redução de 1,27%, se diferenciando significativamente da testemunha e dos demais tratamentos. Experimentos avaliando a qualidade tecnológica do caldo após infestação da praga confirmam a redução dos açúcares acumulados na forma de sacarose (Pol) (DINARDO-MIRANDA et al. 2000; RAVANELI et al. 2006) assim como, redução dos sólidos solúveis totais (Brix) em GONÇALVES et al. (2003).

Houve redução dos açúcares redutores totais (ART) quando os danos eram de apenas 15% e do mesmo modo para Pureza aparente do caldo já no tratamento com 30% de colmos com danos (Tabela 03, Figura 01). Este fato pode ser em decorrência do estresse causado na planta ocasionando uma aparência de queima, devido ao colmo seco (MENDONÇA, 1996) e com isso a quantidade de açúcar acumulado é menor.

Além disso, quando se analisou os valores dos açúcares redutores (AR) do caldo, verificou-se o aumento significativo deste parâmetro com os danos (Tabela 03, Figura 01). A planta ao sofrer injúria, através do ataque da praga, por exemplo, altera o metabolismo, passando a produzir maiores teores de compostos de defesa (TAIZ & ZEIGER, 2004), requerendo para isso energia proveniente da via glicolítica. Neste caso, a cana que sofreu o ataque da praga apresentou maiores teores de glicose, e menores teores de sacarose, apresentando com isso, menores valores de Brix, Pol, Pureza e ART (Figura 01).

Tabela 03. Valores médios dos parâmetros tecnológicos do caldo para Brix, Pol, Pureza, AR, ART, Compostos fenólicos.

Causas de variação	Brix	Pol	Pureza	AR	ART	Fenol
	Caldo	Caldo	Caldo	Caldo	Caldo	Caldo
	%					µg/mL
Níveis de danos (A)						
0%	20,16A	17,33A	85,41A	0,71B	18,66A	392,03B
15%	20,04A	17,15A	85,16A	0,72B	18,38AB	412,31AB
30%	19,86A	16,78A	84,11AB	0,76B	17,96B	434,14AB
60%	19,06B	15,89B	82,66B	0,81A	17,39C	457,05A
F	5,46**	11,50**	5,06**	5,10**	13,97**	3,71*
DMS (Tukey)	0,78	0,7	2,05	0,07	0,55	53,73
Épocas (B)						
maio/junho	15,23B	11,96B	79,41B	0,92A	12,97B	323,33B
outubro	24,33A	21,61A	89,26A	0,58B	23,22A	524,44A
F	1841,07**	2596,62**	315,12**	317,82**	4743,77**	191,12**
DMS (Tukey)	0,42	0,37	1,09	0,04	0,29	28,82
A x B	0,18 ^{ns}	0,19 ^{ns}	1,01 ^{ns}	1,02 ^{ns}	1,99 ^{ns}	0,73 ^{ns}
CV	5,87	6,18	3,6	13,89	4,5	18,8

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo; * = significativo ao nível de 5%; ** = significativo ao nível de 1%; ART = Açúcares Redutores Totais; AR = Açúcares Redutores

Na segunda época de avaliação observou-se que a cana após passar pelo processo de maturação apresentou maior acúmulo de açúcares na forma de sacarose, obtendo maiores os valores de Brix, Pol, Pureza e ART e menores os valores de AR no caldo (Tabela 03, Figuras 02 e 03). A maturação é determinada principalmente pelos teores de sacarose, açúcares redutores e umidade do colmo durante o ciclo da cultura, ao longo do tempo esses teores são mais elevados (LAVANHOLI, 2008).

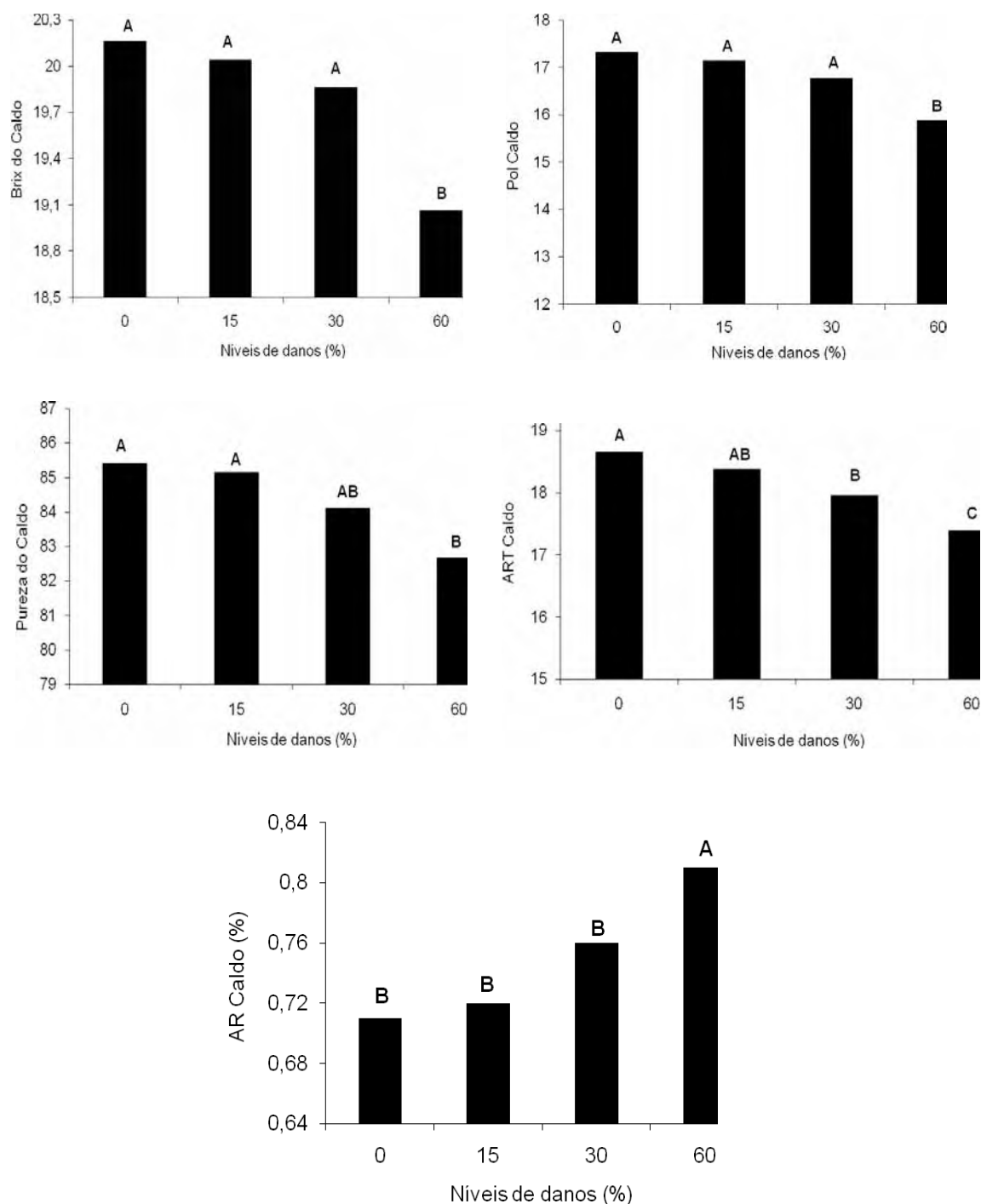


Figura 01: Análises tecnológicas: Brix, Pol, Pureza, ART e AR do caldo nos diferentes níveis de danos causados por *M. fimbriolata* para as duas épocas de avaliação. Médias iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

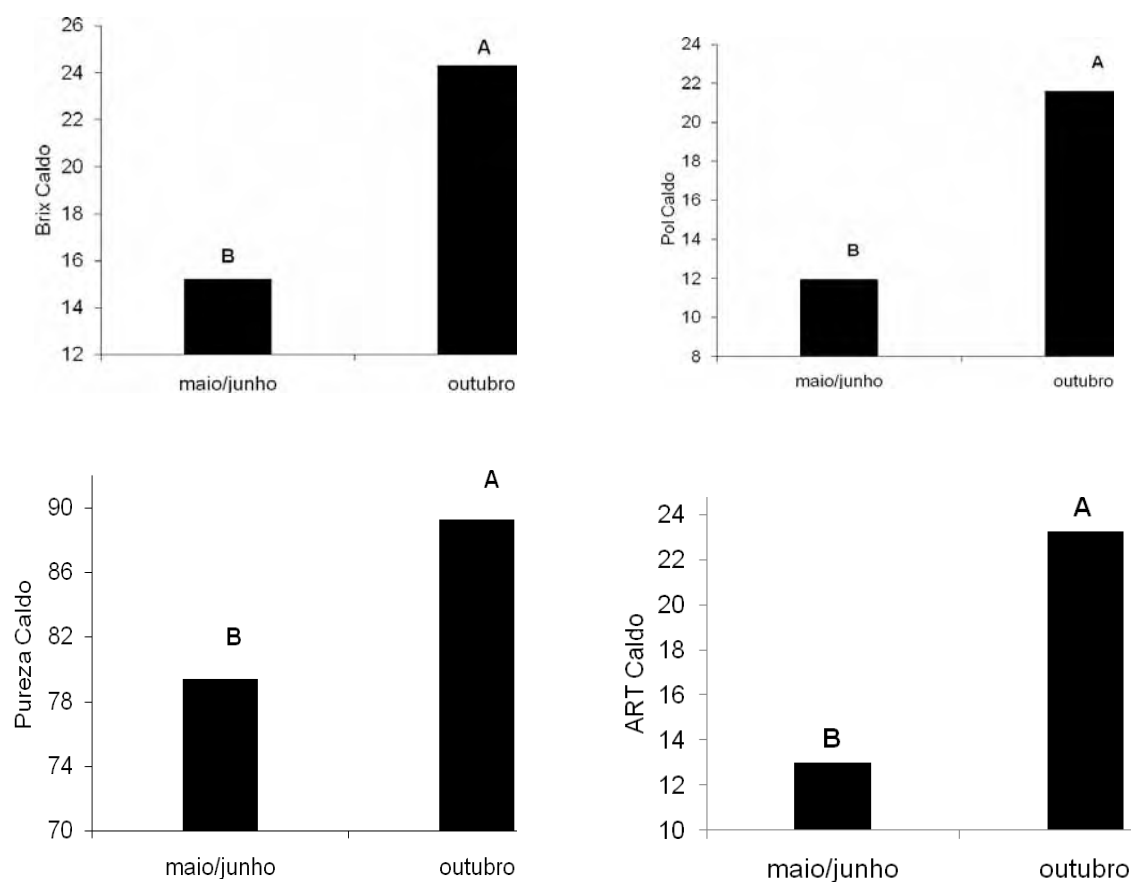


Figura 02: Análises tecnológicas: Brix, Pol, Pureza e ART do caldo nas duas épocas de avaliação referente aos quatro níveis de danos causados por *M. fimbriolata*. Médias iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

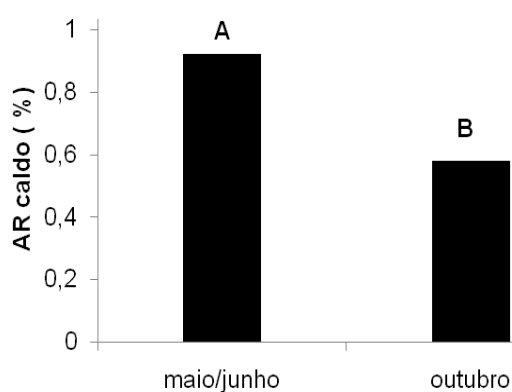


Figura 03: Análise tecnológica: AR do caldo nos dos açúcares redutores do caldo nas duas épocas de avaliação referente aos quatro níveis de danos causados por *M. fimbriolata*. Médias iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

Maiores teores de compostos fenólicos foram observados para os maiores níveis de danos (Tabela 03, Figura 04). SILVA et al. (2005) constataram que a maior infestação de cigarrinha-das-raízes provocou aumento no teor de fenol total na planta sendo esses compostos relacionados ao estresse. Para se proteger do ataque de pragas a planta sintetiza biomoléculas de defesa modificando o metabolismo secundário resultando na produção de compostos responsáveis pela proteção (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Esses compostos são produzidos naturalmente pela planta, ao longo do processo de maturação, culminando em maiores teores no momento da colheita (SIMIONI et al., 2006), o que corrobora o resultado deste estudo, no qual a quantidade de compostos fenólicos totais foi maior na segunda época avaliada (Tabela 03, Figura 04). PRESOTTI et al. (2007) observaram a mesma tendência em relação a esse aumento em estudos avaliando a infestação da praga.

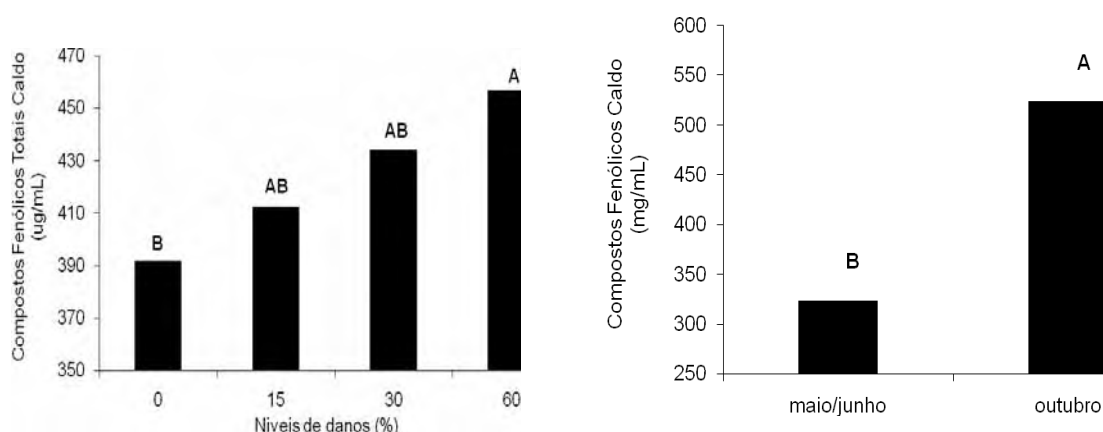


Figura 04: Análises tecnológicas dos teores de compostos fenólicos do caldo nos diferentes níveis de danos causados por *M. fimbriolata* para as duas épocas de avaliação. Médias iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0.05$).

Avaliando-se o comportamento do pH nas épocas de colheita e sua interação significativa com os níveis de danos (Tabela 04, Figura 05), pode-se observar que quanto maior foi o tempo que os colmos danificados pela praga permaneceram no campo, mais elevada foi a redução do pH. DINARDO-MIRANDA et al. (2008b) relataram que a colheita tardia do canavial infestado por cigarrinha-das-raízes

apresentou redução significativa da produtividade (TCH) com conseqüente redução da produção de sacarose aparente (TPH) na matéria-prima entregue à indústria. Os valores de pH dos tratamentos com maiores porcentagens de danos são próximos de 5,0, o que pode ser indicativo de deterioração já que cana muito deteriorada normalmente apresenta valores de pH menores que 5,0 (STUPIELLO, 1999).

Quando os danos ocasionados pela praga aumentaram, a acidez total e volátil do caldo também apresentaram valores superiores (Tabela 04), esse fato pode ser explicado pela possível produção de ácidos, que associados com os valores de pH pode ser indicativo de deterioração da matéria-prima. Além disso, os colmos se tornam finos e secos, apresentando rachaduras, permitindo a entrada de microrganismos (DINARDO-MIRANDA, 2008a).

A não realização de controle de pragas proporciona o desenvolvimento de número maior de contaminantes, provocando perdas de açúcares através da formação de ácidos (MUTTON, 2008). RAVANELI et al.(2006) observaram o aumento da acidez total em relação ao nível de infestação da *M. fimbriolata*.

Verificou-se aumento significativo nos teores de fibra da cana após o aumento dos danos produzidos pela praga (Tabela 05, Figura 07). Em conseqüência do ataque dos adultos e das ninfas, o processo de fotossíntese pode ser reduzido diminuindo a formação de açúcares nas folhas, conseqüentemente, reduzindo a quantidade nos colmos que se tornam menores, mais finos e com entrenós mais curtos (DINARDO-MIRANDA, 2008a).

Tabela 04. Valores médios para pH, acidez total e acidez volátil do caldo.

Causas de variação	pH	Acidez total	Acidez Volátil
		gH ₂ SO ₄ /L	mg ác. acético/L
Níveis de danos (A)			
0%	5,27A	1,09B	13,53B
15%	5,26AB	1,13AB	15,52AB
30%	5,20B	1,19AB	17,14AB
60%	5,09C	1,25A	18,76A
F	18,84**	4,45**	3,62*
DMS (Tukey)	0,07	0,12	4,34
Épocas (B)			
maio/junho	5,26A	1,23A	19,23A
outubro	5,15B	1,11B	13,25B
F	30,11**	13,81**	25,84**
DMS (Tukey)	0,04	0,06	2,33
A x B	8,28**	2,56 ^{ns}	0,05 ^{ns}
CV	2,02	15,11	39,66

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo; * = significativo ao nível de 5%; ** = significativo ao nível de 1%;

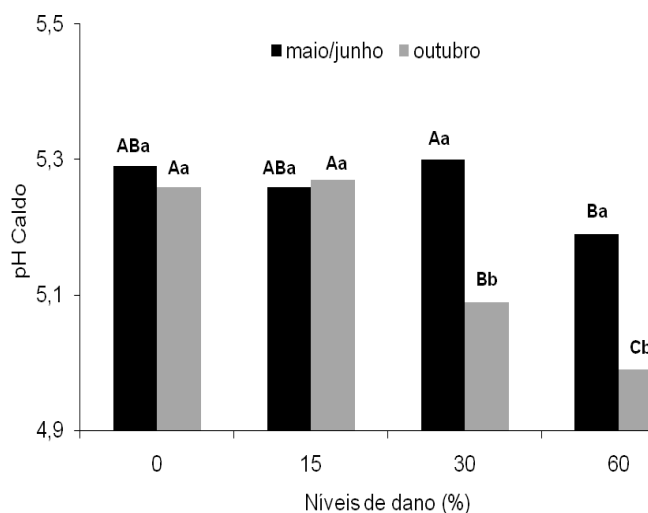


Figura 05: Interação entre níveis de danos causados por *M. fimbriolata* e épocas de avaliação para valores de pH. Letras maiúsculas comparam médias dentro de danos e letras minúsculas comparam entre épocas (Tukey P=0,05).

