

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

**EFEITO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS SOBRE A
COMPOSIÇÃO E A QUALIDADE DO DESTILADO
ALCOÓLICO**

Aline Figueiredo Halabi
Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Janeiro de 2010

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

**EFEITO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS SOBRE A
COMPOSIÇÃO E A QUALIDADE DO DESTILADO
ALCOÓLICO**

Aline Figueiredo Halabi

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Janeiro de 2010

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ALINE FIGUEIREDO HALABI – Nascida em Rio Verde (GO), em 19 de março de 1983, graduada em Ciências Biológicas em Janeiro de 2005 pela Universidade de Franca – Franca-SP.

A Deus pela vida e por esse sonho realizado.

A meus pais Naif e Lourdes pelo apoio e confiança.

Aos meus irmãos Alessandro e Endrigo, cunhadas Janise e Fernanda e sobrinha Eduarda por todo companheirismo e amizade.

A Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton por sua orientação e apoio.

DEDICO

Aos meus parentes que mesmo de longe torceram por mim.
A todos do laboratório TAA que acreditaram e confiaram em mim.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pela oportunidade de crescer profissionalmente e pessoal.

A minha família que acreditou, confiou e me acompanhou por toda essa jornada.

A professora Marcia Mutton pela confiança oportunidade e paciência.

Ao professor Miguel Mutton pelo carinho e amizade que sempre nos recebe.

A FCAV/UNESP campus de Jaboticabal e à CAPES pela oportunidade da realização do mestrado e a ajuda financeira.

Ao curso de Microbiologia Agropecuária da FCAV/UNESP campus de Jaboticabal.

A todos amigos do laboratório TAA da pós-graduação Gi, Léo, Tati, Flávio, Humberto e aos estagiários Juliana, Dani, Aline, Leandro, Gustavo, Raul Igor, Sartori, Vitor, Kelly, Ruan, José, Lydiane, Fábio e Ricardo pela ajuda e pro alegrar meus dias.

As minhas amigas em especial Juliana, Tati e Gi por todo apoio e amizade.

A Usina Santa Adélia pela colaboração deste experimento.

Aos meus parentes que sempre torceram por mim.

Aos membros da banca examinadora pelo carinho e correções.

A todos que ajudaram de forma direta ou indireta para a realização do experimento.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. Qualidade da Matéria-Prima.....	04
2.2. Contaminantes da Fermentação Alcoólica.....	05
2.3. Uso de biocidas para o controle de contaminantes.....	08
2.3.1. Biocidas naturais	09
2.3.2. Biocidas sintéticos	11
2.4. Formação de compostos secundários	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Material	17
3.2. Microrganismos.....	17
3.3. Delineamento de tratamento.....	18
3.4. Tratamentos empregados	18
3.5. Preparo do mosto	18
3.6. Preparo do fermento.....	19
3.7. Preparo dos biocidas.....	19
3.7.1. Própolis.....	19
3.7.2. Ampicilina	20
3.8. Condução da fermentação.....	20
3.9. Índice de viabilidade de leveduras	22
3.10. Destilação.....	22

3.11. Métodos	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. Fermentação	26
4.2. Viabilidade, brotamento e viabilidade de brotos	36
4.3. Compostos secundários do destilado	42
4.4. Rendimento fermentativo	47
5. CONCLUSÕES	50
6. REFÊRENCIAS.....	51

RESUMO

Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*), sendo a região sudeste a maior responsável por esta produção. O estado de São Paulo encontra-se como o maior produtor, com aproximadamente 58,55% da produção total. Uma das maiores preocupações do setor sucroalcooleiro tem sido a qualidade da matéria-prima, a contaminação bacteriana dos processos fermentativos e a qualidade final do etanol. O setor utiliza antimicrobianos sintéticos e naturais na fermentação visando um produto final de qualidade. Objetivou-se nesse trabalho analisar a composição e a qualidade do destilado final, sob antibiótico natural própolis, comparado com o de uso convencional (o antibiótico sintético ampicilina) da fermentação proveniente de duas estirpes diferentes de levedura. Utilizou-se um esquema fatorial 3X2X6, com 3 tratamentos principais (mosto testemunha, mosto com adição de extrato etanólico de própolis e mosto com adição de ampicilina); 2 tratamentos secundários (estirpes selecionadas CAT 1 e PE 2) e 6 ciclos fermentativos, com três repetições. Foram realizadas análises tecnológicas e microbiológicas no mosto e nos destilados. Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que o uso de antibiótico natural própolis não afetou a microbiota das leveduras fermentativa e a composição e a qualidade do destilado. As estirpes de leveduras apresentaram o mesmo rendimento alcoólico.

Palavras-chave: ampicilina, contaminantes, processo fermentativo

ABSTRACT

Brazil is highlighted as a big sugar cane producer, being the São Paulo State the biggest producer, having around 58.55% of the total Brazilian production. Among the sugar and alcohol sector's preoccupations, the raw material, quality, the fermentative process contamination and the ethanol final quality are the most important issues. This work aimed evaluates the composition and the distillate final quality when a natural antibiotic deviated from propolis compared to the ampicillin was used, using the CAT 1 and PE 2 strains. The factorial scheme 3x2x6 was used, being 3 main treatments (control, must + propolis ethanolic extract, and must + ampicillin); 2 secondary treatments (strains selected CAT1 and PE2), and 6 fermentative cycles, with 3 replications. Technologic and microbiologic analyses were done. Results showed that the propolis as natural biocide doesn't affected the fermentative microbiota and composition and quality of distillate. Yeasts strains CAT 1 e PE 2 didn't show differences to alcoholic yield.

Keywords: fermentative process, ampicillin, contaminants.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*), contando com uma área de 6,96 milhões de hectares plantados com a gramínea, sendo o estado de São Paulo responsável por 60% da produção brasileira. Através do processamento industrial da planta obtém-se diversos produtos onde se destaca o açúcar e álcool que são utilizados na alimentação e como biocombustível, respectivamente. Deve-se destacar ainda sua grande importância como matéria-prima básica para a síntese de diversos produtos, numa área fundamental dos setores produtivos, denominada Alcoolquímica. Recentemente os resíduos gerados pelo processamento industrial da cana, especialmente o bagaço e a vinhaça, têm sido apontados como importantes produtos na geração da bioeletricidade e fertilização dos solos.

A produção nacional de cana-de-açúcar destinada à indústria sucroalcooleira foi de 612.211,2 milhões de toneladas na safra 2009/10, superando em 7,10% a safra anterior, das quais 55% são para a produção de álcool. Do total de cana-de-açúcar destinada ao setor sucroalcooleiro, o estado de São Paulo encontra-se como o maior produtor, aproximadamente 58% da produção total (CONAB, 2009) estes números estão ligados ao rendimento da fermentação alcoólica que é uma das etapas mais importantes na produção de álcool. A fermentação ocorre a partir do caldo da cana que é preparado dando origem ao mosto, ao qual serão adicionadas as leveduras, que transformarão os

açúcares presentes no substrato em etanol, gás carbônico e componentes secundários.

Esta leveduras no entanto competirão com outras bem como com outros microrganismos como bacterias (microrganismo contaminantes).

A presença destes microrganismos contaminantes durante o processo de fermentação alcoólica pode ocasionar competição entre leveduras e bactérias pelos açúcares presentes no mosto. O que gera metabólitos indesejáveis, que podem ser tóxicas as leveduras, ocasionando queda da viabilidade de células de levedura e de brotos, chegando a ocasionar a floculação do fermento, o que reduz significativamente o rendimento industrial desta etapa de produção, se fazendo necessário o controle de tais contaminantes.

Atualmente, uma das técnicas para controle de contaminantes a redução do pH do mosto fermentativo utilizando-se grandes quantidades de ácido sulfúrico, aliado a adição de antibióticos. Estas operações, realizadas continuamente podem resultar no aumento da população de linhagens de bactérias e leveduras resistentes, além dos prejuízos ambientais e econômicos, destaca-se o baixo rendimento fermentativo e as elevadas produções de vinhaça.

Uma alternativa para minimizar a utilização de antibióticos sintéticos seria com o emprego de biocidas naturais ou seja antibiótico, bacteriostático naturais que apresentam mais de um principio ativo. Dentre vários biocidas naturais pode-se destacar a utilização da própolis, que apresenta excelente ação antibacteriana.

O presente estudo objetivou verificar a ação do biocida natural própolis comparando-o ao biocida sintético ampicilina como técnicas para remediar a ação dos contaminantes microbianos presentes na fermentação alcoólica destinada à produção do destilado. Buscou-se conhecer também o comportamento fisiológico das leveduras em processo, assim como a composição e qualidade do destilado produzido.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Qualidade da Matéria-Prima

O estado em que a matéria-prima encontra-se afeta diretamente o desempenho das operações industriais, fundamentais para a obtenção de altos rendimentos e qualidade do produto final.

De acordo com STUPIELLO (1992), a qualidade deve ser conceituada como conjunto de características da matéria-prima compatível com as exigências da indústria. A cana-de-açúcar deve atender a uma conjunção de parâmetros tecnológicos e microbiológicos que definem a sua qualidade e tenham uma influência fundamental no seu processamento.

De acordo com AMORIM et al. (2005) a queda do rendimento fermentativo, devido aos efeitos da contaminação bacteriana, pode acarretar prejuízos significativos na indústria como a paralisação do processo de fermentação alcoólica.

Segundo MUTTON & MUTTON (1992), dentre os fatores de qualidade da matéria-prima que afetam o rendimento e o produto final incluem: variedade, teores de açúcares, % de fibra na cana, quantidade de impurezas, umidade da cana e fatores de estresse como seca, geada, irrigação, doenças, pragas, danos físicos nos colmos, e deterioração por microrganismos, devido a um atraso no seu processamento.

Estudos realizados por GONÇALVES (2003) e RAVANELI et al. (2006), evidenciaram que a cana-de-açúcar é comprometida pelo ataque de cigarrinha-das-raízes (*Mahanarva fimbriolata*) provocando impactos no processo fermentativo e produção de etanol. Verificaram ainda que a viabilidade de células e brotos de leveduras foi significativamente afetada pelos danos provocados pelo ataque da praga, resultando em fermentações incompletas, alterações na composição do destilado e menor rendimento alcoólico.

De acordo com VILLELA (2003), o processamento da matéria-prima com qualidade possibilitou a otimização do processo fermentativo, resultando em maiores produtividades. O emprego de matéria-prima de qualidade no processo fermentativo é extremamente importante quando se busca a produção de etanol.

2.2. Contaminantes da Fermentação Alcoólica

A fermentação alcoólica é o processo biológico através do qual as leveduras desdobram os carboidratos presentes no substrato, transformando-os principalmente em etanol e gás carbônico. Nesta fase podem ocorrer vários problemas tais como a contaminação do meio por outros microrganismos como bactérias. Entre os principais a contaminação bacteriana, que consiste em uma das principais preocupações da agroindústria sucroalcooleira (CHERUBIN, 2003).

Focos de contaminação podem iniciar-se na lavoura, uma vez que a cana-de-açúcar abriga em seu ecossistema uma grande diversidade de microrganismos próprios, que acabam constituindo uma contaminação natural desde as operações de corte e colheita até etapas da fabricação do álcool (MUTTON, 1998; AMORIM & LEÃO, 2005).

MUTTON (1998), observou que colmos de cana cortados a poucos dias secavam nos pátios das destilarias e por estarem contaminadas forneciam mostos com grande número de microrganismos indesejáveis assim como grande quantidade de impurezas minerais decorrentes da queima dos mesmos para a colheita.

Quando não se tem um controle adequado do processo de produção, a presença de contaminantes no mosto se constitui um grave problema para as destilarias, não só pelo fato destes microrganismos desviarem parte dos açúcares produzindo substâncias não desejáveis, como também acarretando um menor rendimento alcoólico do vinho (AMORIM & LEÃO, 2005).

Outro problema decorrente da contaminação é a queda na viabilidade celular das leveduras fermentadoras segundo THOMAS et al., (2001), uma redução de viabilidade pode estar relacionada à produção de metabólitos pelas bactérias que são tóxicas às leveduras como também pelo esgotamento de alguns nutrientes que são essenciais para o desenvolvimento das leveduras.

De um modo geral, dentre os microrganismos responsáveis pela contaminação da fermentação alcoólica destacam-se as bactérias pertencentes aos gêneros ***Acetobacter***, ***Clostridium***, ***Leuconostoc***, ***Streptococcus***, ***Enterobacter***, ***Bacillus*** e ***Lactobacillus*** (AMORIM & LEÃO, 2005) e os fungos (leveduras e bolores) ***Saccharomyces***, ***Torula***, ***Pichia***, ***Penicillium***, ***Aspergillus***, ***Cladosporium*** (BEVAN & BOND, 1971 citado por CABRINI & GALLO, 1999) e ***Cândida*** (CABRINI & GALLO, 1999).

O tratamento do caldo originando o mosto pode amenizar tais contaminações, pois para STUPIELLO & HORII (1982), os tratamentos de caldo de maneira geral visam: a redução de quantidade de impurezas grosseiras, aumento do teor de açúcares totais, resultando em maior eficiência do processo.

Dentre os tratamentos destaca-se a faixa adequada de pH segundo VASCONCELOS (1999), o pH do mosto entre 3,5 e 4,5, propicia melhor desempenho na fermentação alcoólica, quando conduzido em batelada simples.

Já para ANDRIETTA et al., (1999), um fator determinante para que se possa projetar uma unidade de fermentação alcoólica é definir o comportamento do microrganismo que será utilizado como agente de transformação.

De maneira geral as bactérias presentes na fermentação alcoólica são sempre uma preocupação pelos problemas que elas causam, tais como, consumo de açúcar e nutrientes do mosto, queda da viabilidade das leveduras, produção de metabólitos, floculação de leveduras, além da queda na produção de álcool

(CAMOLEZ, 2004). Considerou ainda que esta é a maior causa de redução na produção de etanol durante a fermentação, razão pela qual apresenta necessidade de um controle, através da utilização de agentes antimicrobianos quando atinge níveis problemáticos.

Define-se qualidade da matéria-prima como o conjunto de características compatíveis com as necessidades da indústria. Sendo este, um fator muito importante para a unidade industrial, pois dele depende a eficiência da recuperação do açúcar, do álcool e a qualidade do produto final.

Neste contexto, reduzir os impactos provocados pelos contaminantes sobre a produção e qualidade do álcool é fundamental. Para tanto, a identificação das fontes de contaminações e a orientação durante o processo de produção objetivando a redução dos microrganismo são de grande importância para o êxito da produção.

2.3. Uso de Biocidas para o Controle de Contaminantes

O emprego de biocidas convencionais pode apresentar restrições, em virtude da possibilidade de se encontrar resíduos nos destilados. Pentaclorofenol foi usado durante alguns anos nas proporções de 0,01 a 0,05 g/L de mosto, com bons resultados, porém seu uso é hoje proibido (LIMA, 2001).

Assim como, o fato de se trabalhar por grandes períodos com apenas um princípio ativo o que ocorre em grande parte dos casos, possibilita o desenvolvimento de resistência por parte dos contaminantes do biocida utilizado. De acordo com OLIVA-NETO & YOKOYA (2001), microrganismos contaminantes são também reciclados com a levedura e isto pode causar muitos problemas, como a competição entre bactérias e leveduras pelo mesmo substrato.

A possibilidade do desenvolvimento da resistência microbiana é crescente sendo incerta a perspectiva de uso de drogas antimicrobianas no futuro. Portanto, devem ser tomadas atitudes como: controlar o uso de antibióticos, desenvolve pesquisas para melhor atender os mecanismos genéticos de resistência e continuar os estudos de desenvolvimento de novas drogas, tanto sintéticas como naturais (NASCIMENTO et al., 2000).

Relatos de BREGAGNOLI (2006) foram pioneiros quanto a utilização de biocidas naturais, como o extrato de própolis no controle de bactérias contaminantes da fermentação alcoólica para a produção de cachaça. A autora observou resultados positivos na utilização do extrato de própolis, com viabilidade sempre constante e em níveis elevados, menor teor de glicerol e maior teor alcoólico no vinho produzido.

2.3.1. Biocidas naturais

O controle bacteriano da fermentação alcoólica do combustível industrial do Brasil é feito atualmente pela lavagem da massa de fermento com ácido sulfúrico. Este processo é reforçado pela adição de biocidas, tal como carbamato, compostos de amônio, compostos quartenário de amônio, fenóis e antibióticos (penicilina, virgicionina, Kamoran WP) (OLIVA-NETO et al., 2001).

A própolis é uma substância resinosa processada pelas abelhas melíferas a partir de várias partes da planta (KATIRCIOGLU & MERCAN, 2006). Muito conhecida por sua ação antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatória, imunomodulatória, dentre outras (FERNANDES Jr. et al., 2006). É utilizada na medicina tradicional desde a antiguidade devido a esse largo espectro de atividade biológica (KUJUMGIEV et al., 1999).

A própolis possui uma composição complexa, podendo variar em função de fatores como a flora da região, estações do ano e características genéticas das abelhas (SOUSA et al., 2007). Os flavonóides, juntamente com ácidos fenólicos e ésteres, aldeídos fenólicos e cetonas são considerados os mais importantes compostos antimicrobianos da própolis. O mecanismo de atividade antimicrobiana é tido como complexo e está atribuído ao sinergismo entre os flavonóides, hidroxiácidos e sesquiterpenos (FERNANDES Jr. et al., 2006).

Composta por vários princípios ativos que a tornam eficiente no controle de bactérias, possui efeito altamente inibitório sobre determinados gêneros, tais como ***Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Mycobacterium*** (BIANCHINI & BEDENDO, 1998). São encontrados pelo menos 200 componentes em amostras de própolis de diversas origens, dentre esses, ácidos graxos e fenólicos, ésteres, ésteres fenólicos, flavonóides, terpenos, β -esteroides, aldeídos e alcoóis aromáticos, sesquiterpenes e naftaleno (AGA et al., 1994; BANKOVA et al., 1996).

A própolis tem enorme importância médica e econômica, sendo comercializadas em preparações farmacêuticas e cosméticas, destacando-se: comprimidos, pastilhas, loções, tinturas, etc. (SOUSA et al., 2007).

Segundo BIANCHINI & BEDENDO (1998), uma concentração de própolis de 10% no meio de cultura inibiu o crescimento de ***Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis* e *Xanthomonas axonopodis***, enquanto que ***Erwinia chrysanthemi*** apresentou crescimento reduzido; já a ***Pseudomonas syringae*** não se mostrou afetada pela presença do extrato aquoso de própolis no meio de cultura.

De acordo com FERNANDES Jr. et al.(2006), empregaram o extrato aquoso de própolis de 3 localidades distintas para se determinar a ação antimicrobiana da mesma própolis, constaram que as bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis ao extrato aquoso de própolis, independente do local de coleta da resina. Todavia, KATIRCIOGLU & MERCAN (2006) ao estudarem a

própolis de três localidades obtiveram como resultado uma forte inibição da *Escherichia coli* ATCC 35218 dentro das Gram-negativas.

Extrato de pomelo, outro antimicrobiano natural, é empregado na conservação de pescado e higienização de equipamentos; elimina em torno de 97% das bactérias a superfície de folhas de alface, contribuindo para conservação pós-colheita do produto. O extrato de pomelo tem na sua composição vários princípios ativos Como o ácido caféico e terpenos (LÓPEZ et al. 2001). O ácido caféico é um agente bactericida e os terpenos são fungicidas em potencial (ORDONEZ, 2004).

Segundo BREGAGNOLI (2006), o extrato de própolis pode ser utilizado no controle de bactérias contaminantes da fermentação alcoólica, uma vez que se mostrou tão eficiente quanto à ampicilina, sendo de fácil obtenção, baixo custo e ecologicamente seguro; enquanto que o extrato de pomelo na fermentação alcoólica não obteve efeito inibitório de contaminantes.

Outro biocida utilizado em fermentação, por exemplo na produção de cerveja é o lúpulo, é uma planta dióica, responsável pelo amargor típico e contribuem para o aroma da cerveja. Pode ser comercializado na forma de flores secas, pó e extratos, além das características citadas, dadas a cerveja pelo lúpulo, esta planta ainda possui outras funções como evitar “espumamento” durante a fervura e agente bacteriostático (CERVESIA, 2007).

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

2.3.2. Biocidas sintéticos

A ampicilina é um derivado de penicilina de amplo aspecto, sendo um quimioterápico do grupo β -lactâmico que interfere na síntese de polipeptidioglicano, na parede celular bacteriana, cuja ação final é a inativação de um inibidor das enzimas autolíticas, conduzindo à lise da bactéria. A ampicilina é destruída por algumas bactérias que produzem β -lactamase e por muitos microrganismos Gram-negativos. A ampicilina age, assim, no combate a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, estando indicada nos casos de infecções. É um antibiótico sintético comprovadamente testado como inibidor de bactérias. Por ser um bactericida, apresenta mecanismo e ação semelhante ao das outras penicilinas. Entretanto, a ampicilina tem maior afinidade a proteína fixadora da penicilina 3, que é responsável pela formação de septos no momento da divisão da célula bacteriana (RANG et al., 1995).

Outros biocidas sintéticos são bastante usados em indústrias sucroalcooleira, como Kamoran que é um tipo de antibiótico que, seletivamente,

age como bactericida e bacteriostático. Sua produção é obtido através da fermentação da bactéria ***Streptomyces cinnamomensis*** (QUÍMICA REAL, 2009).

2.4. Formação de Compostos Secundários

Nem todo açúcar presente no mosto é transformado em álcool e gás carbônico. Parte significativa pode ser utilizada para a multiplicação do fermento na dorna, bem como para a formação de carboidratos de reserva (trealose) e produtos secundários, como glicerol, ácidos, aldeídos, ésteres, alcoóis superiores, etc. (FIALHO, 2004).

A trealose é um dissacarídeo não redutor constituído de duas moléculas de glicose. Originalmente a trealose era considerada substancia de reserva energética para a levedura, porém, outros autores sugerem que ela possua a função de proteção para a célula da levedura, durante situações de estresses, tais como, altas temperaturas, alta concentração de etanol e choque osmótico (ALCARDE & BASSO, 1997; FERREIRA et al., 1999; GOMES et al., 2002).

A formação de glicerol não é constante e além das estirpes de levedura, fatores como oxigênio, temperatura da fermentação e pH tem sido relatados por influenciar na formação deste composto. Segundo RADLER 1982, dentro do limite normal de condições, esses fatores não são muito importantes, particularmente quando o limite de pH está conservado entre 2,8 a 5,0.

O glicerol é formado na mesma via de síntese do etanol, com um desvio, competindo pela utilização do poder redutor (NADH), motivo pelo qual a síntese deste composto é inversamente proporcional à do etanol. Portanto a formação de glicerol pode interferir no processo fermentativo de forma desfavorável. A produção de glicerol pode ser influenciada por diversos fatores, dentre eles cita-se a estirpe de levedura empregada no processo fermentativo (BASSO, 1996).