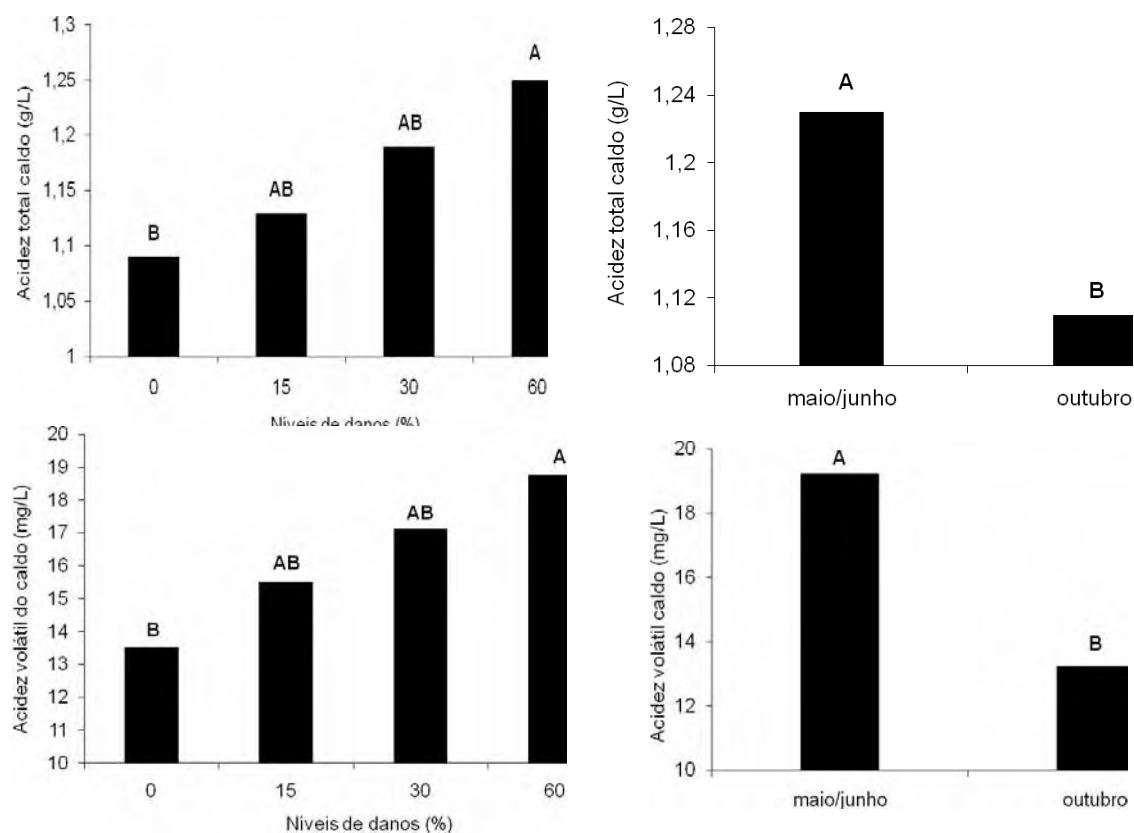


Figura 06: Teores de acidez total e volátil do caldo nos diferentes níveis de danos causados por *M. fimbriolata* para as duas épocas de avaliação. Médias iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

DINARDO-MIRANDA (2000) e GONÇALVES et al. (2003) observaram acréscimos significativos nos teores de fibra da cana quando os danos causados e a infestação de cigarrinhas eram maiores. Esse aumento resulta em perda da qualidade da matéria-prima que será processada já que quanto maior a quantidade de fibra menor o teor de caldo presente no colmo.

Em relação à umidade da cana não houve diferença significativa entre os tratamentos avaliados. Somente em função das épocas observou-se que na segunda época a umidade foi significativamente menor que a primeira (Tabela 05, Figura 07) principalmente em função da maturação dos colmos após passar por um período de estresse hídrico. A grandeza dos danos provocados pela cigarrinha-das-raízes varia

com diversos fatores, entre os quais se destaca a época de colheita da cultura e a variedade cultivada (DINARDO-MIRANDA, 2008a).

Tabela 05. Valores médios para umidade e fibra da cana.

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

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
ns = não significativo; * = significativo ao nível de 5%; ** = significativo ao nível de 1%;

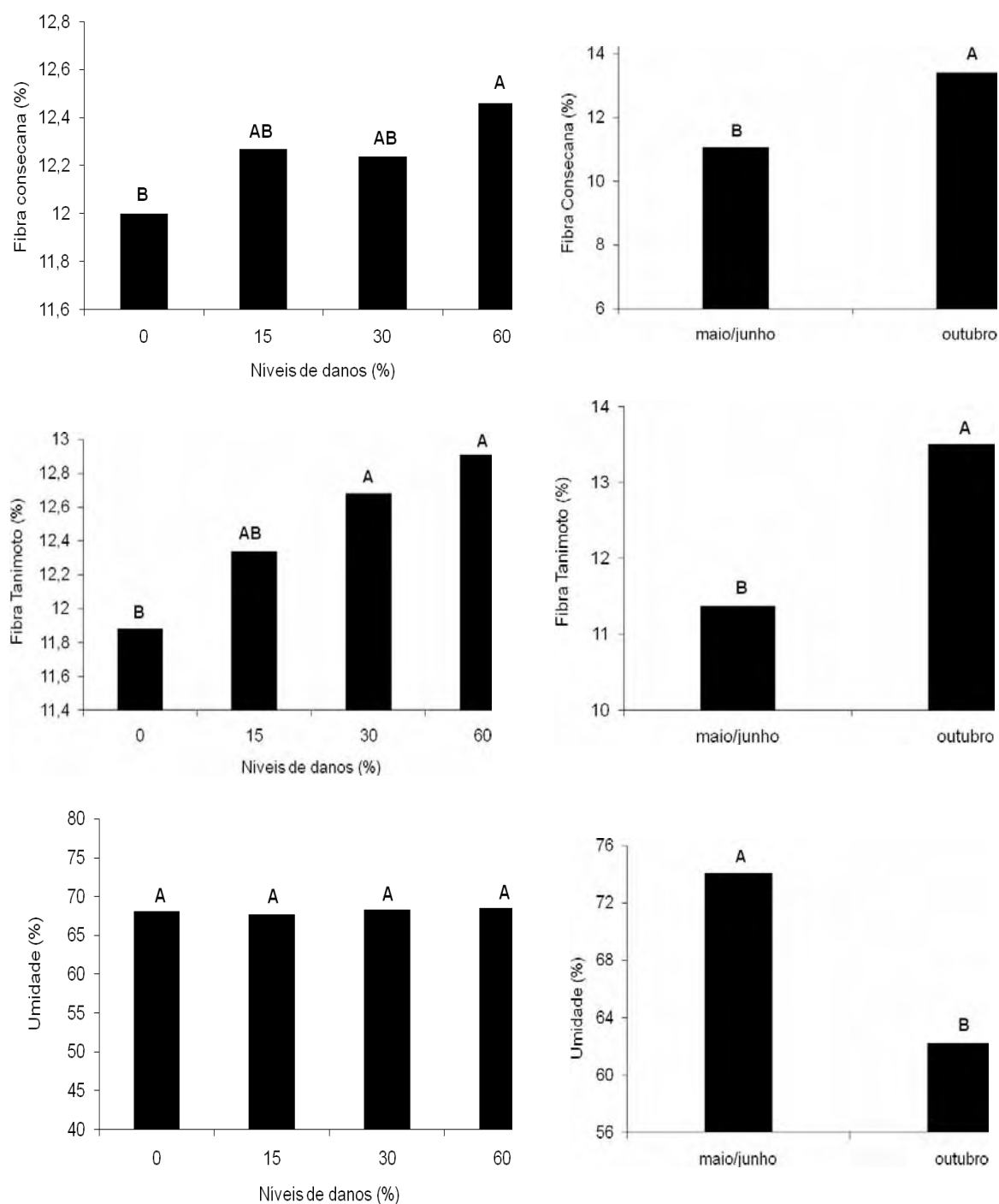


Figura 07: Valores de fibra e umidade para os diferentes níveis de danos causados por *M. fimbriolata* para as duas épocas de avaliação. Médias iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

4.2 Avaliações microbiológicas do mosto e condução da fermentação

O monitoramento da fermentação foi realizado através das análises microbiológicas avaliando-se as viabilidades celulares no início e final do processo, observou-se resultados significativos para os parâmetros estudados. A viabilidade celular inicial e final da fermentação foi significativamente afetada pelos danos causados por *M. fimbriolata* (Tabela 06, Figuras 08). Verificou-se que com 15% de danos a viabilidade celular inicial reduziu em 13,32% e a final foi de 14,75%.

Observou-se significativa redução da viabilidade celular inicial e final quando se analisou a reutilização do fermento nos ciclos (Tabela 06, Figura 08). O estresse acumulado pela levedura, provocado pela presença das biomoléculas, tais como compostos fenólicos, ácidos e contaminantes (AMORIM et al., 1996) promoveram alterações metabólicas inibindo o processo fermentativo que apresentaram resultados significativamente maiores quando a planta apresentava danos da praga.

Os metabólitos indesejáveis da matéria-prima e compostos tóxicos produzidos durante o processo fermentativo podem acumular-se no fermento, resultando em perdas de viabilidade e redução na eficiência industrial (OKOLO et al., 1987).

Com a avaliação prévia da viabilidade celular do fermento que foi inoculado no processo verificou-se que o número de células de leveduras adicionadas ao mosto foi praticamente o mesmo nas duas épocas, da ordem de 10^8 células/mL e a viabilidade inicial do inóculo era 98% nas duas épocas de avaliação. Observou-se que na em outubro (Tabela 06, Figura 08) as viabilidades celulares tanto iniciais quanto finais foram maiores em relação à primeira época, provavelmente devido ao estado da matéria-prima que se encontrava em melhores condições de maturação. O prejuízo causado na planta pela praga alterou a qualidade da matéria-prima, como visto anteriormente, afetando o mosto utilizado para fermentação.

Tabela 06. Valores médios para viabilidade celular (%) no início e final do processo fermentativo.

Causas de variação	Viabilidade Celular Inicial	Viabilidade Celular Final
	%	
Níveis de danos (A)		
0%	71,08 A	67,65 A
15%	57,76 B	52,90 B
30%	61,04 B	55,28 B
60%	49,36 C	43,04 C
F	19,28 **	44,58 **
DMS (Tukey)	7,64	5,66
Ciclos (B)		
1	86,46 A	79,2 A
4	52,51 BC	44,86 B
7	46,14 C	48,27 B
10	54,14 B	46,53 B
F	78,28 **	116,81 **
DMS (Tukey)	7,64	5,66
Épocas (C)		
maio/junho	55,4 B	48,49 B
outubro	64,23 A	60,94 A
F	18,63 **	67,48 **
DMS (Tukey)	4,09	3,03
A x B	0,30 ^{ns}	2,26 *
A x C	0,45 ^{ns}	3,71 *
B x C	10,33 **	25,97 **
A xB x C	0,78 ^{ns}	0,82 ^{ns}
CV	16,75	13,57

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
 ns = não significativo; * = significativo ao nível de 5%; ** = significativo ao nível de 1%;

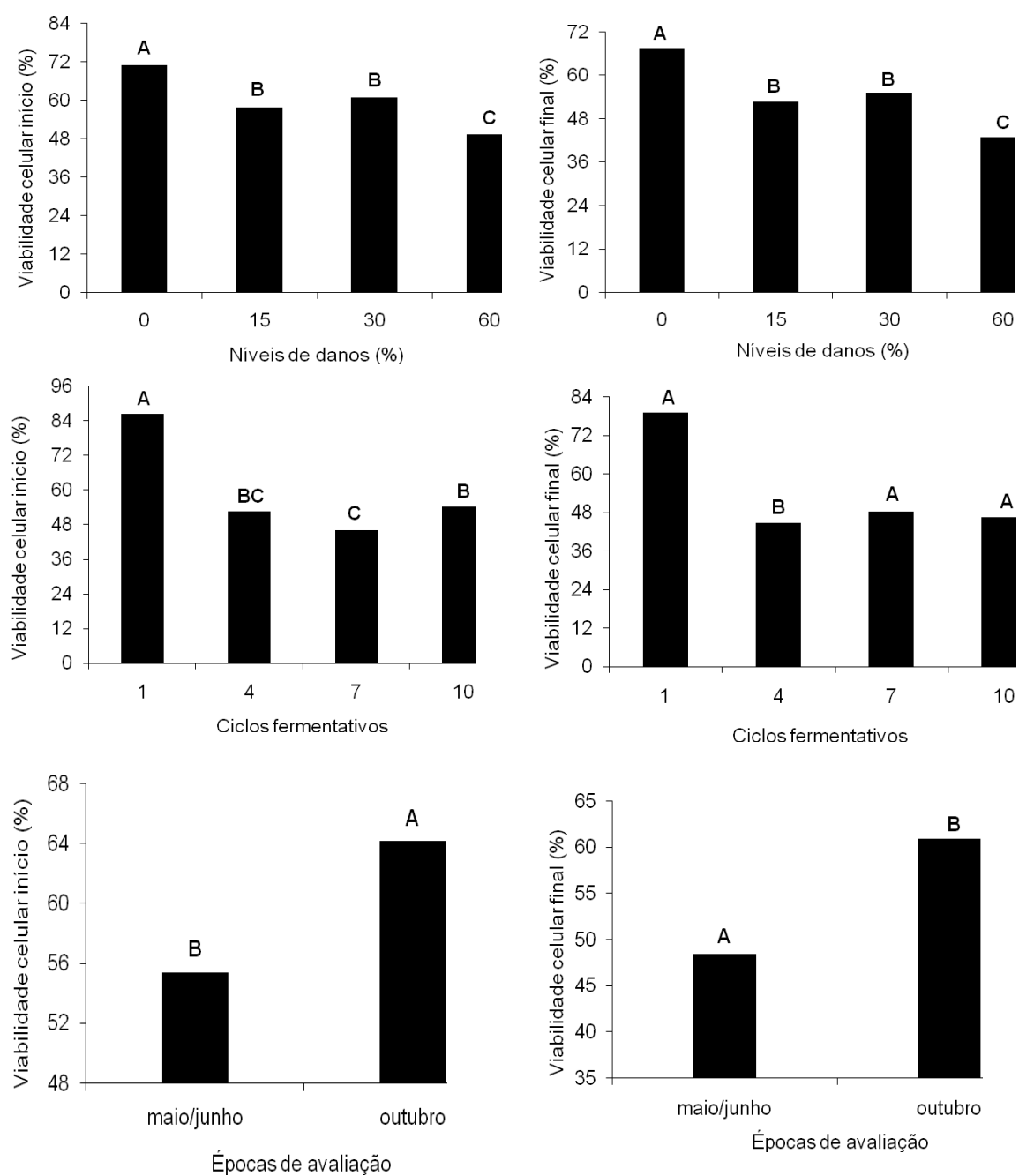


Figura 08: Viabilidade Celular de leveduras no início e final da fermentação: níveis de danos, ciclos fermentativos e épocas. Médias iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

Ao final da fermentação os valores da viabilidade de células foram menores do que no início (Tabela 06) já que no começo de uma fermentação há maior disponibilidade de nutrientes e substrato (GONÇALVES, 2003). Com o decorrer do processo ocorre o esgotamento natural dos açúcares do meio, redução dos nutrientes e acúmulo de metabólitos produzidos pelos microrganismos, além do efeito negativo da concentração elevada de etanol sobre as leveduras (MUTTON, 1998).

Houve interação significativa da viabilidade inicial e final entre os ciclos fermentativos e as épocas de avaliação (Figura 09). Observou-se que no 7º e 10º ciclos apresentaram maior porcentagem de células viáveis na segunda época de avaliação tanto para viabilidade inicial quanto final. Com relação aos níveis de danos e épocas também houve interação significativa (Figura 10) para viabilidade celular final, no qual a segunda época foi melhor que a primeira. Pode-se dizer que quando a levedura está apresentando características de esgotamento a boa qualidade da matéria-prima influencia na sua sobrevivência.

Observando-se a interação significativa entre ciclos e danos (Figura 10) verifica-se que a viabilidade final das células de levedura decresce quanto maiores forem os danos causados pela cigarrinha-das-raízes, ou seja, os 4º, 7º e 10º ciclos apresentam menores viabilidades com o aumento dos níveis de danos.

Com o aumento dos níveis de danos houve significativa redução nas viabilidades iniciais e finais de brotos (Tabela 07, Figura 11), resultados também observados para viabilidade celular. Os compostos fenólicos inibem a brotação das leveduras, resultando em queda da viabilidade celular e de brotos dificultando o reaproveitamento das células (MUTTON, 2008). Na presente pesquisa observou-se aumento desses compostos à medida que se elevou o nível de danos, como também a reutilização do fermento nos ciclos subseqüentes foi prejudicada de acordo com os valores obtidos para as viabilidades de brotos.

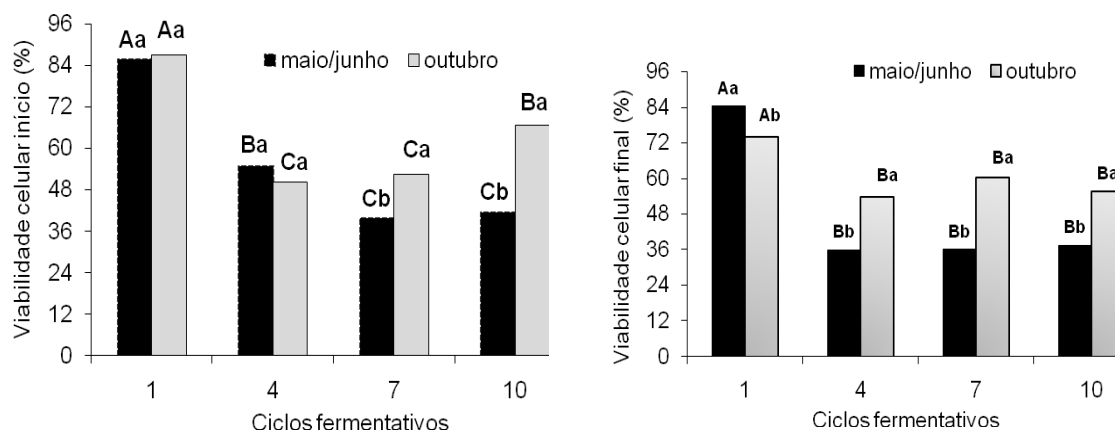


Figura 9: Interações entre ciclos e épocas para viabilidade celular de leveduras no início e final da fermentação. Letras maiúsculas comparam médias dentro dos ciclos e letras minúsculas comparam entre épocas (Tukey P=0,05).