Aldeídos são compostos resultantes da oxidação parcial ou desidrogenação de alcoóis primários. Esses aldeídos podem ser formados pela redução de ácidos graxos, mas são de ocorrência restrita na fermentação alcoólica (PIGGOTT, 1989; POTTER, 1980) citados por MAIA (1994).

O principal aldeído associado à fermentação alcoólica propriamente dito é o acetaldeído. A formação de congêneres como acetaldeído ocorre principalmente nas primeiras horas da fermentação, diminuindo posteriormente, principalmente, sob condições de anaerobiose (MAIA et al., 1995).

De acordo com Instrução Normativa nº 13/2005 e legislações, as quantidades de compostos secundários totais, excluindo-se o etanol em cachaça, devem estar dentro dos limites de 200 mg a 650 mg/100 mL de álcool anidro (a.a.), sendo os limites máximos admitidos para cada composto secundário de 150 mg/100mL (a.a.) de acidez volátil em ácido acético; 200 mg/100mL (a.a.) de ésteres em acetato de etila, 30 mg/100mL (a.a.) de aldeído expresso em acetaldeído, 5 mg/100mL (a.a.) de furfural, 20 mg/100mL (a.a.) de metanol e 360 mg/100mL

(a.a.), acroleína 5mg/100mL (a.a.), sec. butílico 10mg/100mL (a.a.), n-butílico 3mg/100mL (a.a.), soma dos compostos secundários 200 a 650/100 mL (a.a.) (BRASIL, 2005).

A partir de aminoácidos presentes no caldo de cana vários aldeídos podem ser formados. A degradação parcial de aminoácidos leva à formação de alcoóis superiores que, em presença de oxigênio, podem ser convertidos em aldeídos (CROWELL et al., 1961; ENGAN, 1970).

Os alcoóis homólogos superiores são compostos orgânicos que possuem uma hidroxila (OH), ligada diretamente ao átomo de carbono, que não pertença a um anel aromático. Segundo WEBB & INGRAHAM (1963), os alcoóis homólogos superiores n-propílico, isobutílico e isoamílico são comuns em todas as bebidas fermentadas, estando presentes em todos os sistemas de fermentação.

A formação de alcoóis superiores esta relacionada com a linhagem da levedura e com a ocorrência de oxigênio e temperaturas elevadas. As formações de ácidos ocorrem na fermentação alcoólica, pois estão sempre presentes na matéria-prima. (CARDOSO, 2001).

O furfural, um aldeído de presença rara em algumas cachaças, é resultante da decomposição química de carboidratos. É formado, principalmente, pela pirogênese da matéria orgânica depositada no fundo dos alambiques. A sua formação é evitada pela destilação do vinho limpo, livre de substâncias orgânicas em suspensão. Nas cachaças envelhecidas, o furfural pode ser oriundo da ação

de ácidos sobre as pentoses e seus polímeros (hemiceluloses). Esse composto pode estar presente no caldo de cana, quando a colheita da cana-de-açúcar for precedida da queima do palhiço (NOVAES, 1974; POTTER, 1980; PIGGOTT et al., 1989; YOKOYA, 1995).

Possui um aroma intenso presente nos destilados. Encontra-se em maior quantidade na cauda e é prejudicial à qualidade do mesmo e à saúde do consumidor, por isso, o seu teor é limitado sendo no máximo de 5mg/100mL (a.a.), conforme a lei vigente (CLETO, 1995).

Acroleína é um composto produzido na cachaça é uma substância que apresenta gosto desagradável, presente nos vinhos alterados, responsável pela presença de gostos amargos em destilados. Sendo formada por bactérias ou pela desidratação do glicerol na presença de ácidos, quando em contato com as superfícies metálicas do alambique, é altamente tóxica e irritante ao nariz e aos olhos (NYKANEN & NYKANEN, 1991).

Ésteres, como acetato de etila, são formados a partir de uma reação entre alcoóis e ácidos, têm aroma peculiar de frutas e compõe o “bouquet” de vinhos e destilados (CARDOSO, 2001).

Carbamato de etila é um composto potencialmente carcinogênico e forma-se naturalmente em alimentos tais como pão, iogurte, vinho, cerveja, saquê e,

principalmente, em bebidas fermento-destilladas tais como uísque, rum, vodca, grapa, cachaça e tiquira (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2003).

Segundo CLETO E MUTTON (1995), leveduras diferentes produzem os mesmos componentes secundários do ponto de vista qualitativo, porém quantitativamente apresentam diferenças significativas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de Tecnologia do Açúcar e do Alcool do Departamento de Tecnologia – FCAV-UNESP, Campus de Jaboticabal-SP, ao decorrer da safra 2008/2009.

3.1. Material

A matéria-prima utilizada para o preparo do mosto foi o caldo extraído de colmos da cana industrial, coletados na unidade de produção Usina Santa Adélia na região de Jaboticabal-SP, no período setembro a novembro de 2008. Este caldo foi coletado do primeiro terno da moenda sem nenhum tratamento prévio, sendo encaminhado ao laboratório FCAV-UNESP no tempo aproximado de uma hora.

3.2. Microrganismos

As estirpes utilizadas no experimento foram CAT1 (Catanduva-SP) e PE2 (Usina da Pedra–Serrana- SP) que têm se mostrado eficientes nos processos fermentativos realizados no Estado de São Paulo e que se apresentam como excelentes fermentadoras.

3.3. Delineamento e Tratamento

Para a realização do ensaio utilizou-se o delineamento inteiramente casualizados, em esquema fatorial 3x2x6, com 3 repetições, sendo o primeiro fator os biocidas avaliados (testemunha, própolis e ampicilina), o segundo fator estirpes de leveduras (CAT1 e PE2) e o terceiro fator os seis ciclos fermentativos.

A análises estatísticas dos componentes secundários foram realizadas através do delineamento em blocos casualizados, em esquema fatorial 3x2x3, com 3 repetições, sendo o primeiro fator os biocidas avaliados (testemunha, própolis e ampicilina), o segundo fator as estirpes de leveduras (CAT1 e PE2) e o terceiro fator os três ciclos fermentativos definidos para este estudo.

3.4. Tratamentos Empregados

Os tratamentos utilizados foram: mosto sem adição de antibiótico (testemunha), mosto com adição de própolis e mosto com adição de ampicilina, todos fermentados com as estirpes de leveduras CAT1 e PE2 em seis ciclos fermentativos e três repetições.

3.5. Preparo do Mosto

O caldo tinha o Brix inicial em torno de 20° e foi submetido a uma pré clarificação, sendo aquecido a 100°C, e adicionado ácido fosfórico (300 mg/L) para facilitar a decantação de impurezas vegetais e minerais. As impurezas decantadas foram descartadas e o caldo peneirado aguardou o resfriamento até 30°C. O Brix do caldo foi reduzido a 14° através de adição de água destilada para o preparo do mosto.

3.6. Preparo do Fermento

As estirpes de leveduras selecionadas foram multiplicadas em processo de cortes com mosto de Brix 2°, 4° e 6° sob agitação manual até se obter o total de

massa necessária em temperatura 30°C. Após a obtenção de massa as leveduras foram adaptadas ao meio fermentativo em Brix de 6°, 9°, 12° e 14°, onde já se encontrava aptas para fermentação.

A dorna utilizada tem a capacidade de 10L, porém foram fermentados 6L de mosto no Brix 14°, no qual foram inoculadas células das leveduras na proporção de 30g/L.

3.7. Preparo dos Biocidas

3.7.1. Própolis

Utilizou-se própolis coletada no município de Guaxupé-MG por BREGAGNOLI (2006), sendo que a extração dos princípios ativos foi realizada da mistura de 25 g de própolis triturada em 100 mL de solução de etanol 80% v.v⁻¹ sob agitação em banho termostático à temperatura de 70° C durante 30 minutos, tendo como produto final o extrato etanólico de própolis (KOO, 1996).

A dosagem utilizada foi 4mg L⁻¹ para o extrato de própolis. Essa dosagem foi estabelecida em ensaios realizados por BREGAGNOLI, (2006).

3.7.2. Ampicilina

A solução estoque de ampicilina foi preparada na concentração de 5g/L ou 5000 ppm em água destilada, depois a solução foi autoclavada.

A dosagem utilizada foi 4mg L^{-1} para o extrato de ampicilina.

3.8. Condução da Fermentação

O processo utilizado para a condução da fermentação foi em batelada alimentada, com recuperação do fermento por centrifugação do vinho (Processo Melle Boinot Almeida).



Figura 1: **A** – imagem das dornas usadas nos ciclos fermentativos. **B** – massa de levedura utilizada como agente fermentador do experimento. Fonte: imagem da autora, 08/01/2010, UNESP Jaboticabal, Laboratório de Tecnologia.

As fermentações foram realizadas em dornas de aço inoxidável e fundo cônico, com capacidade para 10L. As fermentações ocorreram da seguinte maneira: o pé-de-cuba (30% do volume final da dorna), foi tratado com biocidas de acordo com o esquema fatorial adotado. Após o tratamento, aguardou-se 60 minutos para iniciar as alimentações, que foram fracionadas em quatro vezes de 1,5L, com intervalos de 60 minutos, totalizando 6L de mosto por dorna.

Ao término da fermentação o vinho era centrifugado e as leveduras recuperadas para compor um novo pé-de-cuba e dar início a outro ciclo até a conclusão dos ciclos propostos no esquema fatorial.

Os preceitos de higiene que aperfeiçoam e/ou preservam a qualidade da matéria-prima e das condições da fermentação foram adotados, tais como: filtragem, uma pré-clarificação do caldo, ajuste do brix e temperatura. A cada 3 ciclos foi realizada limpeza do fundo de dorna, de maneira a reduzir a contaminação bacteriana.

3.9. Índice de Viabilidade de Leveduras

O índice de viabilidade de leveduras foi realizado no início e no final da fermentação conforme método descrito por LEE et al. (1981), após a homogeneização dos pés-de-cuba, assim como do vinho, realizou-se a coleta das amostras em frascos limpos e esterilizados. Os parâmetros avaliados foram: viabilidade celular e de brotos, índice de brotamentos de levedura.

3.10. Destilação

Concluído o processo de fermentação, realizou-se a centrifugação do vinho para recuperação das células de levedura e obtenção do vinho delevurado. A destilação do vinho foi feita em um micro destilador de álcool modelo TE-012 Tecnal, com um volume de 60 mL recuperando 20 mL com uma concentração de 3 vezes, cada destilação leva cerca de 15 minutos.

Após a 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 seguintes condições: 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. A duração de cada análise cromatográfica foi em torno de 40 minutos.



Figura 2: Microdestilador modelo TE-012, Tecnal. Fonte: imagem da autora, 08/01/2010, UNESP Jaboticabal, Laboratório de Tecnologia.

Após a 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 seguintes condições: 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. A duração de cada análise cromatográfica foi em torno de 40 minutos.



Figura 3: Cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 2014, acoplado com software GC Solution com uma coluna Restec modelo Rtx[®] - 1301, 60m X 0,25mm. Fonte: imagem da autora, 08/01/2010, UNESP Jaboticabal, Laboratório de Tecnologia.

3.11. Métodos

As amostras (mosto, vinho e destilado) foram submetidas à homogeneização, e alíquotas foram utilizadas para as análises químico-tecnológicas, conforme segue:

- Brix do Mosto e Vinho: determinado por um densímetro de Brix com avaliação e controle de temperatura.
- pH do Mosto e do Vinho: determinado através de leitura direta em ph-metro digital, com escala de 0-14.
- Açúcares Redutores Totais – ART% Mosto: expressos em relação à glicose e dosados pelo Método Volumétrico de LANE & EYNON (1934).
- Acidez Sulfúrica do Mosto e Vinho: determinada de acordo com técnica descrita em COPERSUCAR (1988).
- Açúcares Redutores Residuais Totais (ARRT) do Vinho: segundo as técnicas descritas em LANE & EYNON (1934).
- Glicerol do Vinho: determinada de acordo com técnica descrita em COPERSUCAR (1987).
- Avaliação da Composição do Destilado: por cromatografia gasosa GC-2014 Shimadzu.
- Rendimento fermentativo (%).

Os resultados foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey, utilizando o software AgroEstat – Análises Estatísticas de Ensaio Agrônomico a 5% de probabilidade (BARBOSA & MALDONADO, 2009).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Fermentação

As médias das características físico-químicas do mosto utilizado na fermentação estão detalhadas na Tabela 1.

Tabela 1. Valores médios observados para características do mosto utilizado nas fermentações.

BRIX	pH	Acidez	ART (Açúcares Redutores Totais)	
			(g/L)	(g/100g)
CAT1	14º	4,22	1,62	12,44
PE2	14º	4,27	1,22	12,82

A queda do Brix das fermentações teve um acompanhamento constante, sendo possível verificar as condições e o período das fermentações (Gráficos 1 e 2). Pode-se observar que os tratamentos utilizados não diferiram entre si.

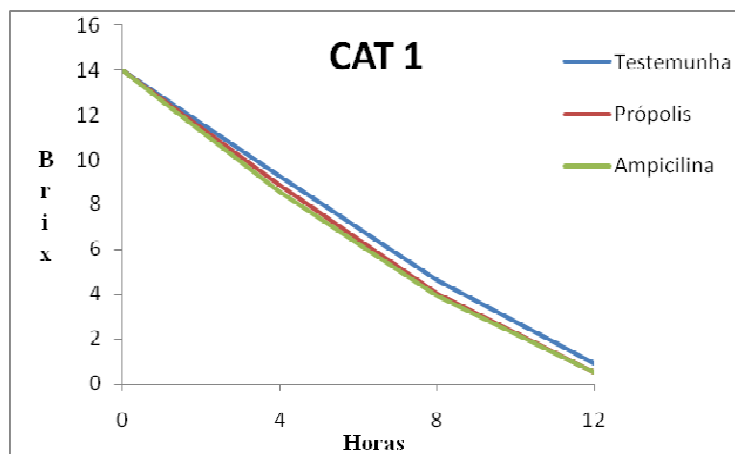


Gráfico 1 – Curva de queda de Brix durante a fermentação, utilizando a estirpe CAT1.

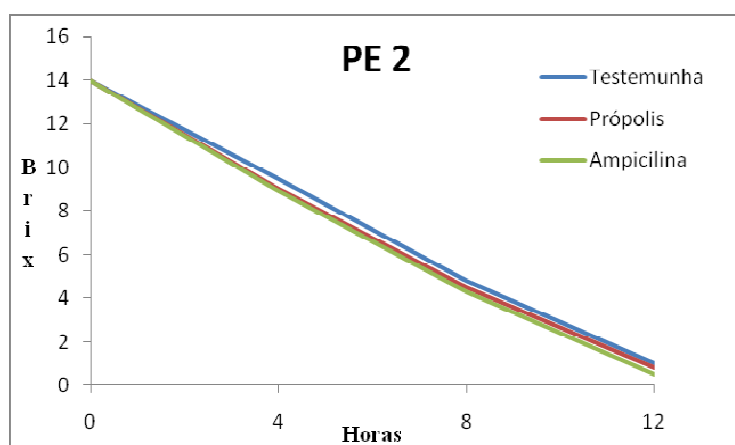


Gráfico 2 – Curva de queda de Brix durante a fermentação, utilizando a estirpe PE2.

Tanto na estirpe CAT1 quanto na estirpe PE2, pode-se observar o mesmo comportamento sem diferenças significativas (Gráfico 2).

O tempo de fermentação foi em torno de 12 horas, nas fermentações utilizando a leveduras CAT1 e PE2.

A acidez do vinho, apresentou diferença significativa entre os tratamentos ampicilina e a própolis e entre os ciclos fermentativos, porém não saiu dos padrões de acidez ionizável para uma fermentação de qualidade (Gráfico 3 e 4).

Os vinhos obtidos ao final das fermentações não apresentaram alteração significativa de acidez, independente da levedura utilizada, conforme Tabela 2.

Segundo NOVAES et al., (1992), em um processamento considerado normal da fermentação, em função da acidez titulável ou da acidez iônica do mosto, exige que esta se situe dentro de certos limites, visto que as atividades das leveduras estão estreitamente relacionados com os dois tipos de acidez. Tanto a acidez deficiente como a excessiva são inadequadas àquelas atividades e as prejudicam. Neste contexto, é desejado que pH esteja entre 4,5 e 5,5 e, a acidez titulável, em torno de 2,5 g de H_2SO_4/L (Tabela 2).

O pH do vinho nos tratamentos e nos ciclos fermentativos não diferiu no início quanto no fim das fermentações (Tabela 2).

Em relação as fermentações utilizando a estirpe PE2 apresentaram um menor pH comparadas com as fermentações utilizando CAT1 tanto no início quanto no fim das fermentações, não comprometendo a qualidade e composição do destilado. (Gráficos 5 e 6)

Houve uma interação do pH dos vinhos entre fermentações com as leveduras e ciclos fermentativos inicial, onde foi observado que apenas no 1º ciclo utilizando a levedura PE2 obteve um pH maior comparada a com a fermentação utilizada a levedura CAT1. Sendo que do 2º ao 6º ciclos fermentativos utilizando-se a levedura PE2 manteve um pH menor (Gráfico 7).

Este fato está relacionado com o comportamento das estirpes de leveduras utilizadas na fermentação.

Tabela 2. Resultados da análise de variância das médias da acidez, pH inicial e final dos vinhos.

	ACIDEZ	pH INICIAL	pH FINAL
Biocidas (A)	(g/L)		
1 Testemunha	2,69 ab	3,70 a	3,70 a
2 Própolis	2,71 a	3,66 a	3,61 a
3 Ampicilina	2,49 b	3,64 a	3,64 a
F (A)	3,82*	2,37 ^{ns}	2,77 ^{ns}
DMS (5%)	0,20	0,07	0,09
Inóculos (B)			
1 PE2	2,70 a	3,60 b	3,52 b
2 CAT1	2,56 a	3,73 a	3,78 a
F (B)	3,72 ^{ns}	29,51**	62,71**
DMS (5%)	0,13	0,04	0,06
Ciclos (C)			
1 ciclo	2,26 c	3,63 a	3,58 a
2 ciclo	2,44 bc	3,67 a	3,71 a
3 ciclo	2,76 ab	3,68 a	3,70 a
4 ciclo	2,84 a	3,66 a	3,59 a
5 ciclo	2,70 ab	3,69 a	3,65 a
6 ciclo	2,79 ab	3,66 a	3,66 a
F (C)	7,36**	0,53 ^{ns}	1,78 ^{ns}
DMS (5%)	0,35	0,12	0,16
AXB	0,23 ^{ns}	0,69 ^{ns}	9,56**
AXC	0,17 ^{ns}	0,53 ^{ns}	0,92 ^{ns}
BXC	0,57 ^{ns}	5,77**	3,85**
AXBXC	0,24 ^{ns}	0,61 ^{ns}	0,47 ^{ns}
CV%	13,20	3,53	4,66

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

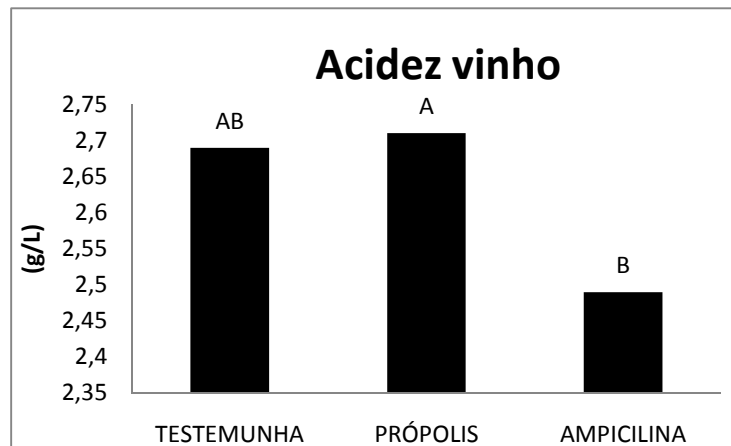


Gráfico 3- Resultados médios de acidez nos tratamentos fermentativos.

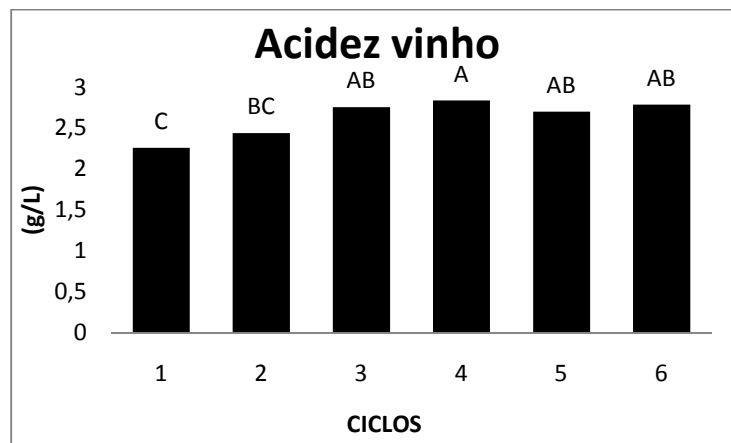


Gráfico 4- Resultados médios de acidez nos ciclos fermentativos.

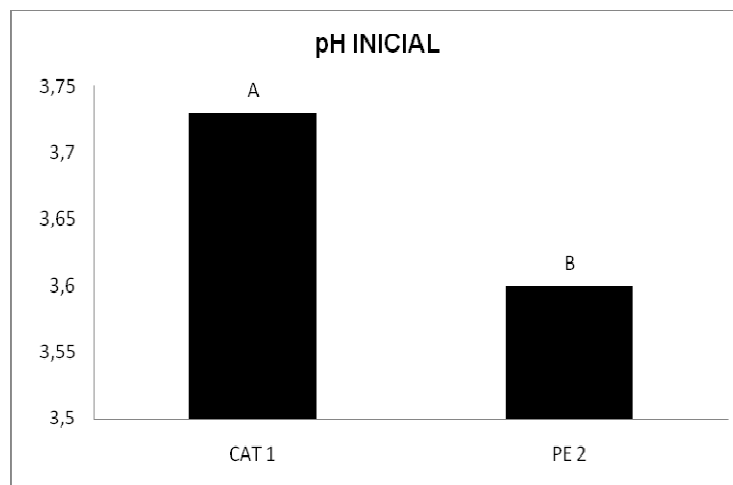


Gráfico 5- Resultados médios de pH inicial em fermentações utilizando as leveduras CAT1 e PE2.