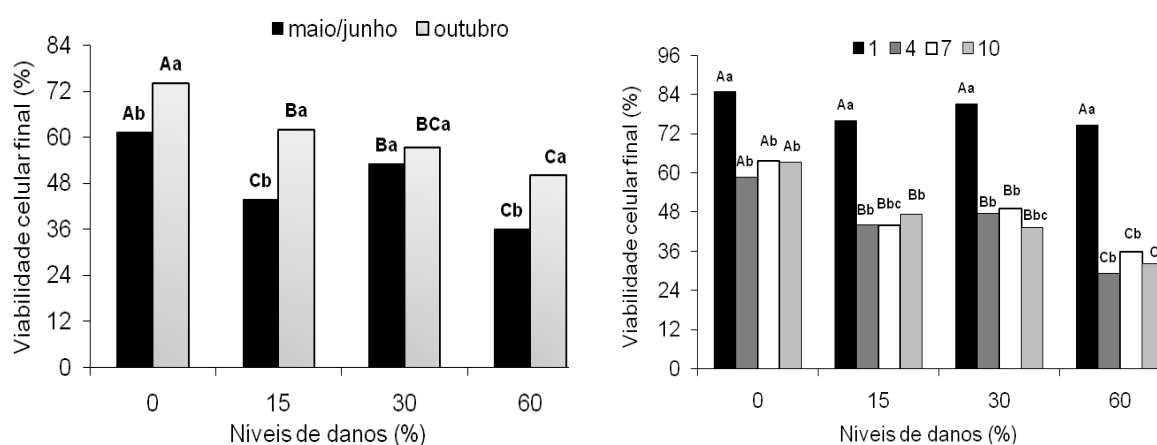


Figura 10: Interações entre danos e épocas e interações entre danos e ciclos para viabilidade celular de leveduras no final da fermentação. Letras maiúsculas comparam médias dentro de danos e letras minúsculas comparam entre épocas e ciclos (Tukey P=0,05).

No decorrer dos ciclos as viabilidades foram reduzidas possivelmente pela composição do meio em que se encontrava a levedura no final da fermentação. OKOLO et al. (1987) observaram que o monitoramento da porcentagem de células e

brotos viáveis durante a fermentação é extremamente necessário, pois metabólitos indesejáveis da matéria-prima ou compostos tóxicos produzidos durante o processo fermentativo podem acumular-se no meio, interferindo direta ou indiretamente na fisiologia das leveduras promovendo perdas de viabilidade e reduzindo a eficiência industrial.

Tabela 07. Valores médios para viabilidade de brotos de leveduras no início e final do processo fermentativo.

Causas de variação	Viabilidade de Brotos Inicial	Viabilidade de Brotos Final
	%	
Níveis de danos (A)		
0%	75,97 A	66,84 A
15%	59,57 B	45,32 B
30%	62,36 B	47,16 B
60%	44,94 C	39,68 B
F	17,14 **	22,32 **
DMS (Tukey)	11,48	9,35
Ciclos (B)		
1	83,68 A	58,43 A
4	50,46 B	48,54 B
7	56,56 B	47,45 B
10	52,13 B	44,57 B
F	25,53 **	5,79 **
DMS (Tukey)	11,48	9,35
Épocas (C)		
maio/junho	58,81 A	45,09 B
outubro	62,6 A	54,40 A
F	1,52 ^{ns}	13,80 **
DMS (Tukey)	6,14	
A x B	0,90 ^{ns}	1,45 ^{ns}
A x C	1,08 ^{ns}	2,04 ^{ns}
B x C	3,71 *	10,66 **
A x B x C	1,60 ^{ns}	2,01 ^{ns}
CV	24,8	24,66

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo; * = significativo ao nível de 5%; ** = significativo ao nível de 1%;

Letras maiúsculas comparam médias nas colunas dentro de cada tratamento.

Ressalta-se que ao final de cada ciclo o fermento era tratado para posterior reutilização, conforme descrito na metodologia. Buscava-se recuperar com isso os índices de viabilidade celular e de brotos no início de cada processo, através da redução da competição do fermento com contaminantes que cresceram no mosto utilizado anteriormente ao novo ciclo.

Como observado na viabilidade celular a qualidade da matéria-prima em relação ao estado de maturação da cana para a colheita também influenciou na viabilidade final de brotos que foi significativamente maior coleta de outubro (Tabela 07, Figura 11).

As interações entre ciclos fermentativos e épocas avaliadas foram significativas para viabilidades de brotos no início e final da fermentação demonstrando que da mesma forma que para as viabilidades celulares a matéria-prima em melhor condição de maturação afetou a viabilidade de brotos da levedura no decorrer da reutilização (Tabela 07, Figura 12).

Observando-se os valores do índice de brotamentos nota-se que houve redução desses em função do ataque da *M. fimbriolata* que comprometeu a matéria-prima, tanto para o início quanto para o final da fermentação (Tabela 08 e Figura 13).

Com relação aos ciclos fermentativos nota-se o aumento do índice de brotamentos paralelamente ao aumento dos ciclos fermentativos (Tabela 08 e Figura 13). Isto pode ser em decorrência da redução das viabilidades de células e de brotos celulares, de modo que a levedura aumenta o índice de brotamento à medida que suas células morrem.

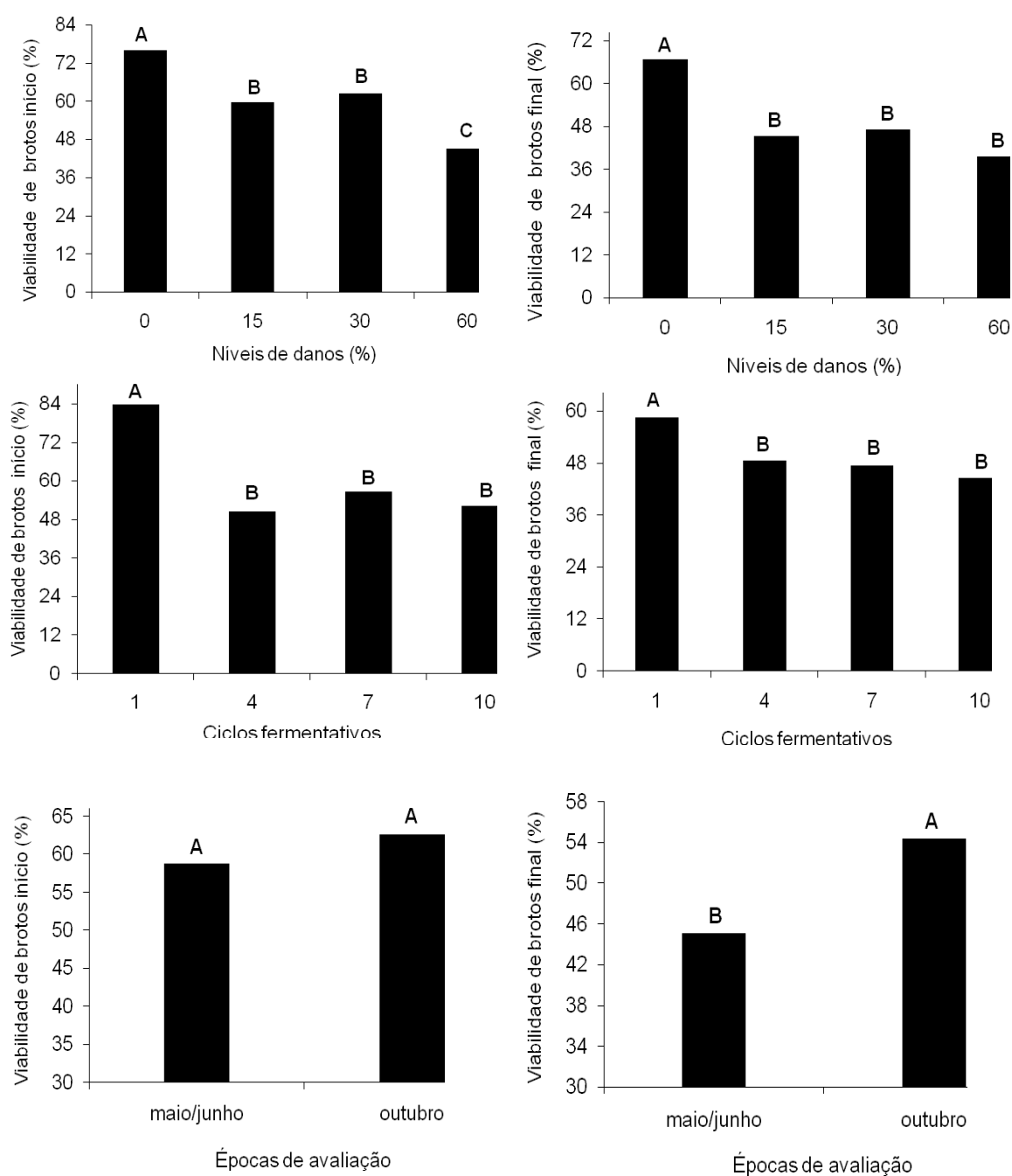


Figura 11: Viabilidade de brotos de leveduras no início e final da fermentação: níveis de danos, ciclos fermentativos e épocas. Médias iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

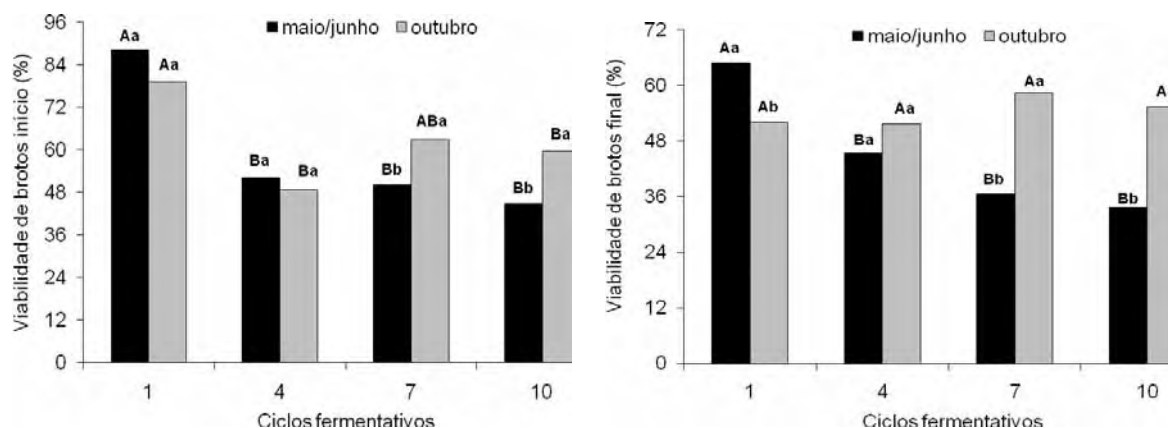


Figura 12: Interações entre ciclos e épocas para viabilidade de brotos de leveduras no início e final da fermentação. Letras maiúsculas comparam médias dentro dos ciclos e letras minúsculas comparam entre épocas (TUKEY P=0,05).

Considerando-se que as leveduras são reutilizadas em ciclos fermentativos posteriores, é de extrema importância a manutenção de células e brotos viáveis de leveduras ao final da fermentação. Em estudos semelhantes realizados anteriormente RAVANELI et al. (2006) observaram a redução das viabilidades com o aumento da infestação de ninfas.

Em relação às épocas avaliadas um maior índice de brotamentos foi observado na segunda época (Tabela 08 e Figura 13), quando a matéria-prima estava em melhor estado de maturação com o caldo apresentando maiores quantidades de açúcares conseqüentemente com melhor condição para o desempenho das células de leveduras.

Tabela 08. Valores médios índices de brotamentos no início e final do processo fermentativo.

Causas de variação	Brotamento Inicial	Brotamento Final
	%	
Níveis de danos (A)		
0%	18,32 A	18,62 A
15%	15,32 AB	14,95 AB
30%	17,25 AB	15,55 AB
60%	12,79 B	12,26 B
F	3,49 **	5,17 **
DMS (Tukey)	4,86	4,28
Ciclos (B)		
1	11,95 C	7,44 B
4	16,82 AB	16,38 A
7	13,88 BC	18,79 A
10	21,03 A	18,77 A
F	9,24 **	22,08 **
DMS (Tukey)	4,86	4,28
Épocas (C)		
maio/junho	14,63 A	12,47 B
outubro	17,21 A	18,23 A
F	2,62 ^{ns}	25,17 **
DMS (Tukey)	2,71	2,29
A x B	0,97 ^{ns}	1,08 ^{ns}
A x C	1,27 ^{ns}	0,97 ^{ns}
B x C	1,27 ^{ns}	2,73 ^{ns}
A x B x C	1,12 ^{ns}	1,08 ^{ns}
CV	42,21	36,62

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
 ns = não significativo; * = significativo ao nível de 5%; ** = significativo ao nível de 1%;

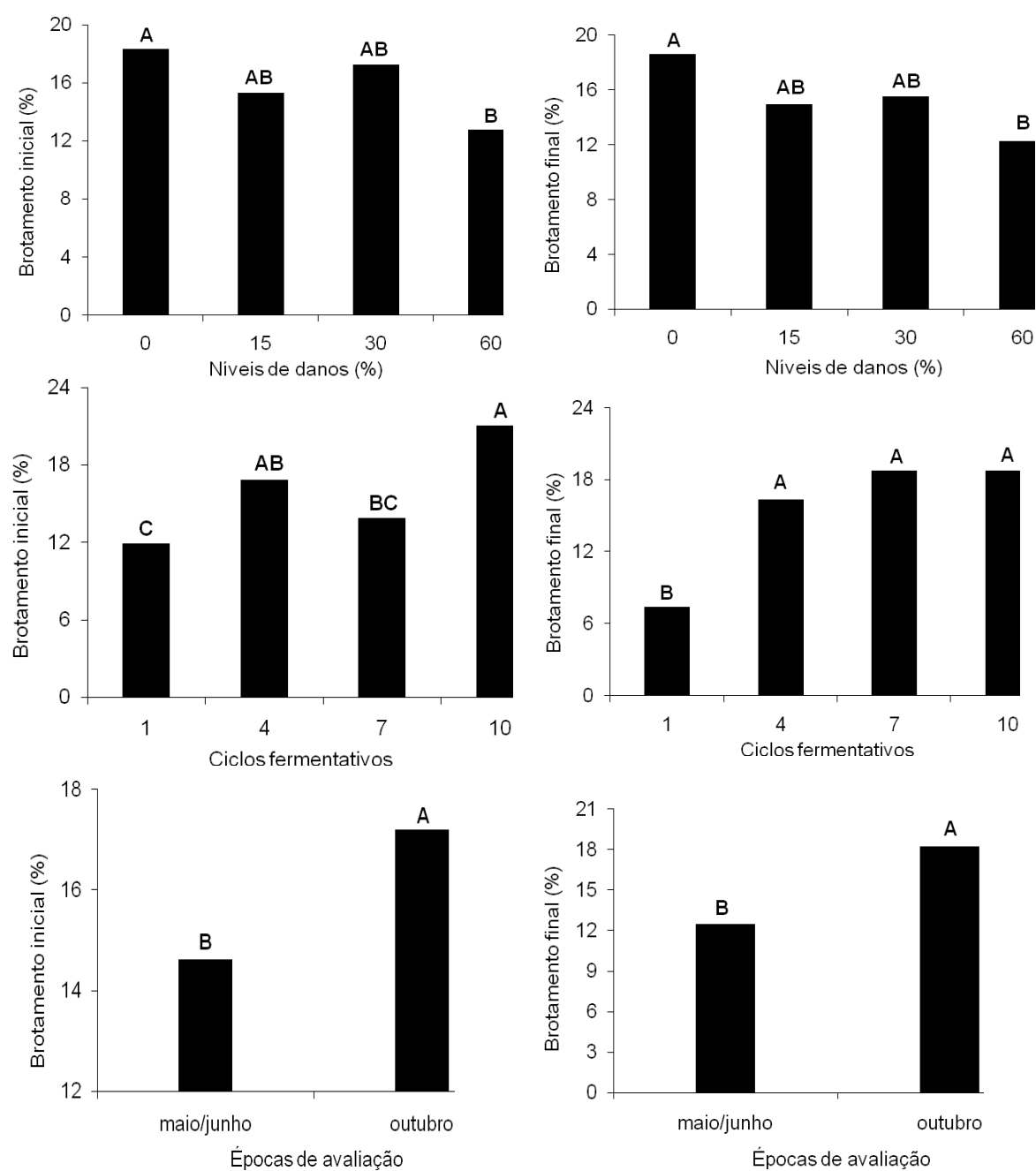


Figura 13. Índice de brotamentos de leveduras no início e final da fermentação: níveis de danos, ciclos fermentativos e épocas. Médias iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

A concentração de bactérias na fermentação aumentou com os níveis de danos nos colmos, tanto no início quanto no final da fermentação (Tabela 09, Figura 14). Quando se reduz a viabilidade da levedura, aumentam os riscos de contaminação durante os ciclos fermentativos, de modo que, com a morte das células libera vitaminas e aminoácidos, que podem servir como nutrientes para as bactérias (AMORIM et al., 2005). Os maiores prejuízos causados pela contaminação bacteriana são a degradação da sacarose e a formação de ácidos que ocasionam perda de açúcar e intoxicação das leveduras (OLIVA-NETO & YOKOYA, 1997). Neste trabalho foi possível observar o aumento da acidez total em relação à matéria-prima atacada pela praga (Tabela04).

Ao longo dos ciclos observou-se aumento significativo da contaminação bacteriana no início e final do processo fermentativo (Tabela 09, Figura 14). O aumento dessa concentração e a presença dos metabólitos produzidos favorecem e facilitam o comprometimento da levedura como foi observado quando se avaliou a viabilidade da levedura, verificando-se a redução em função do aumento dos ciclos.

O meio no qual o fermento se encontra, ao final de uma fermentação, é bastante agressivo do ponto de vista físico, químico e biológico, provocando seu enfraquecimento e, em certo grau a morte de milhares de células antes do início da próxima rodada do processo (NOVAES, 1992).

Não houve diferença significativa entre a primeira e segunda época de avaliação com relação à concentração de bactérias presente na fermentação (Tabela 09, Figura 14). Em outubro a matéria-prima apresentou menores níveis de acidez volátil, o que corresponde ao resultado da ação dos contaminantes.

No tratamento com colmos sadios (0% de danos) a concentração de bactérias era praticamente igual para início e final do processo fermentativo. A partir do momento que ocorreu o aumento de danos, verificou-se que essa concentração aumentou nos dois momentos avaliados na fermentação, sendo que no início essa contaminação foi maior, provavelmente porque a matéria-prima já comprometida possuía número de bactérias elevado que durante a fermentação diminuiu devido a redução do pH do mosto e a estabilização das leveduras no processo.

Tabela 09. Valores médios para concentração de bactérias contaminantes no início e final do processo fermentativo.