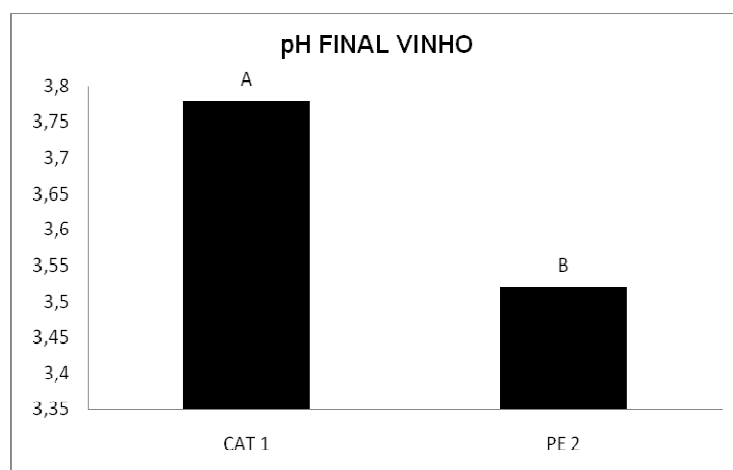
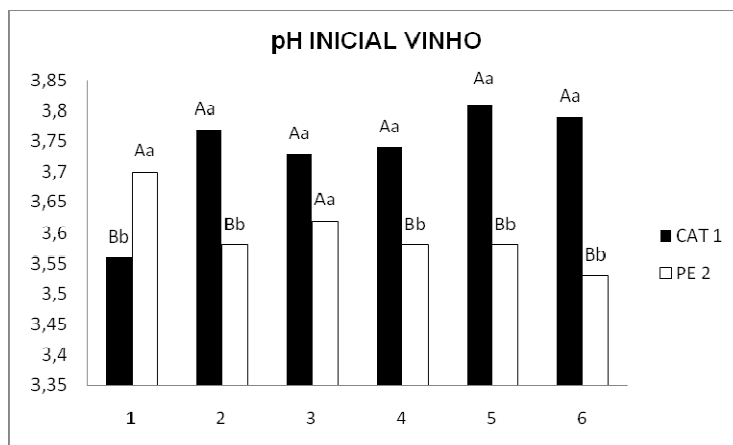
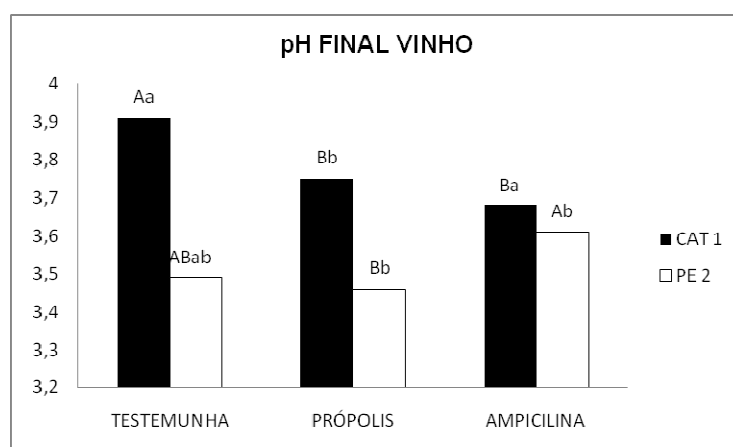


Gráfico 6- Resultados médios de pH final em fermentações utilizando as leveduras CAT1 e PE2.



Letras maiúsculas correspondem a ciclos e minúsculas as leveduras.

Gráfico 7- Resultados de interação do pH inicial entre os ciclos fermentativos e as leveduras utilizadas CAT1 e PE2.



Letras maiúsculas correspondem a tratamentos e minúsculas as leveduras.

Gráfico 8- Resultados de interação do pH final entre os tratamentos e as leveduras utilizadas CAT1 e PE2.

Comparando os tratamentos no final das fermentações observamos que a quando utilizado a levedura CAT1 as médias de pH foram maiores a testemunha

teve um pH maior comparado com a própolis que foi intermediária e a ampicilina que obteve um menor pH. Quando utilizado a levedura PE2 manteve seu pH menor comparada com a CAT1 e nos tratamentos, fermentações com ampicilina obteve um maior pH (Gráfico 8).

Na fermentação alcoólica ocorre com a degradação de açúcares do mosto, quanto mais açúcares degradados melhor a fermentação. Com isso analisou-se o teor de açúcares redutores do mosto inicial de 12,44 g/100g para estirpe CAT1 e 12,82 g/100g para PE2 (Tabela 1), comparado com o Açúcares Redutores Residuais Totais (ARRT) dos vinhos, verificaram-se reduções significativas para os tratamentos com adição de ampicilina ($p > 0,05$), observando que neste tratamento as leveduras foram capazes de metabolizar grande parte do açúcar do mosto (Gráfico 9).

Com relação ao comportamento das estirpes, verificou-se que a levedura CAT1 apresentou maiores valores de ARRT (Açúcares Redutores Residuais Totais), quando comparada com a levedura PE2 (Gráfico 10).

Houve uma interação entre leveduras e ciclos fermentativos, mostrando que nos 3 primeiros ciclos fermentações utilizando a leveduras PE2 obteve menores valores de ARRT, e no 4º, 5º e 6º ciclos não houve diferenças significativas (Gráfico 10). No 3º ciclo houve um aumento do valor, enquanto no 4º ciclo esse número foi reduzido, esse comportamento está relacionado com a limpeza das dornas que foram realizadas no final do 3º ciclo, retirando células mortas, materiais inertes e contaminantes, favorecendo a fermentação. Em relação ao comportamento das leveduras em cada tratamento, verificou-se que tanto na

estirpe CAT1 quanto a PE2, os tratamentos com ampicilina apresentaram menores valores de ARRT (Açúcares Redutores Residuais Totais) quando comparado com os tratamentos de mosto testemunha e mosto com extrato de própolis, porém não alterando a qualidade e composição do destilado (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados da análise de variância das médias de ARRT (Açúcares Redutores Residuais Totais), Glicerol e Teor alcoólico dos vinhos.

	ARRT	Glicerol
Biocidas (A)	(%)	(mg 100mL⁻¹)
1 Testemunha	0,10 a	107,81 a
2 Própolis	0,10 a	112,25 a
3 Ampicilina	0,06 b	101,14 a
F (A)	10,83 **	2,41 ^{ns}
DMS (5%)	0,02	12,17
1 PE2	0,07 b	113,67 a
2 CAT1	0,11 a	100,46 b
F (B)	21,55 **	10,10 **
DMS (5%)	0,01	8,28
Ciclos (C)		
1 ciclo	0,11 a	102,37 a
2 ciclo	0,08 ab	101,98 a
3 ciclo	0,10 ab	108,79 a
4 ciclo	0,08 ab	122,07 a
5 ciclo	0,07 b	104,10 a
6 ciclo	0,08 ab	103,09 a
F (C)	2,90 *	2,32 ^{ns}
DMS (5%)	0,03	21,07
AXB	0,53 ^{ns}	1,13 ^{ns}
AXC	0,88 ^{ns}	0,22 ^{ns}
BXC	3,41**	1,01 ^{ns}
AXBXC	0,47 ^{ns}	0,73 ^{ns}
	44,50	20,16

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

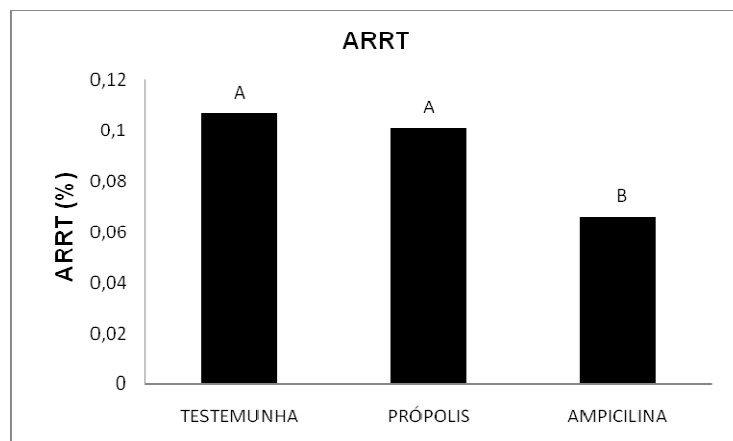
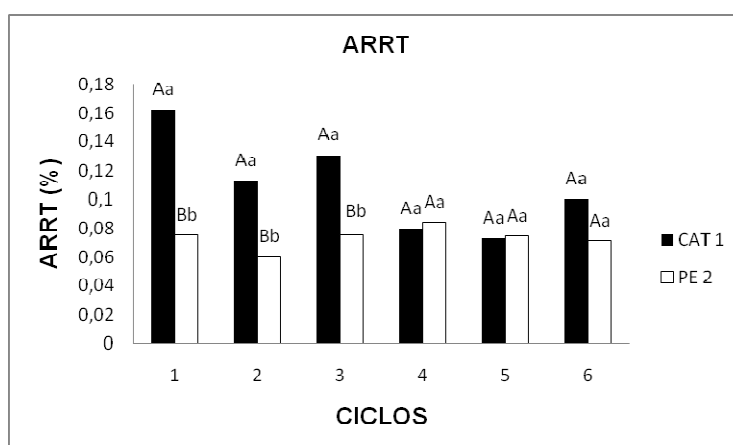


Gráfico 9- Resultados médios de ARRT para os tratamentos avaliados.



Letras maiúsculas correspondem a ciclos e minúsculas as leveduras.

Gráfico 10- Resultados de interação do ARRT entre os ciclos e as leveduras utilizadas CAT1 e PE2. Letras maiúsculas correspondem a ciclos e minúsculas as leveduras.

Como resultando do controle das contaminações observou-se que a produção de glicerol se manteve na média, porém no tratamento com ampicilina este resultado foi menor, mas não significativo (Tabela 3). Comportamento

contrário foi obtido por CHERUBIN (2003) avaliando os efeitos da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica.

Fermentações utilizando a levedura CAT1 produziu menores valores de glicerol quando comparada com a levedura PE2, com isso indicamos que a levedura CAT1 estava mais eficiente à fermentação (Gráfico 11).

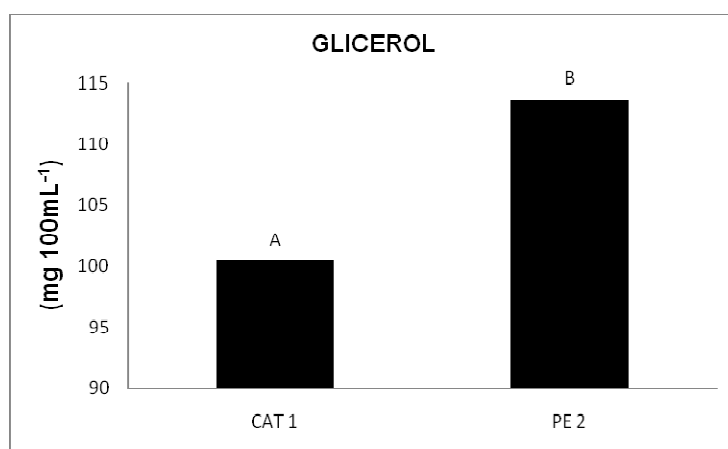


Gráfico 11- Resultados médios de glicerol nas fermentações com as leveduras utilizadas CAT1 e PE2.

4.2. Viabilidade de células, Brotamento e Viabilidade de Brotos

Foram analisadas as médias de viabilidade de leveduras nos tratamentos iniciais que ocorreram 30 minutos após a segunda alimentação das dornas que apresentou uma viabilidade celular em torno de 87%, ocorrendo uma pequena redução para 86% no final dos ciclos (Tabela 4).

A viabilidade das leveduras é um fator essencial no processo fermentativo, sendo estas responsáveis pela fermentação, tendo a função de degradar os açúcares do meio e converte-los em etanol e subprodutos. Quanto maior a viabilidade, melhor o desempenho fermentativo. Para uma fermentação eficiente é necessário que as estirpes apresentem uma viabilidade de 80 a 100% de células viáveis. As estirpes utilizadas na fermentação corresponderam as expectativas, mantendo ao longo dos ciclos, células viáveis entre 80 a 95.

Tabela 4. Resultados da análise de variância das médias de viabilidade celular no inicial e final (%) das fermentações.

	Viabilidade Inicial	Viabilidade Final
Biocidas (A)	(%)	(%)
1 Testemunha	86,17 a	84,56 a
2 Própolis	86,81 a	83,99 a
3 Ampicilina	87,40 a	86,92 a
F (A)	0,24 ^{ns}	1,18 ^{ns}
DMS (5%)	4,26	4,84
Inóculos (B)		
1 PE2	84,16 b	84,01 a
2 CAT1	89,42 a	86,31 a
F (B)	13,06*	1,95 ^{ns}
DMS (5%)	2,90	3,29
Ciclos (C)		
1 ciclo	83,40 a	84,75 a
2 ciclo	84,61 a	84,91 a
3 ciclo	85,78 a	83,93 a
4 ciclo	88,59 a	87,76 a
5 ciclo	89,59 a	84,27 a
6 ciclo	88,79 a	85,33 a
F (C)	2,03 ^{ns}	0,45 ^{ns}
DMS (5%)	7,38	8,37
AXB	0,45 ^{ns}	0,54 ^{ns}
AXC	0,19 ^{ns}	0,73 ^{ns}
BXC	0,56 ^{ns}	0,81 ^{ns}
AXBXC	0,70 ^{ns}	0,29 ^{ns}
CV%	8,71	10,08

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

De acordo com pesquisas de OLIVA-NETO & YOKOYA, (1997), o principal indicador de estresse na levedura é a viabilidade celular. BREGAGNOLI (2006) evidenciou que os mostos tratados com extrato de própolis ou solução de ampicilina não contribuem para o estresse das leveduras.

Foi avaliado o comportamento de viabilidade celular dos tratamentos no início e final das fermentações em todos os ciclos fermentativo, onde se concluiu que não houve diferenças significativas entre as estirpes utilizadas (Tabela 4).

Porém no período final e ao longo dos ciclos, houve um aumento na viabilidade celular, pois controlando a contaminação bacteriana propicia um aumento na qualidade do fermento, concordando assim com AMORIM (1982) que verificou redução da infecção das dornas de níveis de 10^{-9} para 10^{-6} bactérias/mL resultando em aumento na porcentagem de fermento de 3 a 4% para 11 a 12% (v/v).

A porcentagem de fermento ao longo dos ciclos se manteve em crescimento constante, porém observou-se um aumento significativo no início e final do 4º ciclo, pois ao final do 3º ciclo, efetuou-se a limpeza de dorna, retirando assim resíduos como células mortas e terra, os quais prejudicam o desempenho das leveduras.

Tabela 5. Resultados da análise de variância das médias brotamento celular (%) inicial das fermentações.

	Brotamento Inicial	Brotamento Final
Biocidas (A)	(%)	(%)
1 Testemunha	30,16 a	28,64 a
2 Própolis	29,68 a	41,87 b
3 Ampicilina	30,11 a	31,10 a
F (A)	0,01 ^{ns}	3,13*
DMS (5%)	10,07	13,46
Inóculos (B)		
1 PE2	30,69 a	32,27 a
2 CAT1	29,27 a	35,47 a
F (B)	0,17 ^{ns}	0,48 ^{ns}
DMS (5%)	6,85	9,15
Ciclos (C)		
1 ciclo	30,52 a	35,45 a
2 ciclo	25,27 a	35,68 a
3 ciclo	31,08 a	35,17 a
4 ciclo	35,48 a	38,37 a
5 ciclo	28,44 a	28,16 a
6 ciclo	29,22 a	30,41 a
F (C)	0,63 ^{ns}	0,46 ^{ns}
DMS (5%)	17,43	23,39
AXB	0,21 ^{ns}	2,48 ^{ns}
AXC	0,14 ^{ns}	0,09 ^{ns}
BXC	0,72 ^{ns}	1,03 ^{ns}
AXBXC	0,14 ^{ns}	0,07 ^{ns}
CV%	59,56	70,46

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

Dentre as estirpes utilizadas, a CAT1 apresentou uma maior porcentagem de viabilidade celular, diferindo significativamente quando comparada à levedura PE2 no início e fim das fermentações (Gráfico 12).

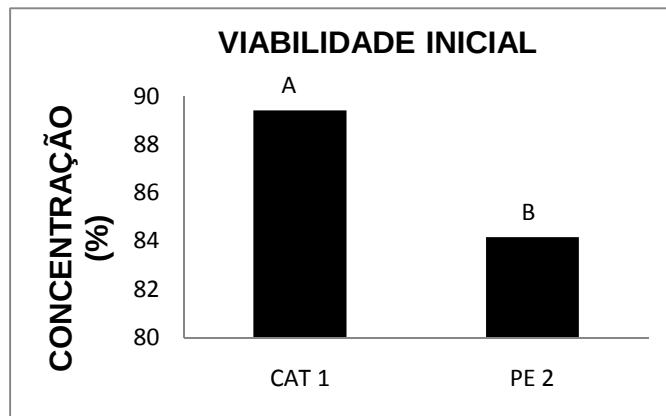


Gráfico 12- Resultados das médias de viabilidade de células (%) inicial das fermentações, comparando as estirpes utilizadas.

O brotamento inicial foi em torno de 30% no início da fermentação tendo uma redução significativa no final apenas no tratamento testemunha e aumento de brotação celular nas fermentações com própolis e ampicilina (Gráfico 13).

O brotamento celular não diferiu significativamente entre as estirpes e ciclos fermentativos (Tabela 5).

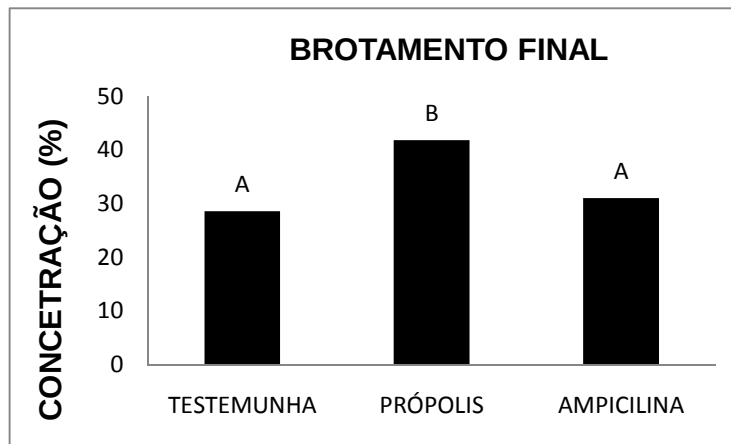


Gráfico 13- Resultados das médias de brotamento celular (%) final das fermentações, comparando os tratamentos.

A viabilidade de brotos inicial foi em torno de 90 % não diferenciando no início e fim das fermentações (Tabela 6). Em fermentações utilizando a estirpe CAT1 diferiu tanto no início quanto no fim das fermentações com maior índice de viabilidade de brotos (Gráfico 14 e 15), comparada com a estirpe de levedura PE2. Entre os ciclos fermentativos não houve diferenças significativas (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados da análise de variância das médias de viabilidade de brotos (%) inicial e final das fermentações.

	Viab.de Brotos Inicial	Viab. de Brotos Final
Biocidas (A)	(%)	(%)
1 Testemunha	88,61 a	87,31 a
2 Própolis	87,83 a	86,45 a
3 Ampicilina	91,36 a	90,24 a
F (A)	1,12 ^{ns}	0,90 ^{ns}
DMS (5%)	5,92	7,09
Inóculos (B)		
1 PE2	84,30 b	85,36 b
2 CAT1	94,24 a	90,63 a
F (B)	24,15 **	4,73 *
DMS (5%)	4,03	4,82
Ciclos (C)		
1 ciclo	90,59 a	89,27 a
2 ciclo	89,16 a	87,25 a
3 ciclo	84,45 a	85,84 a
4 ciclo	88,68 a	90,42 a
5 ciclo	92,38 a	87,16 a
6 ciclo	90,34 a	88,05 a
F (C)	1,18 ^{ns}	0,30 ^{ns}
DMS (5%)	10,25	12,28
AXB	0,16 ^{ns}	0,68 ^{ns}
AXC	1,45 ^{ns}	0,22 ^{ns}
BXC	0,47 ^{ns}	1,99 ^{ns}
AXBXC	0,68 ^{ns}	0,40 ^{ns}
CV%	11,77	14,29

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

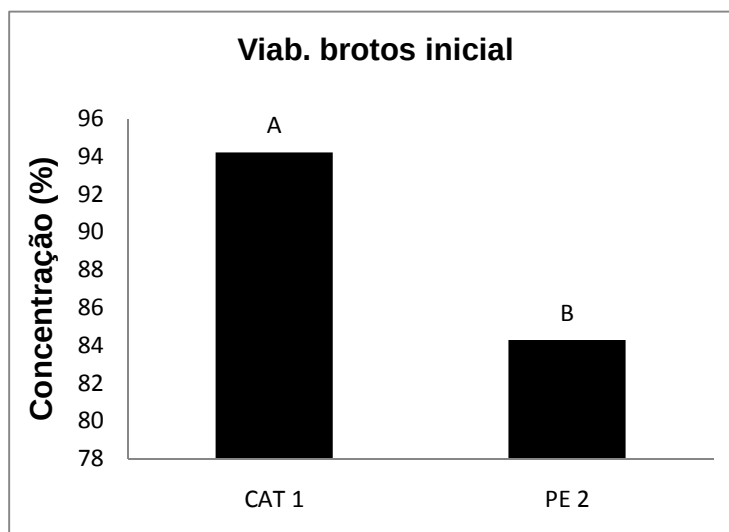


Gráfico 14- Resultados das médias de viabilidade de brotos (%) inicial das fermentações, comparando as estirpes utilizadas.

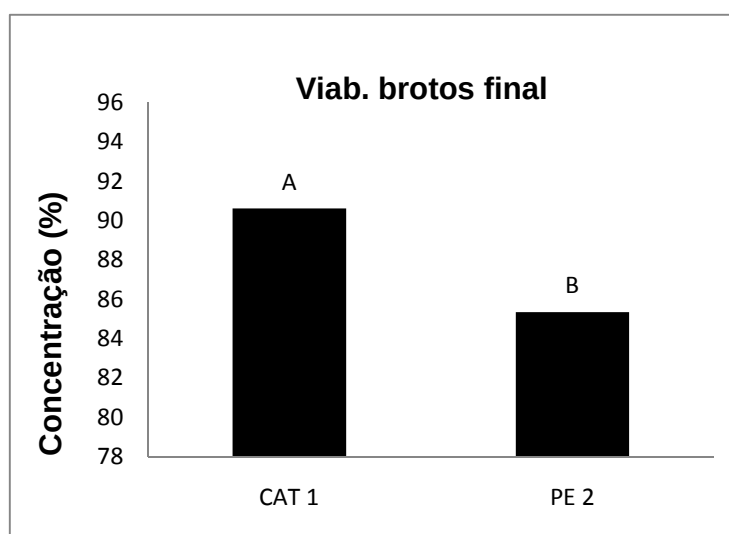


Gráfico 15- Resultados das médias de viabilidade de brotos (%) final das fermentações, comparando as estirpes utilizadas.