Causas de variação	Bactérias Inicial	Bactérias Final
	%	
Níveis de danos (A)		
0%	1,6133 B	1,6126 B
15%	1,6267 AB	1,6209 AB
30%	1,6266 AB	1,6202 AB
60%	1,6333 A	1,6341 A
F	5,48 **	5,45 **
DMS (Tukey)	0,0135	0,0143
Ciclos (B)		
1	1,6165 B	1,6196 AB
4	1,6247 AB	1,6190 AB
7	1,6219 B	1,6165 B
10	1,6380 A	1,6327 A
F	6,52 **	3,64 *
DMS (Tukey)	0,0135	0,0143
Épocas (C)		
maio/junho	1,6231 A	1,6205 A
outubro	1,6270 A	1,6235 A
F	1,15 ^{ns}	0,625 ^{ns}
DMS (Tukey)	0,0073	0,034
A x B	1,00 ^{ns}	0,433 ^{ns}
A x C	0,653 ^{ns}	2,01 ^{ns}
B x C	1,60 ^{ns}	5,69 **
A x B x C	0,464 ^{ns}	0,64 ^{ns}
CV	1,094	1,153

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo; * = significativo ao nível de 5%; ** = significativo ao nível de 1%;

Entretanto, a estabilização não se sobrepôs aos problemas trazidos com o aumento dos danos, como observado o que ocorreu com os demais parâmetros avaliados anteriormente. A não realização do controle de pragas possibilita o desenvolvimento de número mais elevado de contaminantes, provocando perdas de

açúcares através da formação de ácidos e outros metabólitos inibidores das leveduras fermentadoras (MUTTON, 2008).

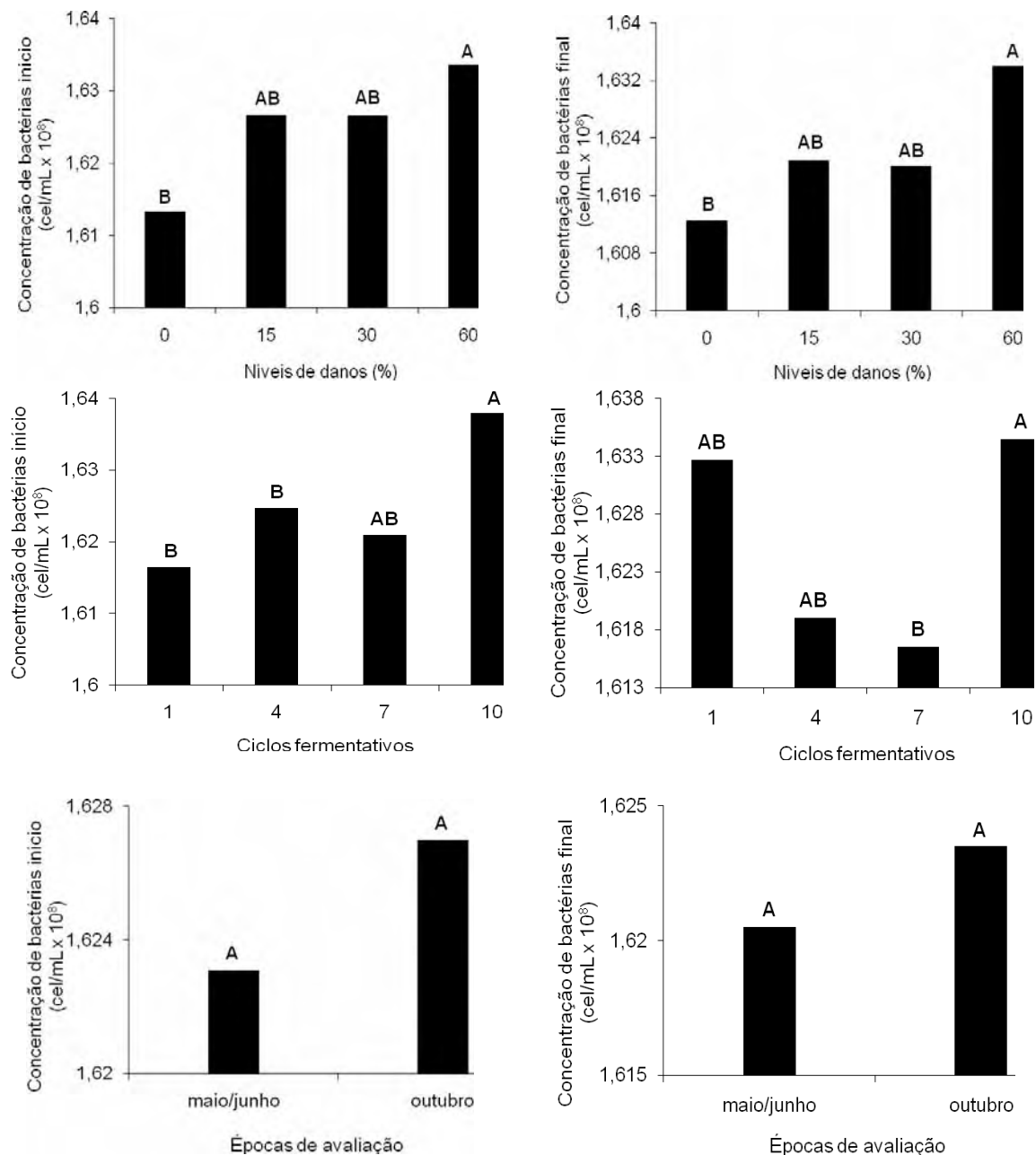


Figura 14. Concentração de bactérias contaminantes no início e final da fermentação: níveis de danos, ciclos fermentativos e épocas. Médias iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

Com os dados da interação significativa de ciclos fermentativos e épocas de avaliação (Tabela 09, Figura 15), verificou-se que na primeira época houve aumento do número de contaminantes do primeiro ao último ciclo diferentemente da segunda época a qual notou-se pequena redução em relação ao aumento dos ciclos que pode estar associada à matéria-prima resultante da segunda época estar mais apta para o processo da fermentação, proporcionando melhores condições para estabilização da levedura e possivelmente menores quantidades de bactérias contaminantes.

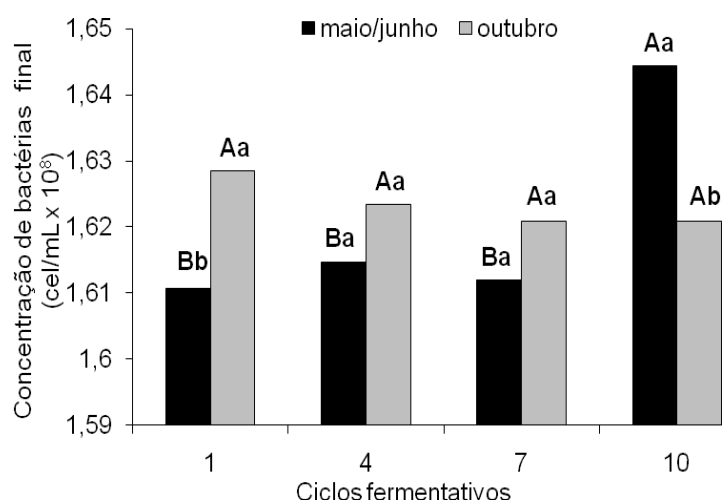


Figura 15. Interações entre ciclos e épocas para concentração de bactérias contaminantes no início e final da fermentação. Letras maiúsculas comparam médias dentro dos ciclos e letras minúsculas comparam entre épocas (Tukey P=0,05).

Observando-se os microrganismos presentes no caldo e mosto, através da inoculação destes nos meios de cultura PCA, WLN e MSR (Quadro 01 do Apêndice), verificou-se a presença dos contaminantes da ordem de 10^6 , índice limite de contaminação considerado elevado (AMORIM et al., 2005), além disso, o aumento da porcentagem de danos causados pela cigarrinha-das-raízes não aumentou o número de colônias de microrganismos presentes no caldo e no mosto na primeira e segunda época.

Uma vez que o tratamento do fermento com ácido sulfúrico é de suma importância para reduzir a contaminação bacteriana, GALLO & CANHOS, (1991) realizaram estudo que comprovam que o tratamento ácido do fermento, não só impediu a continuidade do aumento do número de bactérias, como reduziu em aproximadamente 45% a população bacteriana. Na clarificação o tratamento com cal e temperatura adequada reduzem substancialmente a contagem microbiana (YOKOYA, 1991).

Avaliando-se a microbiota presente nas fermentações, verificou-se que não houve aumento do número de colônias em relação aos diferentes tratamentos e ciclos fermentativos (Quadro 02 do Apêndice), além disso, não é possível notar diferenças entre as épocas de avaliação. Considerando-se que um índice aceitável de contaminação varia da ordem de 10^5 , 10^6 a contaminação por bactérias lácticas apresenta-se limitante para o processo. Da mesma forma, quando se observa o número de colônias de leveduras que se apresenta em torno de 10^{10} , nota-se uma otimização da fermentação mesmo apresentando contaminação relativamente alta. Deve-se lembrar que além do fermento prensado inoculado, o caldo é rico em microrganismos dentre estes, as leveduras provenientes da contaminação.

Quando se avaliou o tempo médio de fermentação nas duas épocas, não foi possível notar um aumento deste em relação aos níveis de danos, somente ao longo dos ciclos fermentativos, houve uma tendência de aumento no tempo de fermentação (Quadro 03 do Apêndice), além disso, os valores finais de Brix do vinho são maiores com o aumento dos ciclos e tendem a ser maiores com o incremento dos danos causados pela praga.

Considerando-se um tempo médio ideal de fermentação em torno de 8 horas (AMORIM et al., 1996), nota-se que o tempo médio de fermentação dos ensaios foi de 15 horas, provavelmente esse fato está ligado à vários fatores como menor viabilidade e concentração de células do inóculo, maior concentração de contaminantes e remoção de nutrientes do mosto (Tabela 15). Essa remoção pode ser em função do arraste pelo processo de clarificação que foi realizado a pH 7,0, o que promove a perda de alguns nutrientes como fósforo, manganês e zinco (AMORIM et al., 2005).

4.3 Análises do vinho

Analisando-se o vinho deleiturado, observou-se que o ataque da praga na matéria-prima não influenciou os valores de pH dos vinhos (Tabela 10, Figura 16), somente apresentou resultados significativos para a análise dos vinhos com relação aos ciclos fermentativos no qual houve redução do pH com aumento dos ciclos. Este fato provavelmente está relacionado com o aumento da concentração de bactérias que ocorreu com a reutilização do fermento e da mesma forma os ácidos produzidos pelas mesmas. Não houve diferenças nos valores de pH com relação às épocas de avaliação, mas a interação de ciclos e épocas foi significativa (Figura 17).

Apesar de a matéria-prima deteriorada apresentar maior presença de ácidos e de contaminações, não houve diferenças para acidez total quanto se avaliou os danos causados pela cigarrinha, os ciclos fermentativos e as épocas de avaliação (Tabela 10, Figura 16).

Com o incremento dos níveis de danos observou-se uma tendência de aumento das quantidades de açúcares redutores residuais totais (ARRT) dos vinhos (Tabela 11, Figura 18) com o aumento dos níveis de danos, além disso, verificou-se que os valores obtidos foram relativamente altos, isso pode ser em função dos problemas com a reduzida viabilidade e alta concentração de contaminantes. Em relação aos ciclos fermentativos verifica-se o aumento significativo do ARRT (Tabela 11, Figura 18), o que pode ser resultante da dificuldade das leveduras para realizar o processo depois de alguns ciclos em função do estresse causado pelos metabólitos presentes no meio, assim como o aumento da acidez e a concentração do etanol.

Na segunda época a cana estava com maiores quantidades de açúcares (ART) resultantes do acúmulo de sacarose através do processo de maturação (Tabela 3). Quando se analisou o ARRT observou-se que este também foi maior na segunda época de colheita (Tabela 11, Figura 18). Nesse período os teores de compostos fenólicos (Tabela 03) e a concentração de bactérias (Tabela 9) eram maiores o que influenciou negativamente o aproveitamento total dos açúcares do meio pelas leveduras.

Tabela 10. Valores médios para pH e Acidez Total dos vinhos.

Causas de variação	pH	Acidez Total
		g/L
Níveis de danos (A)		
0%	3,37 A	2,43 A
15%	3,31 A	2,46 A
30%	3,39 A	2,39 A
60%	3,32 A	2,48 A
F	1,16 ^{ns}	0,05 ^{ns}
DMS (Tukey)	0,119	0,494
Ciclos (B)		
1	3,43 A	2,30 A
4	3,39 A	2,64 A
7	3,34 AB	2,43 A
10	3,22 B	2,35 A
F	7,92 **	2,30 ^{ns}
DMS (Tukey)	0,119	0,494
Épocas (C)		
maio/junho	3,36 A	2,45 A
outubro	3,34 A	2,41 A
F	0,32 ^{ns}	0,07 ^{ns}
DMS (Tukey)	0,064	0,264
A x B	0,25 ^{ns}	1,17 ^{ns}
A x C	0,27 ^{ns}	0,40 ^{ns}
B x C	7,18 **	0,24 ^{ns}
A x B x C	0,37 ^{ns}	0,15 ^{ns}
CV	4,70	26,65

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo; * = significativo ao nível de 5%; ** = significativo ao nível de 1%;

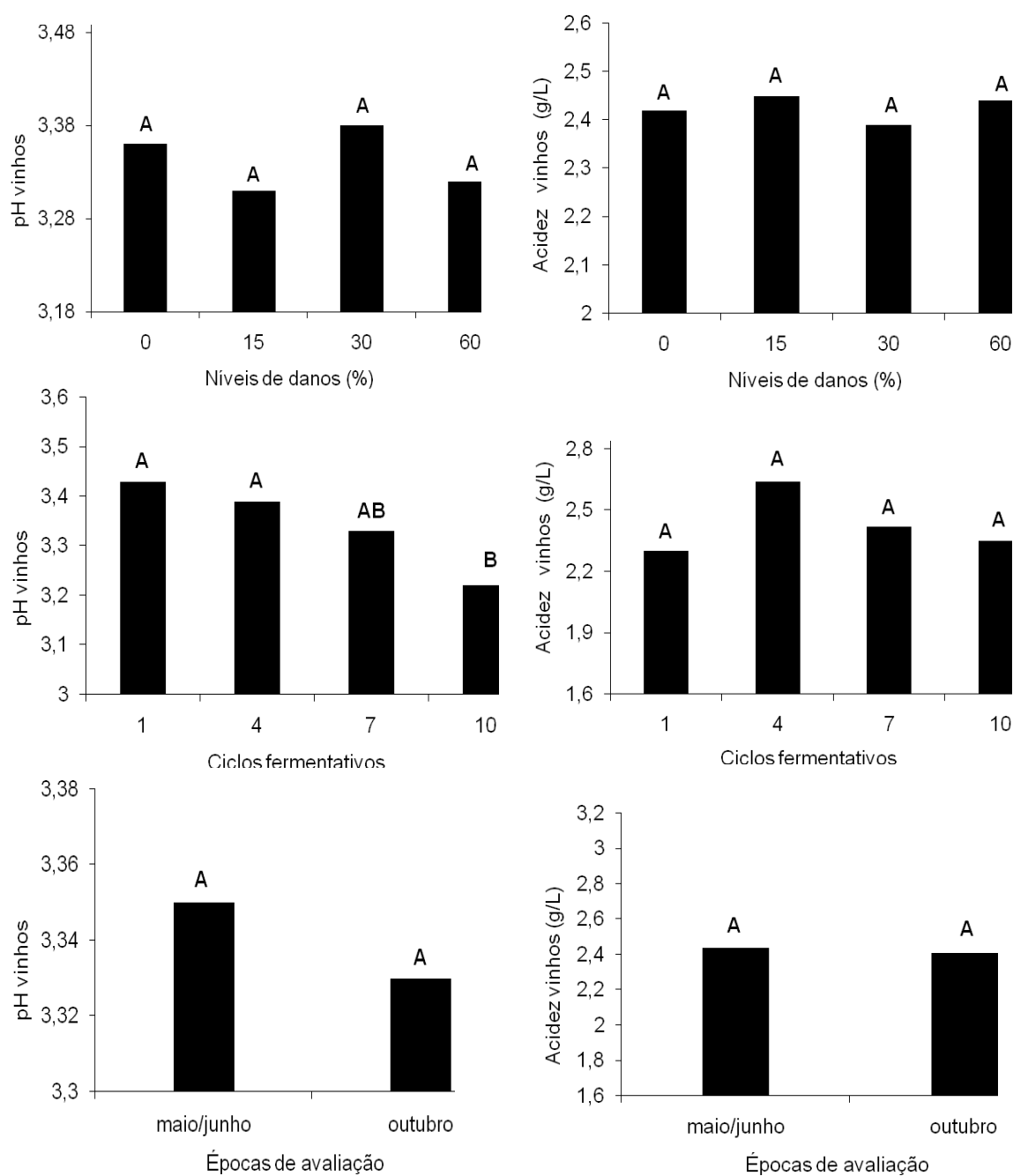


Figura 16. Avaliação do pH e acidez dos vinhos no início e final da fermentação: níveis de danos, ciclos fermentativos e épocas. Médias iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

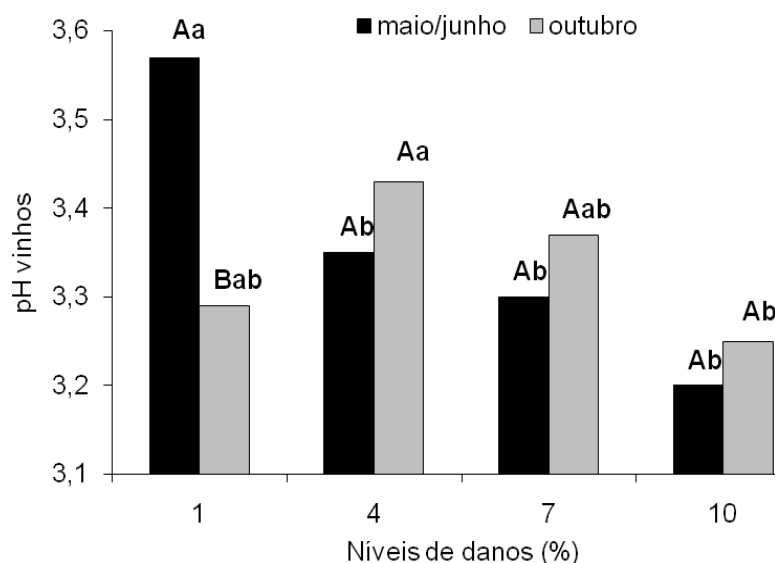


Figura 17. Interações entre ciclos e épocas para pH dos vinhos no início e final da fermentação. Letras maiúsculas comparam médias dentro dos ciclos e letras minúsculas comparam entre épocas (Tukey $P=0,05$).

Analisando-se o teor alcoólico observou-se significativa redução com o aumento dos níveis de danos (Tabela 11, Figura 19) e do mesmo modo a eficiência da fermentação também é menor (Tabela 11, Figura 19), sendo que a *M. fimbriolata* reduziu em 10% a eficiência do processo, fato este que deve ser levado em consideração quando se compara com uma produção industrial de larga escala.