4.3. Compostos Secundários

Os compostos secundários analisados por cromatografia gasosa apresentaram valores que não diferiram entre si em ambos biocidas utilizados. Para os compostos como: Etanol, valores entre 23 e 25% (v/v), n-propílico, valores entre 66 e 83 mg 100 mL⁻¹, Isobutílico, valores entre 130 e 134 100 mg mL⁻¹, Isoamílico 334 e 349 mg 100 mL⁻¹, Acetaldeído, valores entre 14 e 29 mg 100 mL⁻¹, Acetato de Etila, valores entre 99 e 110 mg 100 mL⁻¹ (Tabela 7).

Considerando-se os componentes secundários, (Tabela 7) verificou-se concentrações superiores de acetato e etila na testemunha e de acetaldeído no tratamento com ampicilina, isto deve-se a alterações no metabolismo causados pelos compostos contidos neste antibiótico sintético, porém estatisticamente este resultado não é significativo.

Tabela 7. Análise de variância de alcoóis do destilado 100mg/mL (a.a.).

Biocidas (A)	Etanol	Acetaldeído	Acetato de Etila	Isoamilico	Isobutílico	n-Propílico
1 Testemunha	24,18 a	23,27 a	109,21 a	334,90 a	130,96 a	83,01 a
2 Própolis	23,71 a	15,26 a	93,89 a	343,75 a	129,15 a	73,84 a
3 Ampicilina	24,36 a	28,57 a	99,18 a	348,85 a	133,93 a	66,39 a
F (A)	0,20 ^{ns}	0,50 ^{ns}	0,89 ^{ns}	0,11 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,77 ^{ns}
DMS (5%)	2,59	32,64	28,46	74,26	23,30	32,79
Inóculos (B)						
1 PE2	24,70 a	31,35 a	109,57 a	323,25 a	112,39 b	101,32 a
2 CAT1	23,47 a	13,38 a	91,95 a	361,75 a	150,31 a	47,51 b
F (B)	2,02 ^{ns}	2,72 ^{ns}	3,43 ^{ns}	2,41 ^{ns}	23,74 ^{**}	24,12 ^{**}
DMS (5%)	1,75	22,11	19,28	50,31	15,78	22,21
Ciclos (C)						
1 ciclo	21,86 b	13,09 a	85,18 a	343,50 a	138,21 a	79,96 a
3 ciclo	24,85 a	24,54 a	107,14 a	363,64 a	131,60 a	76,42 a
6 ciclo	25,55 a	24,54 a	109,97 a	320,36 a	124,24 a	66,87 a
F (C)	6,84 ^{**}	0,79 ^{ns}	2,72 ^{ns}	1,02 ^{ns}	1,07 ^{ns}	0,51 ^{ns}
DMS (5%)	2,59	32,64	28,46	74,26	23,30	32,79
AXB	0,11 ^{ns}	0,50 ^{ns}	0,23 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,44 ^{ns}	0,49 ^{ns}
AXC	0,77 ^{ns}	0,62 ^{ns}	0,54 ^{ns}	0,18 ^{ns}	0,38 ^{ns}	0,01 ^{ns}
BXC	0,03 ^{ns}	0,40 ^{ns}	0,91 ^{ns}	2,30 ^{ns}	2,57 ^{ns}	0,30 ^{ns}
AXBXC	0,14 ^{ns}	0,76 ^{ns}	0,44 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,27 ^{ns}	0,08 ^{ns}
CV%	13,20	179,08	34,66	26,61	21,77	54,09

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

Segundo a lei normativa vigente o máximo de aldeídos permitido na produção de álcool anidro é 30 mg/100mL, com isso no tratamento com ampicilina o resultado foi próximo ao limite permitido (28,57 mg/100mL), já no tratamento com própolis a média foi de 15,26 mg/100mL.

Quando comparando as leveduras CAT1 e PE2 os resultados para a produção de etanol foram semelhantes, porém a levedura PE2 apresentou maior porcentagem de acetaldeídos e acetato de etila. Este comportamento pode ser resultante de fatores, tais como, o metabolismo apresentado pelas linhagens de leveduras predominantes no processo fermentativo (FRAILE et. al. 2000; ESTEVES et. al. 2004) e a concentração de aminoácido no mosto, que neste estudo não quantificado.

Considerando-se os alcoóis superiores (Tabela 6) verificou-se concentrações superiores no isobutílico, propílico e isoamílico.

Para REAZIN et al. (1973) os alcoóis propílico, amílico e isoamílico são produzidos pelas leveduras, em parte pelo metabolismo da treonina.

Neste estudo as maiores concentrações médias obtidas foram no isobutílico: 112,39 mg/100mL (álcool anidro (a.a.)) (PE2) e 150,31 mg/100mL (a.a.) (CAT1) (Gráfico 17); n-propílico: 101,32 mg/100mL (a.a.) (PE2) e 47,51 mg/100mL (a.a.) (CAT1) (Gráfico 18) e isoamílico 323,25 mg/100mL (a.a.) (PE2) e 361,75 mg/100mL (a.a.) (CAT1), com estes resultados pode se observar que há diferenças significativas na produção de alcoóis superiores, isto se da devido as diferenças no metabolismo de cada levedura.

Resultados semelhantes em relação ao n-propílico foram obtidos por SUOMALAINEN & LEHTONEN (1979), que verificaram variação considerável nas quantidades de alcoóis conforme a levedura utilizada na fermentação (Tabela 7).

Considerando-se que a produção de acetato de etila no tratamento com a própolis foi menor, podemos concluir que a acidez deste tratamento também foi menor, pois segundo estudo realizado por CAMOLEZ (2004), a produção de alcoóis superiores e a acidez do vinho estão intimamente ligados. De modo semelhante CLETO (1997) deduziu que a maior concentração de íons H^+ nos meios mais ácidos, implicou em uma maior absorção desses íons pelas leveduras, influenciando nas reações internas de esterificação. A concentração média de acetato de etila obtida neste estudo (8,08 mg/L) foi inferior aos resultados encontrados neste estudo por FRAILE et al. (2000) na ordem de 24,3 a 32,1 mg/L em avaliação de três linhagens de ***S. cerevisiae*** em fermentação de vinhos.

Estudos realizados por CLETO & MUTTON (1997) concluem que quanto maior a acidez do vinho, maior a concentração do acetato de etila, confirmando assim o resultado deste trabalho, em que as fermentações utilizando a estirpe PE2 apresentou maior acidez e teor de acetato de etila (Tabela 7).

Em relação a concentração do etanol nos ciclos fermentativos não houve diferenças significativas, onde observou um aumento uniforme, desde o 1º ao 6º ciclos (Gráfico 16).

Composto como o metanol não foi observado nas amostras analisadas, o que pode estar relacionado com o preparo de mosto, onde o caldo foi previamente

clarificado, retirando impurezas como terra e contaminantes, que por hidrólise ácida é responsável pela formação do metanol na fermentação.

Este composto é formado a partir da hidrólise ácida da pectina durante a fermentação. Como neste ensaio o caldo utilizado para preparo do mosto foi previamente clarificado, retirando impurezas minerais e vegetais que poderiam ser responsáveis, que por hidrólise ácida é responsável pela formação desse composto.

Segundo REAZIN (1973), os alcoóis propílico, amílico e isoamílico, são produzidos em parte pelo aminoácido treonina, e que estão associados com a variação de pH do meio.

Com base nos resultados obtidos verificou-se que o uso de própolis como biocida natural não interfere na composição e qualidade do destilado produzido.

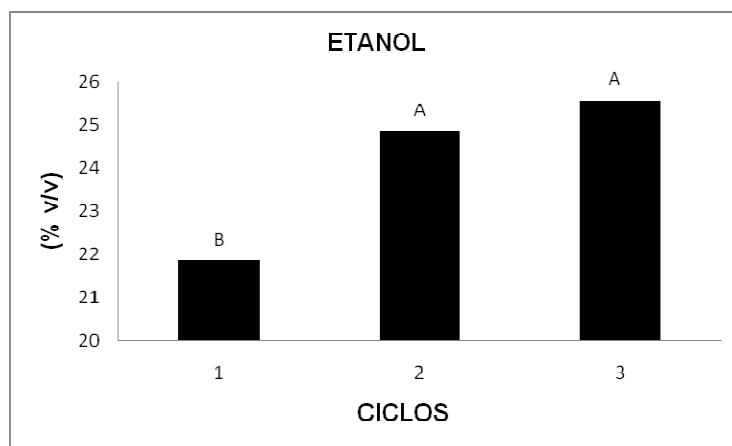


Gráfico 16- Resultados médios de etanol (% v/v) produzido nos ciclos fermentativos.

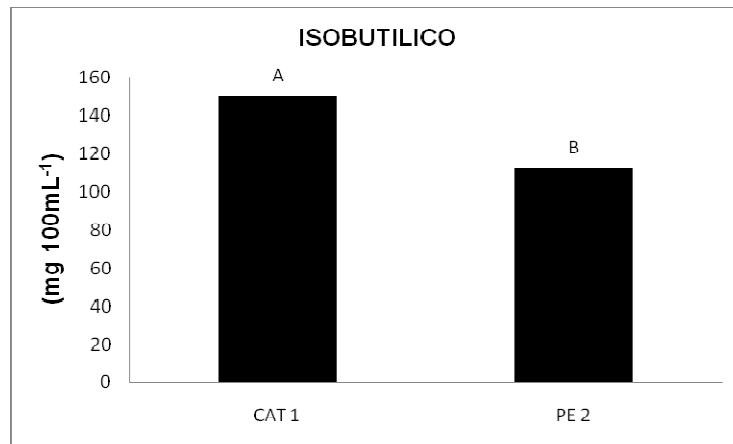


Gráfico 17- Resultados médios de isobutílico (mg/100mL) no destilado quando utilizou as leveduras CAT1 e PE2 nas fermentações.

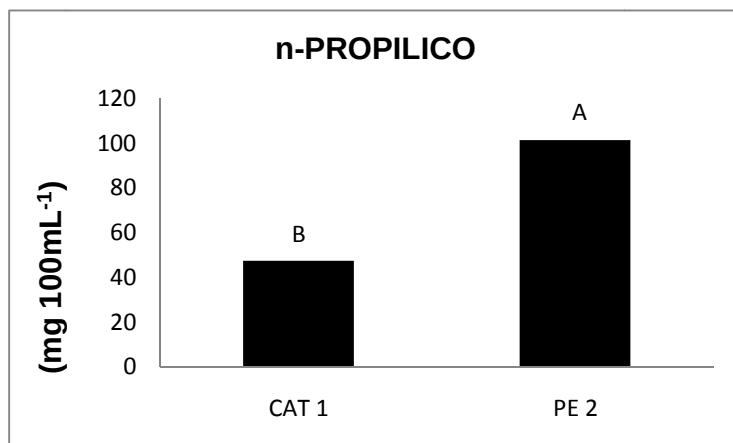


Gráfico 18- Resultados de n-propílico (mg/100mL) no destilado quando utilizou as leveduras CAT1 e PE2 nas fermentações.

4.4. Rendimento Fermentativo

Em relação aos biocidas utilizados não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, mostrando que tanto a o uso da própolis quanto da ampicilina são eficiente no processo fermentativo, observando os valores de testemunha (87,48 %), Própolis (91,49 %) e Ampicilina (89,43 %) no destilado (Gráfico 19).