RAVANELI (2005) observou redução no teor alcoólico dos vinhos quando o nível de infestação da praga era superior a 2,5 ninfas/m. Além disso, GONÇALVES (2003) relata que quanto menor o dano promovido melhor é a eficiência da fermentação. Juntamente, os valores de teor alcoólico e a eficiência da fermentação, apresentaram-se menores em decorrência desse estresse ao longo dos ciclos (Tabela 11, Figura 20). A avaliação de épocas conferiu maior teor alcoólico dos vinhos na segunda coleta, porém a eficiência da fermentação foi menor (Tabela 11, Figura 20).

Tabela 11. Valores médios para análises do vinho.

Causas de variação	ARRT	Teor Alcoólico	EF
	%	% v/v	%
Níveis de danos (A)			
0%	1,24 A	6,22 A	70,02 A
15%	1,59 A	5,66 B	62,38 AB
30%	1,32 A	6,11 AB	67,80 BC
60%	1,69 A	5,15 C	59,89 C
F	1,53 ns	16,57 **	9,93 **
DMS (Tukey)	0,641	0,448	5,56
Ciclos (B)			
1	0,55 C	6,13 A	68,68 A
4	1,19 B	6,11 A	69,87 A
7	1,39 B	5,70 A	62,48 B
10	2,41 A	5,20 B	59,06 B
F	19,46 **	13,34 **	11,88 **
DMS (Tukey)	0,641	0,448	5,65
Épocas (C)			
maio/junho	0,92 B	5,59 B	67,01 A
outubro	2,01 A	5,98 A	63,03 B
F	40,03 **	10,50 **	7,16 **
DMS (Tukey)	0,343	0,24	2,97
A x B	1,66 ^{ns}	2,19 *	2,78 *
A x C	0,59 ^{ns}	2,10 ^{ns}	0,71 ^{ns}
B x C	1,17 ^{ns}	1,58 ^{ns}	0,77 ^{ns}
A x B x C	0,92 ^{ns}	1,64 ^{ns}	1,38 ^{ns}
CV	57,66	10,17	11,21

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo; * = significativo ao nível de 5%; ** = significativo ao nível de 1%; ARRT= Açúcares redutores residuais totais.

Houve interação significativa para teor alcoólico e eficiência fermentativa entre os níveis de danos e ciclos fermentativos (Tabela 11, Figura 21) observa-se que quanto maior o ataque da praga, menor foi o desempenho fermentativo da levedura. A matéria-prima deteriorada influenciou negativamente na reutilização do fermento.

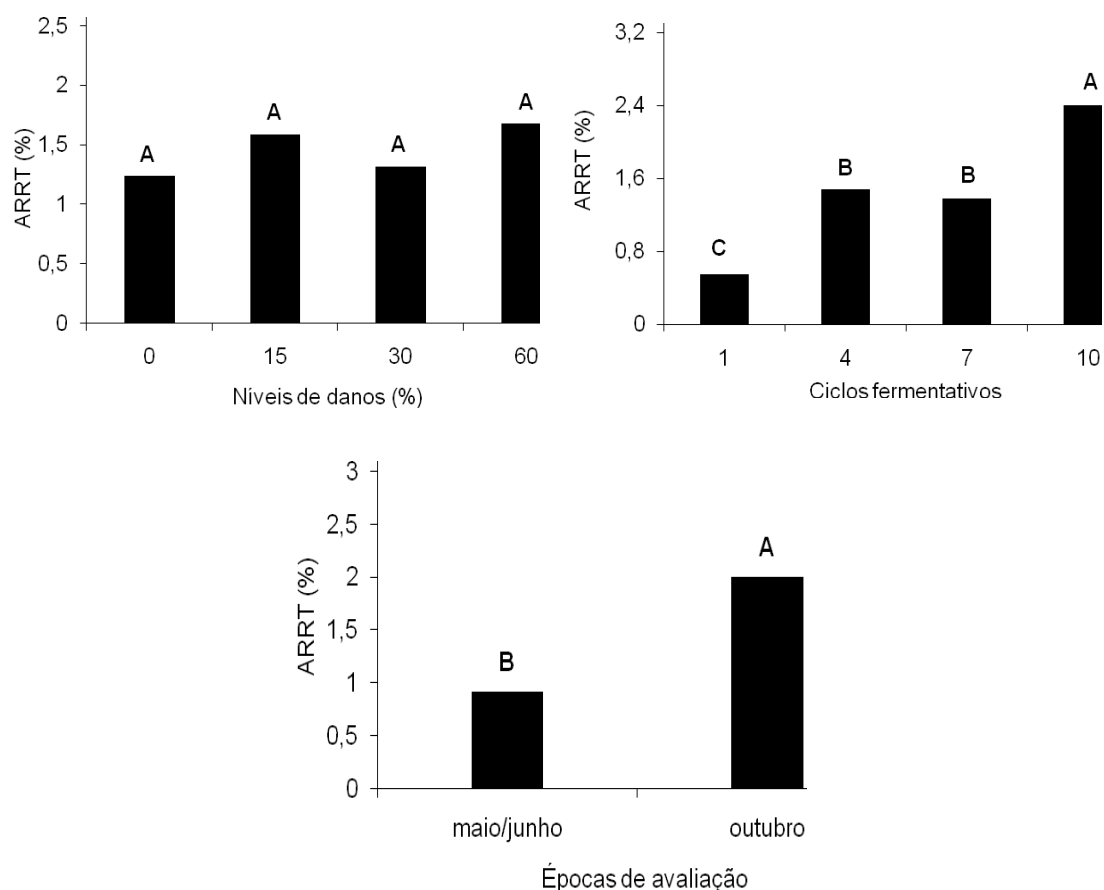


Figura 18. Açúcares redutores residuais totais nos vinhos: níveis de danos, ciclos fermentativos e épocas. Médias iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

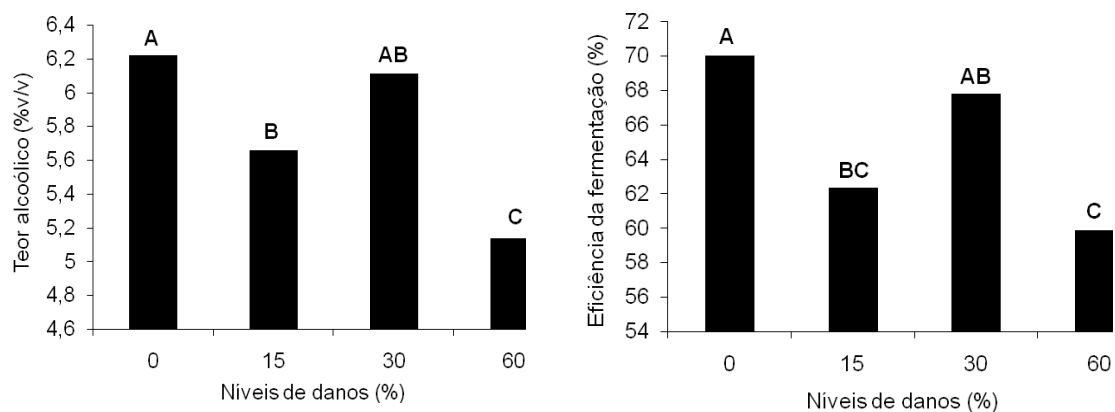


Figura 19. Teor alcoólico e eficiência da fermentação nos vinhos em relação aos níveis de danos. Médias iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

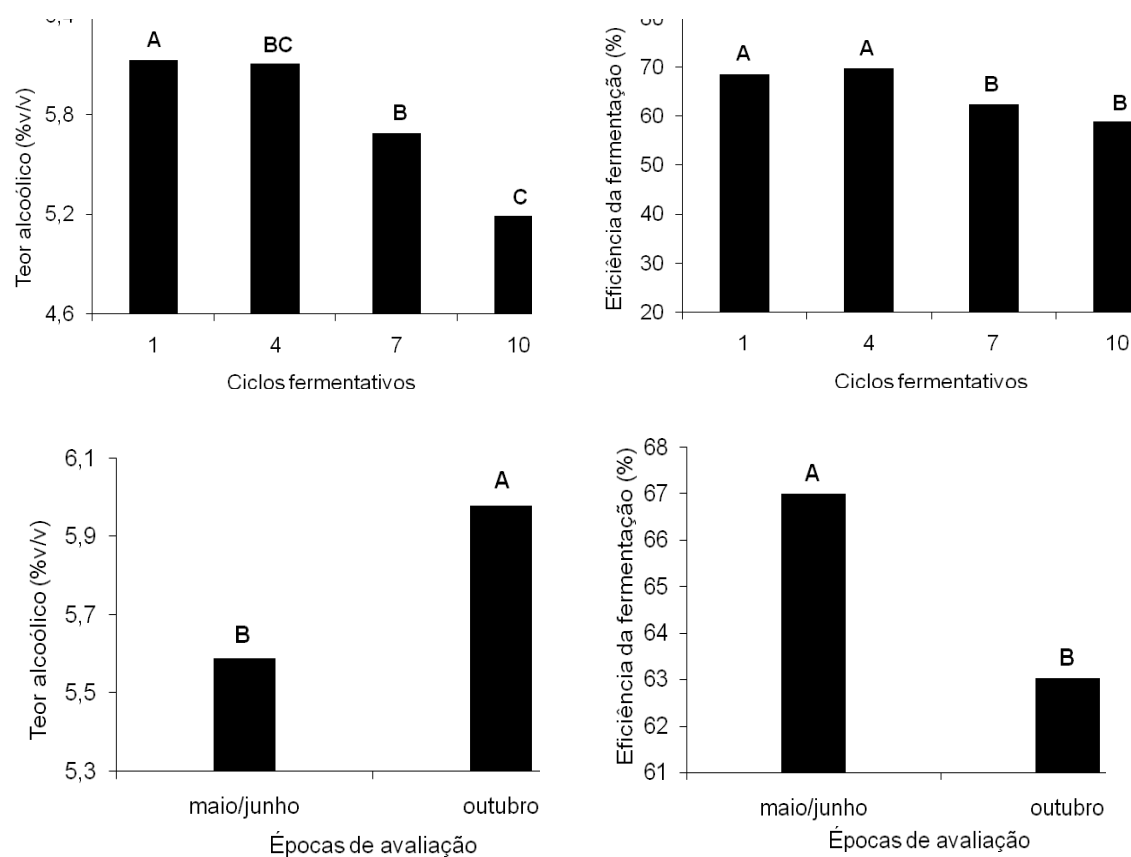


Figura 20. Teor alcoólico e eficiência da fermentação nos vinhos em relação aos ciclos fermentativos e épocas de avaliação. Médias iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

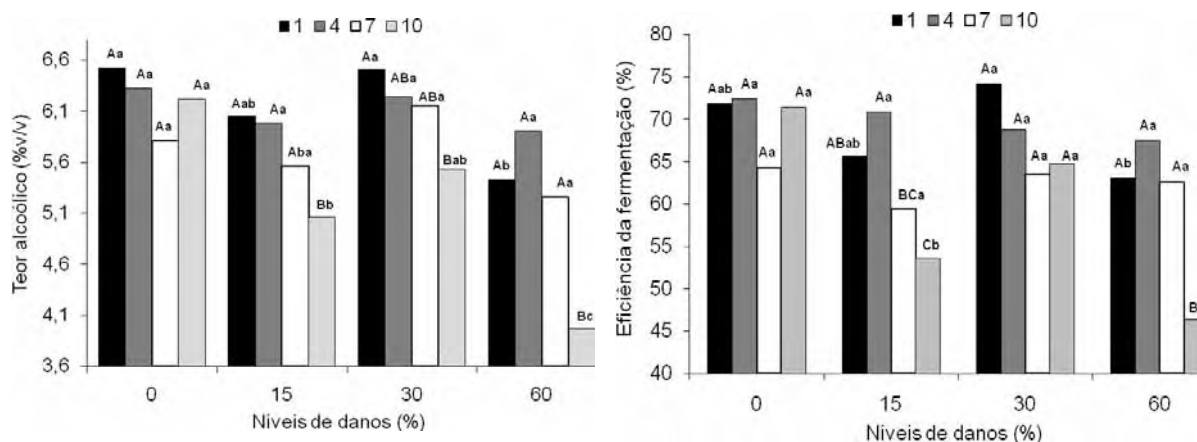


Figura 21. Interações entre danos e ciclos para teor alcoólico e eficiência da fermentação nos vinhos. Letras maiúsculas comparam médias dentro de danos e letras minúsculas comparam entre épocas e ciclos (Tukey P=0,05).

4.4 Compostos secundários – trealose e glicerol

O glicerol é um composto secundário que se forma na mesma via do etanol e é inversamente proporcional à sua produção (AMORIM et al., 1996), portanto o ideal de uma fermentação é a menor produção de glicerol possível. No estudo desenvolvido não houve diferenças significativas para produção de glicerol em relação aos níveis de danos, da mesma forma, para os ciclos fermentativos (Tabela 12, Figura 22). O que se observou foi um aumento deste composto com relação às épocas, com as avaliações realizadas em outubro. De modo semelhante não se observou redução do teor alcoólico do vinho obtido na segunda época (Tabela 12, Figura 22).

Tem-se que a produção de glicerol está relacionada ao tipo de levedura utilizada e ao ambiente de fermentação, além disso, este composto geralmente aparece quando se trabalha com melaço como matéria-prima (AMORIM et al., 2005)

A trealose é um carboidrato de reserva produzido pelas leveduras principalmente em situações de estresses, garantindo reservas para sua sobrevivência (ALCARDE & BASSO, 1997). Quando se analisa os dados em função dos danos, verifica-se que não houve diferenças no acúmulo de trealose em relação aos níveis de comprometimento dos colmos (Tabela 12, Figura 23). Isso sugere que a cigarrinha-das-raízes não induz a

levedura acumular trealose, mas observando-se os valores obtidos com a análise dos ciclos, nota-se que ao longo da reutilização destes a levedura acumula mais trealose tanto no início quanto no final da fermentação (Tabela 12, Figura 23).

Tabela 12. Valores médios para glicerol, trealose no início e final da fermentação.

Causas de variação	Glicerol	Trealose Inicial	Trealose Final
	mg/100mL	mg trealose/mg proteína	
Níveis de danos (A)			
0%	10,98 A	0,91 A	0,35 A
15%	12,50 A	0,89 A	0,28 A
30%	10,42 A	1,18 A	0,27 A
60%	11,22 A	0,95 A	0,41 A
F	2,49 ^{ns}	1,74 ^{ns}	2,95 ^{ns}
DMS (Tukey)	2,082	0,392	0,148
Ciclos (B)			
1	11,06 A	0,59 B	0,16 B
4	11,18 A	1,09 A	0,36 A
7	11,08 A	0,95 AB	0,35 A
10	11,80 A	1,30 A	0,45 A
F	0,40 ^{ns}	8,45 ^{**}	10,91 ^{**}
DMS (Tukey)	2,082	0,392	0,148
Épocas (C)			
maio/junho	10,15 B	1,16 A	0,31 A
outubro	12,41 A	0,81 B	0,35 A
F	16,45 ^{**}	11,82 ^{**}	2,33 ^{ns}
DMS (Tukey)	1,115	0,208	0,078
A x B	0,66 ^{ns}	1,95 ^{ns}	1,23 ^{ns}
A x C	0,29 ^{ns}	0,59 ^{ns}	2,28 ^{ns}
B x C	1,45 ^{ns}	0,62 ^{ns}	0,87 ^{ns}
A x B x C	0,92 ^{ns}	2,26 [*]	1,68 ^{ns}
CV	24,22	41,51	44,46

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo; * = significativo ao nível de 5%; ** = significativo ao nível de 1%;

O estresse causado pela reciclagem do fermento juntamente com os compostos e metabólitos liberados pelos processos, promovem o acúmulo deste carboidrato na célula de levedura. Com relação a épocas, somente se observou resultado significativo

no início da fermentação na qual a primeira época de avaliação apresentou maior quantidade de trealose acumulada (Tabela 12, Figura 23).

Ao final do processo fermentativo observou-se que a quantidade de trealose era menor, pois o meio no qual se encontra a levedura está pobre em substratos, principalmente os açúcares, então esta mobiliza suas reservas (trealose) iniciando a degradação do carboidrato de reserva. Esta degradação é tão maior quanto maior for a temperatura e o teor alcoólico do meio (AMORIM et al., 1996). Estudos avaliando a fermentação endógena de *S. cerevisiae* demonstraram a redução nos valores de trealose quando a levedura foi exposta a meios com altos teores alcoólicos e temperaturas elevadas (FERREIRA et al., 1999)

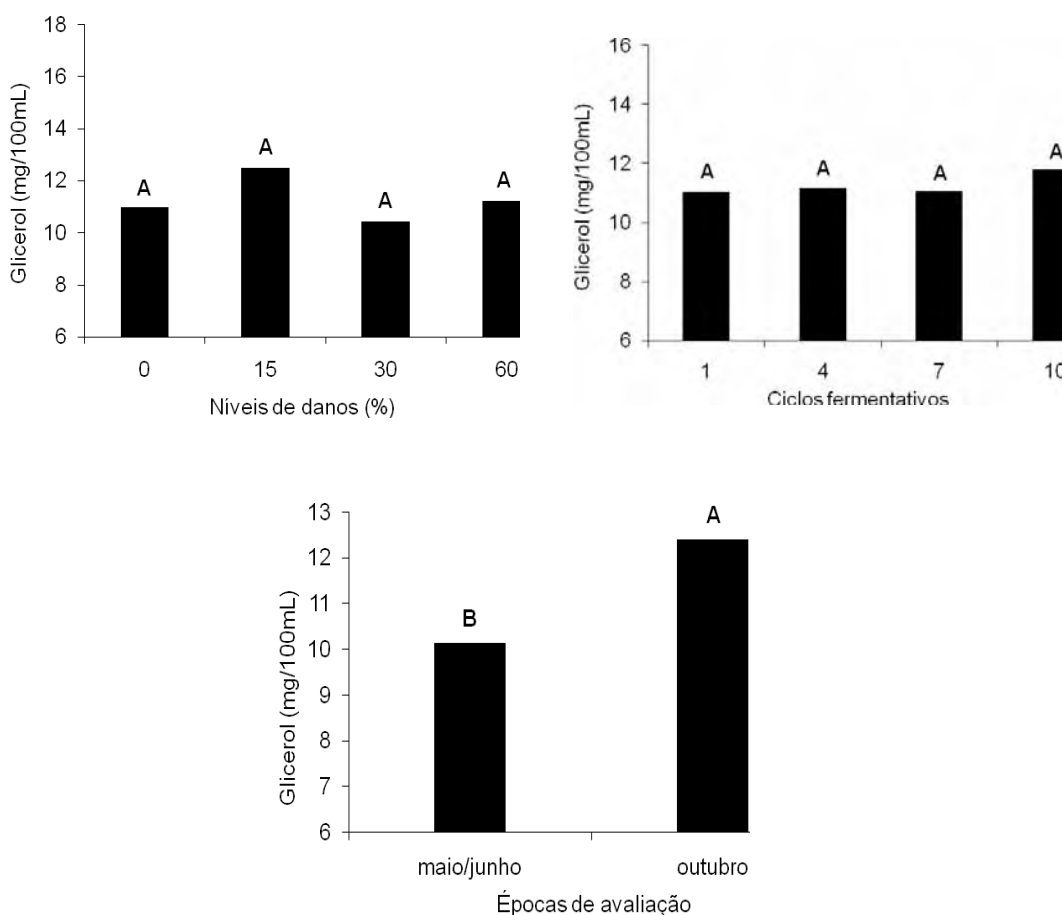


Figura 22. Teores de glicerol nos vinhos: níveis de danos, ciclos fermentativos e épocas. Médias iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

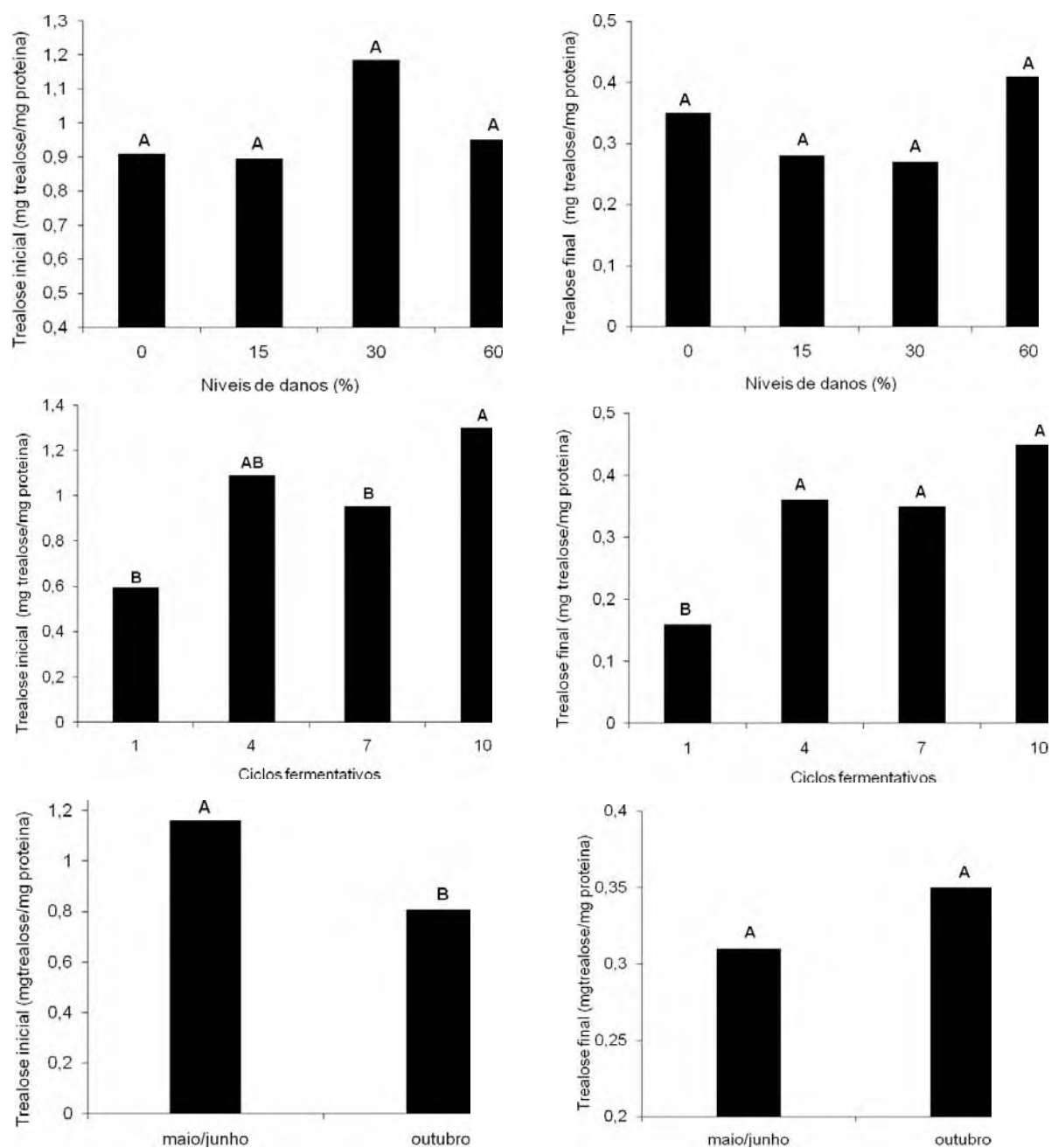


Figura 23. Valores de trealose no início e final da fermentação: níveis de danos, ciclos fermentativos e épocas. Médias iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

4.5 Composição do destilado Final

Analisando-se os dados verifica-se que com 15 % de danos houve aumento na concentração de acetaldeídos (Tabela 13, Figura 24), fato este não observado nos níveis superiores, não existindo, portanto uma correspondência proporcional com o aumento dos danos, desta forma não se pode dizer que o ataque da *M. fimbriolata* afetou a produção de acetaldeídos. Porém quando se aumentou o número de ciclos de reutilização da levedura este valor foi maior. De forma inversa, as quantidades de etanol foram menores com o aumento dos ciclos, visto que o acetaldeído é precursor do etanol (Tabela 13, Figura 24). Verificou-se interação significativa entre níveis de danos e ciclos fermentativos (Tabela 13, Figura 25).

Em relação ao acetato de etila os resultados não foram significativos para nenhum dos parâmetros avaliados (Tabela 13, Figura 24). As avaliações nas duas épocas também não diferiram significativamente em relação ao etanol, acetaldeído e acetato de etila (Tabela 13, Figuras 24 e 26). Observando-se os níveis de danos, verificou-se que quanto maior o comprometimento dos colmos menores foram as quantidades formadas de etanol (Tabela 12, Figura 26).

A produção de etanol pela via fermentativa é acompanhada pela formação de compostos como os alcoóis superiores. A presença destes ácidos no meio fermentativo é indesejável nas destilarias porque dificulta a obtenção do álcool puro (GUTIERREZ, 1993). Estudos anteriores relatam que são diversos os fatores que influenciam a formação de alcoóis superiores como, por exemplo, a espécie e a linhagem da levedura a temperatura e muitas vezes a composição do meio.

Tabela 13. Valores médios para a análise cromatográfica dos

Causas de variação	Acetaldeído	Etanol	Acetato de etila
	mg/L	% v/v	mg/L
Níveis de danos (A)			
0%	121,70 B	22,08 A	49,88 A
15%	241,22 A	20,19 A	50,38 A
30%	128,14 B	18,81 AB	43,60 A
60%	139,74 B	16,50 B	45,52 A
F	7,20 **	5,78 **	0,86 ^{ns}
DMS (Tukey)	78,163	3,646	14,219
Ciclos (B)			
1	166,62 AB	21,17 A	55,90 A
4	97,26 B	19,65 A	44,35 A
7	164,20 AB	18,69 A	42,77 A
10	202,71 A	18,06 A	45,36 A
F	4,41 **	1,91 ^{ns}	2,45 ^{ns}
DMS (Tukey)	78,162	3,646	14,219
Épocas (C)			
maio/junho	176,68 A	19,61 A	45,11 A
outubro	138,73 A	19,18 A	49,08 A
F	3,29 ^{ns}	0,19 ^{ns}	1,08 ^{ns}
DMS (Tukey)	41,836	1,951	7,611
A x B	2,10 *	1,14 ^{ns}	1,27 ^{ns}
A x C	2,52 ^{ns}	0,92 ^{ns}	1,27 ^{ns}
B x C	1,95 ^{ns}	1,16 ^{ns}	2,56 ^{ns}
A x B x C	7,43 **	0,47 ^{ns}	0,58 ^{ns}
CV	65,03	24,67	39,61

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo; * = significativo ao nível de 5%; ** = significativo ao nível de 1%;

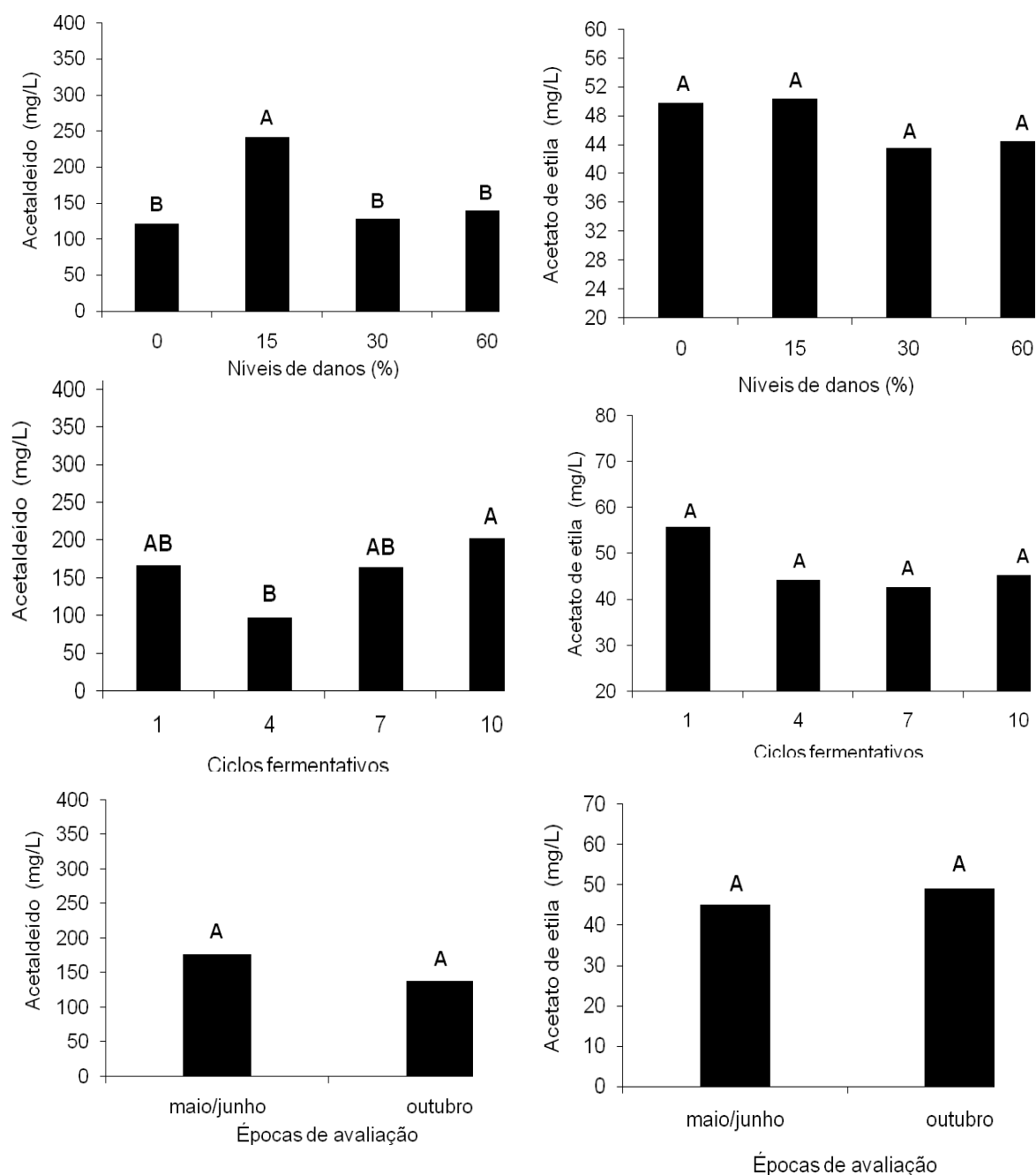


Figura 24. Teores de acetato de etila e acetaldeído no destilado alcoólico: níveis de danos, ciclos fermentativos e épocas. Médias iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

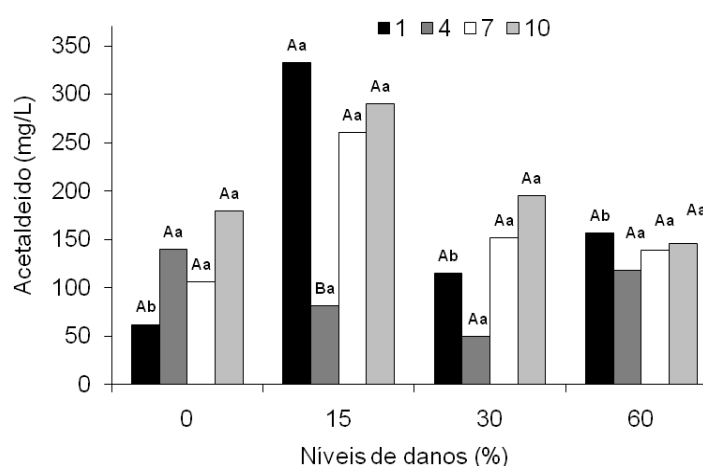


Figura 25. Interação entre danos e ciclos para acetaldeído presente no destilado. Letras maiúsculas comparam médias dentro de danos e letras minúsculas comparam entre ciclos (Tukey P=0,05).

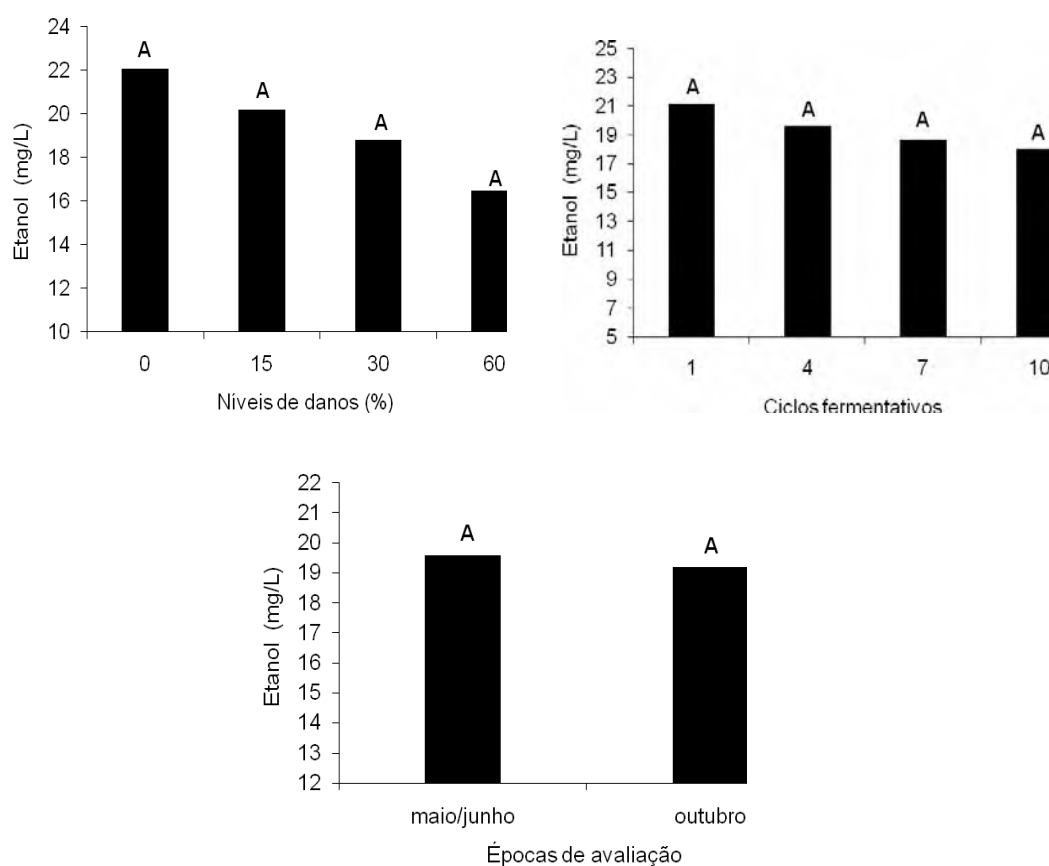


Figura 26. Teores de etanol no destilado: níveis de danos, ciclos fermentativos e épocas. Médias iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (P=0,05).

Observou-se tendência de redução dos álcoois superiores com relação aos danos provocados pela praga apesar de não ter ocorrido diferenças significativas entre estes (Tabela 14). Segundo YOKOYA (1995), a formação de álcoois superiores é maior quando o fermento apresenta atividade fraca ocasionando demora no processo fermentativo, de acordo com os resultados observou-se que com o aumento dos ciclos fermentativos houve redução na formação dos álcoois n-propílico, isobutílico, e isoamílico (Tabela 14, Figura 27 e 28), o tempo de fermentação também foi maior com o aumento dos ciclos.

Tabela 14. Valores médios para a análise cromatográfica dos álcoois n-propílico, isobutílico e isoamílico.

Causas de variação	n-propílico	isobutílico	isoamílico
	mg/L	mg/L	mg/L
Níveis de danos (A)			
0%	47,51 A	112,16 A	256,81 A
15%	51,10 A	120,18 A	244,96 A
30%	46,38 A	107,09 A	241,39 A
60%	42,73 A	105,20 A	218,88 A
F	1,23 ^{ns}	0,77 ^{ns}	0,962 ^{ns}
DMS (Tukey)	11,592	28,383	60,361
Ciclos (B)			
1	57,26 A	159,32 A	316,39 A
4	40,19 B	89,54 B	206,72 B
7	44,73 B	102,12 B	214,44 B
10	45,52 B	93,65 B	224,49 B
F	5,49 **	18,32 **	9,99 **
DMS (Tukey)	11,592	28,383	60,361
Épocas (C)			
maio/junho	50,22 A	119,43 A	261,26 A
outubro	43,63 B	102,88 B	219,76 B
F	4,50 *	4,74 *	6,59 *
DMS (Tukey)	6,204	15,192	32,307
A x B	1,01 ^{ns}	1,46 ^{ns}	0,82 ^{ns}
A x C	0,51 ^{ns}	2,69 ^{ns}	1,26 ^{ns}
B x C	0,71 ^{ns}	2,23 ^{ns}	2,22 ^{ns}
A x B x C	0,81 ^{ns}	0,70 ^{ns}	0,66 ^{ns}
CV (%)	32,41	33,5	32,93

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo; * = significativo ao nível de 5%; ** = significativo ao nível de 1%;

Também foram significativos os valores desses em relação às épocas avaliadas, na qual foi maior a formação dos alcoóis na primeira coleta (Tabela 14, Figura 27 e 28), embora de forma contrária, GUTIERREZ (1993) tenha observado que em maiores concentrações de açúcares a levedura de panificação (Fleischmann) produziu maiores quantidades de álcool isobutílico. Neste trabalho, a matéria-prima resultante da segunda avaliação tinha maiores quantidades de açúcares, mas produziu menores quantidades de alcoóis superiores.

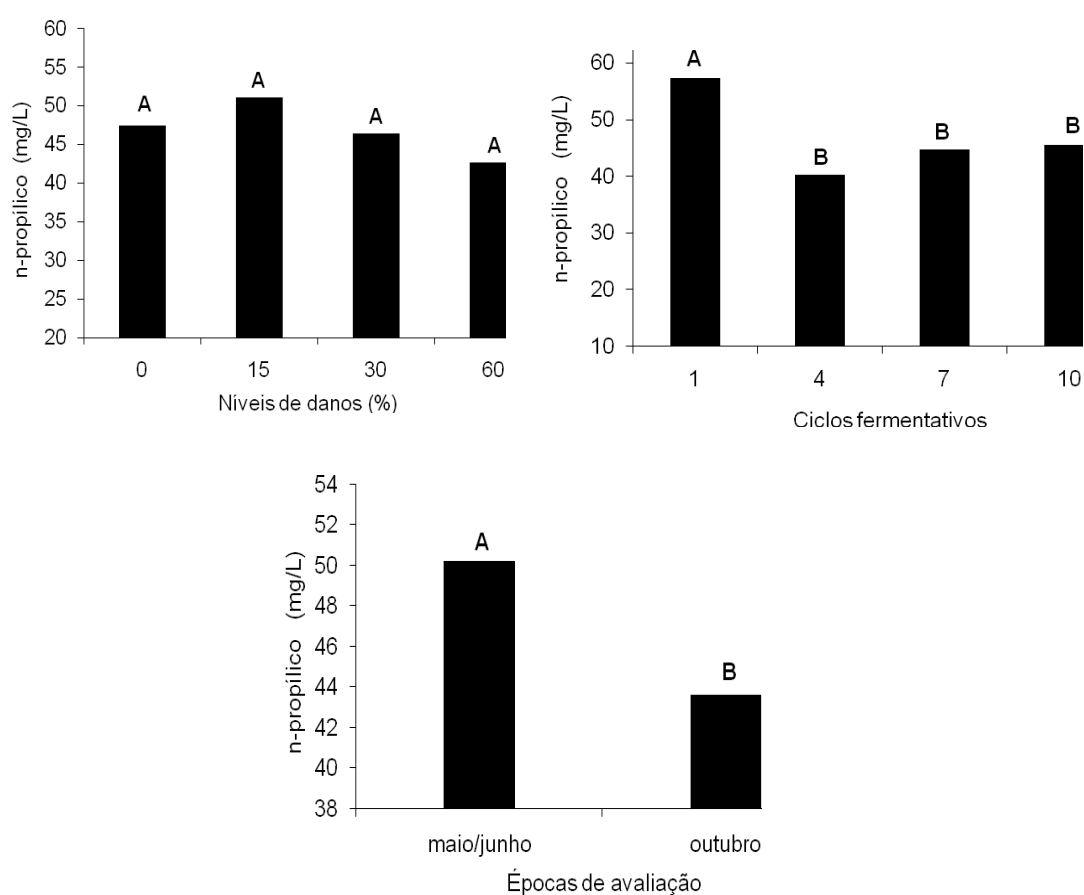


Figura 27. Teores de n-propílico no destilado: níveis de danos, ciclos fermentativos e épocas. Médias iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

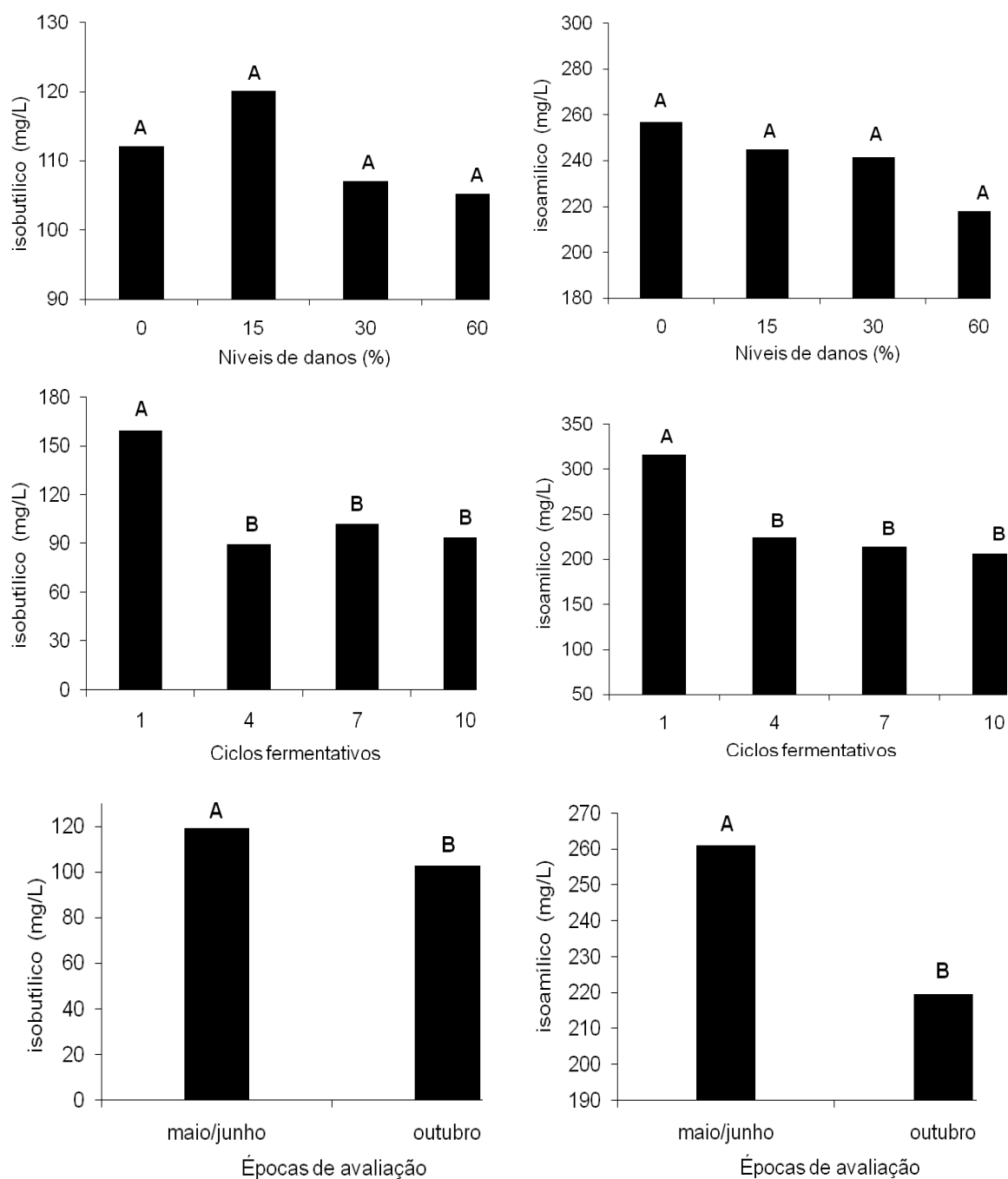


Figura 28. Teores de isobutílico e isoamílico no destilado em relação aos níveis de danos, ciclos fermentativos e épocas avaliadas. Médias iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

4.6 Avaliação dos nutrientes

Estudos realizados por GARCIA et al. (2007) relataram que as ninfas da *M. fimbriolata* sugam as raízes da cana-de-açúcar afetando o xilema e o floema da planta. A análise dos resultados indicou que neste estudo o ataque da praga estudada não interferiu significativamente, nas quantidades de nutrientes absorvidos pela planta presentes na massa seca, no caldo e no mosto (Tabelas 15, 16 e 17).

Um fator importante que deve ser destacado é que para o experimento avaliado não foram realizadas pesagens dos feixes montados para compor os tratamentos antes de serem conduzidos à extração do caldo. Com a comparação das quantidades de nutrientes presentes na massa seca com o peso total dos feixes de colmos seria encontrar resultados diferentes em relação a este parâmetro avaliado. Sendo assim recomenda-se que seja determinado o peso em próximos ensaios.

Avaliando-se os resultados em função da quantidade exportada para a fermentação, nota-se que os valores obtidos dos nutrientes são diferentes em cada análise. Os nutrientes presentes na matéria seca (Tabela 15) não participaram do processo fermentativo pois estavam presentes em maiores quantidades na massa seca não podendo ser aproveitados pelas leveduras nos substrato. Notando-se grande parte do fósforo, potássio, magnésio, cálcio, manganês, ferro e zinco contidos na massa seca, apenas o nitrogênio e o enxofre foram exportados em maiores quantidades para o caldo.

Logo após a extração, o caldo obtido foi clarificado com a finalidade de remover impurezas, contudo, nota-se que esse processo removeu também alguns dos nutrientes (Tabelas 16 e 17). Observa-se que nitrogênio, fósforo, manganês, ferro e zinco apresentaram menores quantidades no mosto. Enquanto o potássio, enxofre, magnésio e cálcio aumentaram seus valores, visto que, utilizou-se hidróxido de cálcio na forma de leite de cal para a clarificação, com a função de corrigir o pH, e este reagente possui na composição alguns interferentes como magnésio e sais alcalinos, o que provavelmente pode ter sido a causa do aumento desses nutrientes no mosto. O aumento do enxofre

ocorreu possivelmente, devido ao uso do ácido sulfúrico para reduzir o pH a 3,5 funcionando como inibidor dos contaminantes.

Com a clarificação os valores de fósforo manganês e zinco no mosto utilizado para a fermentação estavam abaixo do recomendado na literatura. STUPIELLO & HORI, 1981 e AMORIM et al. (2005) recomendam valores entre 125 a 150 ppm de P_2O_5 de fósforo e de 1 a 5 mg/L de manganês e zinco no mosto. De acordo com a metodologia adotada foi adicionado ao caldo 300 mg/L de fósforo na forma de ácido fosfórico. Em seguida realizou-se a correção do pH para 7,0 para com posterior clarificação.

Estudando-se mais profundamente a literatura observou-se que ao se utilizar o pH 7,0 para decantação, que é o pH utilizado para fabricação de açúcar, perde-se nutrientes importantes como fósforo, manganês e zinco (AMORIM et al., 2005). Neste estudo foi possível observar a clareza desses resultados, ou seja, como se utilizou pH 7,0 houve a remoção dos nutrientes em relação ao caldo, como observado na Tabela 15.

Este resultado reforça estudos anteriormente realizados e não compromete o objetivo do trabalho apresentado, pois foram mantidas as mesmas condições de clarificação e processamento para todos os tratamentos, não comprometendo os resultados obtidos com relação ao ataque da praga.

Em função da maturação observou-se que a quantidade de nutrientes na segunda época de avaliação foi significativamente menor (Tabelas 15, 16 e 17). A planta na primeira época estava em fase de crescimento e desenvolvimento de células e tecidos absorvendo grandes quantidades de água e nutrientes.

Na segunda época de amostragem as quantidades de nutrientes na planta foram menos. A cana-de-açúcar apresentava-se no pico da maturação, após período de estresse hídrico, o qual a quantidade de água no solo é reduzida conseqüentemente a taxa de absorção de água e nutrientes. Os elementos minerais estão relacionados ao desenvolvimento vegetativo e florescimento da planta (CASAGRANDE, 1991).

Tabela 15. Valores médios dos nutrientes presentes no mosto utilizado para a fermentação.

Causas de variação	Mosto								
	N	P	K	S	Mg	Ca	Mn	Fe	Zn
	g/L	mg/L	g/L	g/L	g/L	g/L	mg/L	mg/L	mg/L
Níveis de danos (A)									
0%	0,292 A	30,261 A	1,613 A	0,490 A	0,156 A	0,295 A	0,233 A	0,904 A	0,250 A
15%	0,286 A	25,628 A	1,478 A	0,510 A	0,149 A	0,266 A	0,233 A	1,050 A	0,235 A
30%	0,288 A	29,264 A	1,775 A	0,498 A	0,160 A	0,315 A	0,263 A	1,228 A	0,245 A
60%	0,283 A	28,844 A	1,7812 A	0,512 A	0,167 A	0,319 A	0,283 A	1,352 A	0,298 A
F	0,159 ^{ns}	0,985 ^{ns}	2,210 ^{ns}	0,135 ^{ns}	0,391 ^{ns}	1,846 ^{ns}	1,325 ^{ns}	1,429 ^{ns}	0,825 ^{ns}
DMS (Tukey)	0,036	7,488	0,362	0,104	0,043	0,066	0,078	0,615	0,115
Épocas (B)									
maio/junho	0,311 A	40,621 A	2,261 A	0,517 A	0,151 A	0,329 A	0,252 A	1,299 A	0,295 A
outubro	0,264 B	16,378 B	1,064 B	0,489 A	0,166 A	0,268 B	0,254 A	0,967 B	0,219 B
F	24,468**	144,112 **	149,912 **	0,912 ^{ns}	1,778 ^{ns}	12,116 **	0,012 ^{ns}	4,073 *	5,973 *
DMS (Tukey)	0,191	1,014	0,194	0,056	0,023	0,035	0,042	0,329	0,062
A x B	0,759 ^{ns}	1,040 ^{ns}	0,130 ^{ns}	0,848 ^{ns}	1,644 ^{ns}	1,877 ^{ns}	0,691 ^{ns}	0,323 ^{ns}	1,168 ^{ns}
CV (%)	16,362	34,714	28,814	27,413	36,179	29,051	40,802	61,627	59,317

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo; * = significativo ao nível de 5%; ** = significativo ao nível de 1%;

Tabela 16. Valores médios dos nutrientes presentes no caldo extraído.

Causas de variação	Caldo								
	N	P	K	S	Mg	Ca	Mn	Fe	Zn
	g/L	mg/L	g/L	g/L	g/L	g/L	mg/L	mg/L	mg/L
Níveis de danos (A)									
0%	0,648 A	37,896 A	1,263 A	0,132 A	0,1379 A	0,108 A	3,172 A	14,429 A	0,712 A
15%	0,714 A	33,321 A	1,047 A	0,132 A	0,114 A	0,092 A	3,004 A	13,558 A	0,701 A
30%	0,687 A	36,751 A	1,321 A	0,144 A	0,146 A	0,106 A	3,229 A	15,062 A	0,720 A
60%	0,6960A	35,922 A	1,407 A	0,150 A	0,152 A	0,120 A	3,150 A	16,779 A	0,795 A
F	1,929 ^{ns}	0,308 ^{ns}	1,219 ^{ns}	0,451 ^{ns}	1,152 ^{ns}	0,799 ^{ns}	0,114 ^{ns}	0,348 ^{ns}	0,526 ^{ns}
DMS (Tukey)	0,074	12,975	0,515	0,049	0,057	0,047	1,053	8,555	0,221
Épocas (B)									
maio/junho	0,569 A	48,902 A	1,819 A	0,159 A	0,168 A	0,118 A	2,933 A	20,312 A	0,773 A
outubro	0,803 B	23,042 B	0,701 B	0,120 B	0,106 B	0,095 A	3,344 A	9,602 B	0,692 A
F	136,535 **	54,613 **	64,873 **	8,672 **	16,236 **	3,272 ^{ns}	2,093 ^{ns}	21,548 **	1,860 ^{ns}
DMS (Tukey)	0,039	6,955	0,276	0,026	0,031	0,025	0,564	4,586	0,118
A x B	0,342 ^{ns}	0,883 ^{ns}	0,455 ^{ns}	0,348 ^{ns}	0,458 ^{ns}	0,026 ^{ns}	0,189 ^{ns}	0,216 ^{ns}	1,569 ^{ns}
CV (%)	14,257	47,654	54,019	46,596	54,853	58,775	44,346	75,571	39,855

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo; * = significativo ao nível de 5%; ** = significativo ao nível de 1%;

Tabela 17. Valores médios dos nutrientes presentes no na massa seca da cana.

Causas de variação	Massa seca								
	N	P	K	S	Mg	Ca	Mn	Fe	Zn
	mg/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Níveis de danos (A)									
0%	7,114 A	0,987 A	6,437 A	0,070 A	0,727 A	0,798 A	24,125 A	226,250 A	3,722 A
15%	6,812 A	0,958 A	6,598 A	0,0712 A	0,754 A	0,832 A	23,501 A	217,708 A	4,083 A
30%	7,198 A	0,978 A	7,108 A	0,074 A	0,821 A	0,895 A	24,887 A	197,375 A	4,001 A
60%	6,857 A	0,973 A	7,617 A	0,087 A	0,899 A	1,024 A	25,916 A	232,292 A	5,258 A
F	1,446 ^{ns}	0,095 ^{ns}	1,499 ^{ns}	2,876 ^{ns}	2,150 ^{ns}	2,522 ^{ns}	0,444 ^{ns}	0,472 ^{ns}	2,554 ^{ns}
DMS (Tukey)	0,585	0,148	1,622	0,017	0,194	0,232	5,794	82,27	1,576
Épocas (B)									
maio/junho	7,3544A	1,227 A	10,253 A	0,090 A	0,942 A	1,072 A	24,083 A	253,771 A	4,844 A
outubro	6,636 B	0,721B	3,624 B	0,061 B	0,658 B	0,702 B	25,132 A	183,042 B	3,687 B
F	20,683 ^{**}	158,558 ^{**}	229,70 ^{**}	38,181 ^{**}	29,410 ^{**}	34,621 ^{**}	0,449 ^{ns}	10,163 ^{**}	7,406 ^{**}
DMS (Tukey)	0,314	0,079	0,869	0,009	0,104	0,125	3,105	44,097	0,845
A x B	0,443 ^{ns}	0,547 ^{ns}	0,438 ^{ns}	0,161 ^{ns}	0,399 ^{ns}	0,434 ^{ns}	0,245 ^{ns}	0,717 ^{ns}	1,780 ^{ns}
CV (%)	11,051	20,195	30,885	30,423	32,051	34,634	31,109	49,765	48,817

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo; * = significativo ao nível de 5%; ** = significativo ao nível de 1%;

V. CONCLUSÕES

- Os danos promovidos por *Mahanarva fimbriolata* afetam negativamente a qualidade da cana em proporção gradativa à medida que aumenta o nível de dano;
- A matéria-prima danificada possui maior quantidade de contaminantes e maiores teores de compostos fenólicos que interferem e prejudicam a fermentação;
- A praga altera o metabolismo da planta que produz compostos para se defender, a presença destes metabolitos reduzem a viabilidade das leveduras, o teor alcoólico dos vinhos e a eficiência da fermentação.
- A levedura não acumulou trealose em função dos danos ocasionados pela cigarrinha-das-raízes, somente quando houve a reutilização do fermento.

VI. REFERÊNCIAS

- ALCARDE, A. R.; BASSO, L. C.; Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, n. 3, p. 543-546, 1997
- ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A.; SANTOS, A. S.; Avaliação do controle biológico de *Mahanarva fimbriolata* (HOM., CERCOPIDAE) com o fungo *Metarhizium anisopliae* em variedades de cana-de-açúcar e diferentes épocas de corte. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo. v. 70, n.1, p.101-103, 2003.
- AMORIM, H. V.; ZAGO, E. A.; GUTIERREZ, L. E. Método rápido para controle da fermentação e destilação. **Saccharum STAB**, v. 2, n4, p. 31-34, 1979.
- AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; ALVES, D.G. **Processos de produção de álcool – controle e monitoramento**. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, 1996, 93p.
- AMORIM, H. V. de; **Fermentação alcoólica, ciência & tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 2005. 448 p.
- ANGELIS, D. F de. Agentes físicos, químicos e microbiológicos que afetam a fermentação alcoólica. In: MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. **Aguardente de cana- produção e qualidade**. Jaboticabal, FUNEP, 1992 p. 49-66.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação Agrícola**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006, 237 p.
- BIOETANOL DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Energia para o desenvolvimento sustentável**. BNDS e CGEE (Cord.) 1ed. Rio de Janeiro. Nov 2008. Disponível em: <www.bioetanoldecana.org> Acesso em: 10 abr. 2009.
- BRIN, M. Tranketalose: clinical aspects. In: COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. Ed. **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1966. v. 9, p. 506-514.

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

CAMOLEZ, M. A.; MUTTON, M. J. R.; Influência de Microorganismos Contaminantes sobre o Processo Fermentativo. **Stab Açúcar e Álcool e subprodutos**, Piracicaba, v. 23, n. 5, p. 42-47, 2005.

CASAGRANDE, A. A.; **Tópicos de morfologia e fisiologia da cana-de-açúcar**. Jaboticabal: Funep, 1991, 157 p.

CHERUBIN, A. R.; **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacterina na fermentação alcoólica**. 2003. 124 f. Tese (Doutorado em Agronomia (Microbiologia Agrícola)) - Universidade de São Paulo, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

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

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

COPERSUCAR. **Manual de controle químico da fabricação de açúcar**. Piracicaba, 2001. 1 CD-Rom.

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

CROWE, L. M.; MOURADIAN, R.; CROWE, J. H.; JACKSON, S. A.; WOWOMERLEY, C. Effect of carbohydrates on membrane stability at low water activities. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 769, p.141-150, 1984.

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

DINARDO-MIRANDA, L. L.; FERREIRA, J. M. G.; CARVALHO, P. A. M. Influência da cigarrinha-das-raízes, *Mahanarva fimbriolata*, sobre a Qualidade Tecnológica da Cana-de-Açúcar. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 19, n. 2, p. 34-35, 2000.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; GARCIA, V.; COELHO, A.L. Eficiência de Inseticidas no Controle da Cigarrinha das Raízes, *Mahanarva fimbriolata*, em Cana-de-Açúcar. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.20, n.1, p.30-33, 2001.

DINARDO-MIRANDA, L. L. **Cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2003. 70 p.

DINARDO-MIRANDA, L. L. PIVETT, J. P.; FRACASSO, J. V.; Eficiência de inseticidas no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) e seus efeitos sobre a qualidade e produtividade de cana-de-açúcar. **Bioassay**, v.1, 2006. Disponível em: < <http://WWW.bioassay.org.br/articles\1.5> >. Acesso em: 02 de fevereiro de 2008.

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

DINARDO-MIRANDA, L. L.; PIVETTA, J. P.; FRACASSO, J. V. Economic injury level for sugarcane caused by spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 1, p. 16-24, 2008b.

FERNANDES, A.C. **Cálculos na Agroindústria da Cana-de-Açúcar**. Piracicaba: STAB, 2006. 193p.

FERREIRA, L. V., AMORIM, H. V., BASSO, L. C.; Fermentação de trealose e glicogênio endógenos em *Saccharomyces cerevisiae*. **Ciência Tecnologia dos Alimentos**. Campinas, v. 19, n.1, p.1-8, 1999.

FOLIN,O.; CIOCALTEU,V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 73, n.2, p.627-50, 1927.

FRANÇOIS, J., NEVES, M. J., HERS, H. G. **Yeast** 7. p. 575-587, 1991.

GALLO, C. R. Identificação de bactérias contaminantes na fermentação alcoólica. **STAB: açúcar, álcool e subprodutos**. Piracicaba, v. 10, n. 5, p.30-36, 1992.

GALLO, C. R.; CANHOS, V. P.; Efeito do tratamento ácido no fermento sobre a microbiota bacteriana contaminante da fermentação etanólica. **STAB: açúcar, álcool e subprodutos**. Piracicaba, v.4, n.1, p.35-37,1991.

GARCIA, J. F. **Técnica de criação e tabela de vida de *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera:Cercopidae)**. 2002, 59f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

GARCIA, J. F.; BOTELHO, P. S. M; PARRA, J.R. P.; Biology and fertility table of *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera:cercopidae) in sugarcane. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 4, p. 31-320, 2006.

GARCIA, J.F.; GRISOTO, E.; BOTELHO, P. S. M.; PARRA, J. R. P.; GLORIA, B. A. da Sítio de alimentação da *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) on sugarcane. **Scientia Agricola**. Piracicaba, v. 64, n. 5, p.555-557, 2007.

GARCIA, F. J. ; SVERZUT JUNIOR, J. V. ; Expansão da colheita mecanizada aumenta a incidência da cigarrinha-das-raízes. **Idea News**. Ed. 92, 2008. Disponível em < www.ideaonline.com.br> Acesso em: 28 mar. 2009.

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

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

GUTIERREZ, L., E.; Produção de álcoois superiores por linhagens de *Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica. **Scientia Agricola**. Piracicaba, v. 50, n. 3, p.464-472, 1993.

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

LAVANHOLI, M. G. D. P. Das; Qualidade da cana-de-açúcar. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M. de; LANDELL, M. G. A. de. **Cana-de-açúcar.** Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. 882p.

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

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M.; **Princípios de Bioquímica.** 2 ed. São Paulo: Sarvier. 1995. 839p.

LILLIE, S. H. & PRINGLE, J. R. **Journal Bacteriology** v. 143, p. 1384-1394, 1980.

LOUREIRO, E. de; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; PESSOA, L. G. A.; Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra a cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopideae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, v.34 n. 5 p. 791-798, 2005.

MACEDO, D. **Seleção e caracterização de *Metarhizium anisopliae* visando o controle de *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera:Cercopidae) em cana-de-açúcar.** 2005. 87f. Tese (Doutor em Ciências: Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MADALENO, L.L., RAVANELI, G.C., PRESOTTI, L.E, MUTTON, M.A., FERNANDES, O.A.; MUTTON, M.A. Influence of *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) injury on the quality of cane juice. **Neotropical Entomology**, v. 37, n.1, p. 68-73, 2008.

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 elementos em material vegetal.

MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of *Lactobacillus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, p.130-135, 1960.

MENDONÇA, A.F.; BARBOSA, G.V.S.; MARQUES, E.J. As cigarrinhas da Cana-de-Açúcar (Hemiptera:Cercopidae) no Brasil. In: Mendonça, A.F. (ed.) **Pragas da Cana-de-Açúcar**. Insetos & Cia, Maceió, 200p. (1996).

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

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

MUTTON, M. J. R.; **Reflexos da qualidade da matéria-prima sobre a fermentação etanólica.** Workshop sobre produção de etanol: qualidade da matéria-prima. Lorena, 2008. Disponível em: < www.apta.sp.gov.br >. Acesso em: 09 fev. 2009.

NAGODAWITHANA, T. W. STEINKRAUS, K. H. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in “rapid fermentation”. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.31, n.2, p. 158-162, 1976.

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

NEVES, M.J.; FRANCOIS, J.; On the mechanism by which a heat shock induces trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Journal**. Great Britain. 1992. v. 288. P. 859-864.

NOVAES, F. V.; Produção de Aguardente: Qualidade da Matéria-Prima. In: MUTTON, M. J. R. & MUTTON, M. A. (Ed.). **Aguardente de Cana – Produção e Qualidade**. Jaboticabal: Funep, 1992. p. 93-132.

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

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.

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

PATARO, C.; GUERRA, J. B.; GOMES, F. C. G.; NEVES, M. J.; PIMENTEL, P. F.; ROSA, C. A. Trehalose accumulation, invertase activity and physiological characteristics of yeast isolate from 24h fermentative cycles during the production of artisanal Brazilian cachaça. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p. 202-208, 2002.

PRESOTTI L. E.; MUTTON M. A.; MADALENO L. L.; RAVANELI G. MUTTON M. J. R. Infestação de cigarrinha-das-raízes e compostos fenólicos no caldo. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 26, n. 2, p. 6-8, 2007.

PINTO, A. S. de; Manejo racional de pragas na expansão do canavial. **Idea News**. ed. 88, 2008. Disponível em < www.ideaonline.com.br > Acesso em: 30 mar. 2009.

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

RAVANELI, G.C. **Efeito da cigarrinha-das-raízes com tratamento químico sobre a qualidade da matéria-prima e fabricação de álcool**. Jaboticabal, 2005. 78p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, 2005.

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

REMIZE, F.; SALBLAYROLLES, J.M.; DEQUIN,S. Re-assessment of the influence of yeast strain and environmental factors on glycerolproduction in wine. **Journal of applied microbiology**, v. 88, p. 371-378, 2000.

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

SILVA, J. A. **Tópicos da Tecnologia de Alimentos**. São Paulo, 2000, 229 p.

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.

SIMIONI, K. R.; SILVA, L. F. L. F.; BARBOSA, V.; RÉ, F.E.; BERNADINO, C. P.; LOPES, M. L.; AMORIM, H. V.; Efeito da variedade e época de colheita no teor de fenóis totais em cana-de-açúcar. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 24, n. 3, p. 36-39, 2006.

SOUZA, Z. M. de; PAIXÃO, A. C. S.; PRADO, R. M. de; CESARINI, L. G.; SOUZA, S. R. de; Manejo de palhada de cana colhida sem queima, produtividade do canavial e qualidade do caldo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v35, n.5, p.1062-1068, 2005.

STINGEL, E. **Distribuição espacial e plano de amostragem para a cigarrinha-das-raízes, *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854), em cana-de-açúcar.** 2005. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

STUPIELLO, J. P. Produção de Aguardente: Qualidade da matéria-prima. : MUTTON, M.J.R., MUTTON, M. A. **Aguardente de cana – produção e qualidade.** Jaboticabal: FUNEP, 1992, p.93-132.

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

STUPIELLO, J. P.; Conversando com a cana. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.17, n. 5, p. 13, 1999.

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

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

TREVELYAN, W. E.; HARRISON, J. S. Studies on yeast metabolism 5. The trehalose content on baker's yeast during anaerobic fermentation. **Biochemical Journal**, v. 62, p. 177-183, 1956.

TRIVELIN, P.C.O.; SALATI, E.; MATSUI, E. **Preparo de amostras para análise de ^{15}N por espectrometria de massa** (Boletim Técnico, 2). Piracicaba, CENA, 1973. 41p.

TROYER, J. R. A relation between cell multiplication and alcohol tolerance in yeast. **Microbiologia**. V. 45, n. 1, p. 20-39, 1953.

UNICA. **União da Indústria de Cana-de-açúcar**. Disponível em: < <http://www.unica.com.br> >. Acesso em: 22 abr. 2009.

VENTURINI FILHO, W. G. V. & MENDES, B. P. do; Fermentação alcoólica de raízes tropicais. In: Fundação Cargil. **Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas**. 2003. Disponível em: < www.abam.com.br/livroscargil/volume3.htm >. Acesso em: 19 mar. 2009.

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

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

YOKOYA, F. Problemas com contaminantes na fermentação alcoólica. **STAB: açúcar, álcool e subprodutos**. Piracicaba, v. 9, n. 5, p. 38- 39, 1991.

VII. APÊNDICE

Quadro 01. Número de colônias presentes no caldo e mosto nas duas épocas de avaliação.

Níveis de Danos	Ciclos	Caldo						Mosto					
		primeira época			segunda época			primeira época			segunda época		
		PCA	WLN	MRS	PCA	WLN	MRS	PCA	WLN	MRS	PCA	WLN	MRS
		UFC/mL x 10 ⁵			UFC/mL x 10 ⁵			UFC/mL x 10 ⁵			UFC/mL x 10 ⁵		
0%	1	68	78,75	148,5	58	17	49	0,5	64,5	4,5	6	0	1
	7	288	6,75	145,25	100,5	54,5	128,25	107,3	46,5	16	74	1,5	0
médias		178,00	42,75	146,88	79,25	35,75	88,63	53,88	55,50	10,25	40,00	0,75	0,50
15%	1	121	17,5	52,5	149,5	103	62	7,75	53	0,5	0	0	1
	7	159	44,25	278	>300	50	112	83	6,75	0	32,75	1,25	0
médias		140,00	30,88	165,25	>300	76,50	87,00	45,38	29,88	0,25	16,38	0,63	0,50
30%	1	198	17	155,75	186,75	105	188,75	129	163,5	0	1,5	21,25	67,75
	7	>300	26	>300	86,5	74	79,87	63,25	0	2,5	7,5	15,25	75
médias		>300	21,50	>300	136,63	89,50	134,31	96,13	81,75	1,25	4,50	18,25	71,38
60%	1	84	63,25	98	>300	94,25	61	7	73	0	0	3	0
	7	>300	23	257	158	99	224	67,75	24,75	1,5	192	122	112
médias		>300	43,13	177,50	>300	96,63	142,50	37,38	48,88	0,75	96,00	62,50	56,00

Quadro 02. Número de colônias presentes no início e final da fermentação nas duas épocas de avaliação.

Níveis de Danos	Ciclos	Primeira época						Segunda época					
		Início			Final			Início			Final		
		PCA	WLN	MRS	PCA	WLN	MRS	PCA	WLN	MRS	PCA	WLN	MRS
		UFC/mL x 10 ¹⁰	UFC/mL x 10 ⁶	UFC/mL x 10 ⁶	UFC/mL x 10 ⁶	UFC/mL x 10 ¹⁰	UFC/mL x 10 ⁶	UFC/mL x 10 ⁶	UFC/mL x 10 ¹⁰	UFC/mL x 10 ⁶	UFC/mL x 10 ⁶	UFC/mL x 10 ¹⁰	UFC/mL x 10 ⁶
0%	1	90,75	88,25	1	169	31	0	>300	31,5	0,25	76,25	164,5	1,25
	4	39,5	48,5	0	45,75	26	24,5	>300	178	>300	31,5	78,25	0,5
	7	117,75	143	2	49	67	1	>300	112	0	19,5	152	6,5
	10	38,5	3	146	19,75	28,5	286	>300	6	8,5	43	20,25	16,5
médias		71,63	70,69	37,25	70,88	38,13	77,88	>300	81,88	>300	42,56	103,75	6,19
15%	1	215	193,5	0,5	76	86,75	2,25	12,75	19,5	75,5	>300	92,5	4
	4	29,5	54,5	7	38,5	12	2	85,75	22	0	176	156	>300
	7	17,5	11,5	74,25	37,75	31,75	168,5	236	132	0	108	39	75,75
	10	276	82	292	26	28,25	300	11	77	20	180	78,25	5
médias		134,50	85,38	93,44	44,56	39,69	118,19	86,38	62,63	23,88	>300	91,44	>300
30%	1	25,75	25,5	5,5	167,25	49,75	1,75	6	97,25	0	>300	140,25	2,25
	4	2	25,25	0,25	89	112,5	0	76	63,5	32,25	41,5	76,75	0
	7	1,25	87,25	>300	2,75	6,75	0,5	3	21,75	0,5	89,5	105,25	42
	10	116	5,25	85	37,75	1,5	>300	3,25	5,5	44	>300	18	82
médias		36,25	35,81	>300	74,19	42,63	>300	22,06	47,00	19,19	>300	85,06	31,56
60%	1	94,75	99	0,75	0,5	0	4,25	61,5	57	0,5	138	61,75	1,75
	4	131	41	0	56,25	48	66,5	11,5	5	4	104	97	188
	7	50	39,25	>300	260	15	>300	25	23,25	>300	45,5	37,75	11,5
	10	210	49,75	38	13,25	4	>300	4	55,5	104,5	8	36,5	87
médias		121,44	57,25	>300	82,50	16,75	>300	25,50	35,19	>300	73,88	58,25	72,06

Quadro 03. Monitoramento da fermentação através do tempo de duração do processo (h:min), Brix inicial e final (%) nas duas épocas de avaliação.

Níveis de Danos	Ciclo	primeira época				segunda época			
		Tempo de Fermentação h:min	Brix Inicial %	Brix Final %	Tempo de Fermentação h:min	Brix Inicial %	Brix Final %	Tempo de Fermentação h:min	Brix Final %
0%	1	12:24	12,7	0,87	12:18	14,00	1,10	12:18	1,10
	4	16:24	12,7	2,73	15:41	14,00	2,60	15:41	2,60
	7	15:08	13	1,63	16:39	14,00	3,00	16:39	3,00
	10	15:08	13	3	17:00	14,00	3,00	17:00	3,00
Média		14:46	12,85	2,06	15:24	14,00	2,43	15:24	2,43
15%	1	13:21	12,5	0,9	12:56	14,00	1,00	12:56	1,00
	4	15:03	13	2,73	15:55	14,00	3,67	15:55	3,67
	7	16:32	13	1,9	16:26	14,00	3,67	16:26	3,67
	10	15:13	12,83	4,3	17:10	14,00	4,34	17:10	4,34
Média		15:02	12,83	2,46	15:36	14,00	3,17	15:36	3,17
30%	1	12:07	13	1	12:17	14,00	1,15	12:17	1,15
	4	16:17	12,7	2,43	15:39	14,00	3,87	15:39	3,87
	7	15:05	12,93	2,4	16:37	14,00	3,25	16:37	3,25
	10	15:07	13	3,97	17:02	14,00	2,57	17:02	2,57
Média		14:39	12,91	2,45	15:23	14,00	2,71	15:23	2,71
60%	1	13:49	12,77	1,13	12:56	14,00	1,10	12:56	1,10
	4	16:06	12,8	3,07	15:59	14,00	4,27	15:59	4,27
	7	16:25	12,3	2,8	16:26	14,00	4,17	16:26	4,17
	10	15:10	13	4,73	17:10	14,00	4,94	17:10	4,94
Média		15:22	12,72	2,93	15:37	14,00	3,62	15:37	3,62