Fermentações utilizando a estirpe de levedura PE2 (90,50 %) apresentaram maior rendimento, porém não diferenciou significativamente da CAT1 (88,40 %). Nos ciclos fermentativos os valores variaram de 1º ciclo (81,43 %) e 2º (92,84 %) 3º ciclo (94,80 %) tendo a melhor eficiência no 6º (Gráfico 21).

CAMOLEZ (2004), avaliou os microrganismos contaminantes da produção de álcool e seus reflexos sobre o processo fermentativo avaliando também o rendimento fermentativo onde foi observado a melhor eficiência foi no período de meio de safra, no qual o pico de maturação da cana-de-açúcar, melhores condições de manejo, ausência de chuvas e continuidade no processamento da matéria-prima.

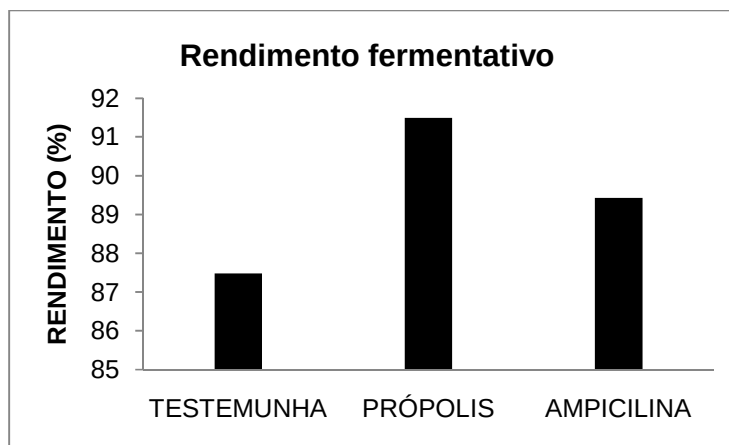


Gráfico 19- Resultados de rendimento fermentativo alcoólico nos tratamentos

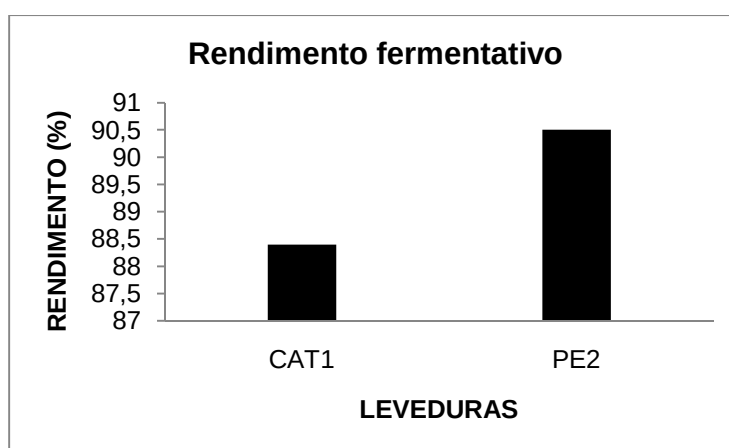


Gráfico 20- Resultados médios de rendimento fermentativo alcoólico nas fermentações utilizando as leveduras CAT1 e PE2.

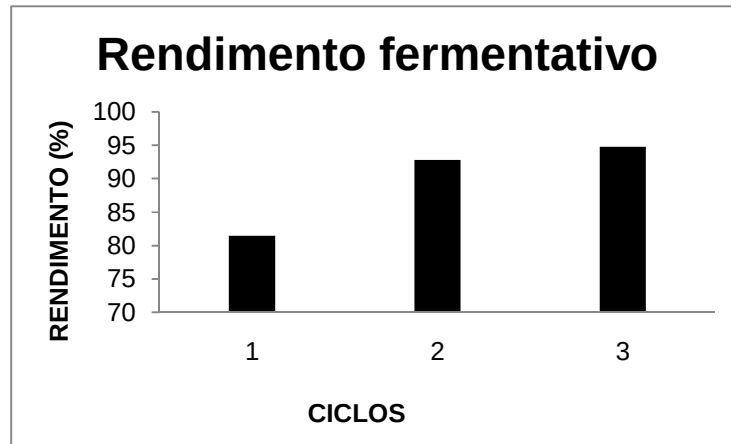


Gráfico 21- Resultados médios de rendimento fermentativo alcoólico nos ciclos fermentativos.

5. CONCLUSÕES

- O uso de antibiótico natural não afeta a composição e a qualidade do destilado.
- As estirpes de leveduras utilizadas nas fermentações demonstraram o mesmo rendimento alcoólico as condições do ensaio.

6. REFÊRENCIAS

AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NARAGIMA, S. **Isolation and identification on of antimicrobial compounds in Brazilian propolis.** Bioscience. Biotechnology. Biochemistry. Tokyo, v. 58, n. 5, p. 945-946, 1994.

ALCARDE, A.R., BASSO, L.C. **Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização.** Scientia Agrícola, v. 54, n. 3, 189-194, 1997.

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

AMORIM, H.V. & LEÃO, R.M. **Fermentação Alcoólica: ciência e tecnologia.** Piracicaba: Fermentec, 2005, 448p.

ANDRADE-SOBRINHO, L. G.; BOSCOLO, M.; LIMA-NETO, B.; FRANCO, D. W. **Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa).** Quimica Nova, v. 36, n. 6b, p. 165-169, 2003.

ANDRIETTA, S. R.; MIGLIARI, P. C.; ANDRIETTA, M. G. S. **Classificação das cepas de levedura de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa.** STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos, Piracicaba, v. 17, n. 5, p. 54-59, 1999.

BANKOVA, V.; MARCUCCI, M.C.; SIMOVA, S.; NIKOLOVA, N.; KUJUMGIEV, A. **Antibacterial Diterpenic Acids from Brazilian própolis**. Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences, Tuhingem, v. 51, n. -5-6, p. 277-280, 1996.

BARBOSA, J.C.; MALDONADO JR, W.; **AgroEstat**, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias). Unesp – Jaboticabal-SP, Versão 1.0, 2009.

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

BIANCHINI, L. & BEDENDO, I.P. **Efeito antibiótico do própolis sobre bactérias fitopatogênicas**. Scientia Agrícola, Piracicaba, v.55, n.1, 1998.

BREGAGNOLI, F.C.R. **Comportamento fisiológico de microrganismos submetidos à biocidas convencional e natural na produção de cachaça orgânica**. (Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias). Unesp, Jaboticabal – SP, 2006, p. 69.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 13, de 29 de junho de 2005. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF, 30 de Junho de 2005, Seção 1, p. 3.**

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, 1999.

CAMOLEZ, M.A. **Microorganismos contaminantes e seus reflexos na produção de etanol**. (Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias). Unesp, Jaboticabal – SP, 2004, p. 62.

CARDOSO, M. das G. Análises físico-químicas de aguardentes. In: CARDOSO, m. das G. **Produção de aguardente**. Lavras: UFLA, 2001. P. 152-173.

CECCATO-ANTONINI, S.R. & SILVA, D.F. **Eficiência de meios diferenciais no isolamento de cepas de leveduras de processos industriais de fermentação alcoólica**. STAB, Piracicaba, v.18, n.4, p.40-46, 2000.

CECCATO-ANTONINI, S.R. **Guia prático de microbiologia**. Araras: UFSCar, 1996. 58p.

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

CLETO, F.G.V. **Influência da adição de ácido sulfúrico e fubá de milho no processo fermentativo, rendimentos e composição da aguardente de cana**. (Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias). Unesp, Jaboticabal – SP, 1997, p. 109.

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

CLETO, F.V.G; MUTTON, M.J.R. **Rendimento e qualidade da aguardente de cana produzida utilizando fermento tratado com ácido e fubá de milho.** Stab – Açúcar e Subprodutos, v.16, n.2, p. 38-40, 1997.

CONAB, 2009, www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3cana_09.pdf acessado em 04/01/2010.

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

COPERSUCAR. Fermentação. Piracicaba. Centro de Tecnologia Copersucar, 1987, 390p.

CRISAN, I. Natural própolis extract NIVCRISOL in the treatment of acute and chronic rhinopharyngitis in children. **Romonian Journal Virology, Bucureste, v. 46, n. 3-4, p. 115-33, 1995.**

CROWELL, E. A. et al. Techniques for studying the mechanism of higher alcohol formation by yeast. **American Journal Enology and Viticulture. V. 12, p. 111-6, 1961.**

ENGAN, S. The influence of some amino acids on the formation of higher aliphatic alcohol and esters. **Journal of the institute of Brewing, v. 76, p. 254-6, 1970.**

FERNANDES JUNIOR, A.; LOPES, M.M.R.; COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A.C.M.; VIEIRA, E.P. **Atividade antimicrobiana de própolis de Apis melífera obtidas em três regiões do Brasil.** Ciência Rural, .36:294-297, 2006.

FERREIRA, L.V., AMORIM, H.V., BASSO, L.C. Fermentação de trealose e glicogênio endógenos em *Sacharomyces cerevisiae*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1999.**

FIALHO, C.J. Avaliação da estabilidade de leveduras selecionadas para a produção de cachaça. **2004. (Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias). Unesp, Jaboticabal – SP, 2006, p. 90.**

FRAILE, P.; GARRIDO J.; ANCIN C. Influence of a *Saccharomyces cerevisiae* selected strain in the volatile composition of roses wines. Evolution during fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, v. 48, n. 5, p. 1789-1798, 2000.**

GOMES, F.C.O., PATARO, C., GUERRA, J.B., NEVES, M.J., CORRÊA, S.R., MOREIRA, E.S., ROSA, C.A. Physiology diversity and trehalose accumulation in *Schizosaccharomyces pombe* strains isolated from spontaneous fermentations during the production of the artisanal Brazilian cachaça. **Can. J. Microbiol., v. 48, p. 399-406, 2002**

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

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

KATIRCIOGLU, H.; MERCAN, M. Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different region. **African Journal of Biotechnology**, v.5, n.11, p.1151-1153, 2006.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, YU.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. **Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin.** Journal of Ethnopharmacology, 64, (1999) 235-240.

LANE & EYNON. Determination of reducing sugars by fehling solution with methylene blue indicator. **London. Norman Rodger, 1934, 8p.**

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

MAIA, A.D.R.A. (Coord); PEREIRA, A.J.G.; SCHAWABE, W. – Produção artesanal de aguardente de qualidade. **Belo Horizonte: AMPAQ, 1995. 104 p. (Curso Associação Mineira de produtos de aguardente de qualidade)**

MUTTON, M.J.R. Avaliação da fermentação etanólica do caldo de cana-de-açúcar (*Saccharum ssp*) tratada com maturadores químicos. **178f. Tese (Livre – Docência) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1998.**

MUTTON, J.R.; MUTTON, M.A. Aguardente de Cana: Produção e Qualidade. **FUNEP: Jaboticabal, 1992. 171p.**

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v.31, n.4, 2000.**

NIKANEN, L. & NIKANEM, I. Distilled beverages. In: **MAARSE, H. (Ed.) Volatile compounds in food and beverages.** New York: Marcel Dekker, Inc., 1991. P. 548-580.

NOVAES, F. V. et al. I Curso de extensão em tecnologia de aguardente de cana. Piracicaba: ESALQ, 1974. 104 p.

NOVAES, F. V. Controle Operacional da Destilaria de Aguardente. In: **MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. (Ed)** Aguardente de Cana – produção e qualidade. Jaboticabal: FUNEP, 1992. P. 49-66.

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

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and Lactic Acid Bacteria from the alcohol industry to several Antimicrobial compounds. **Brazilian Journal of Microbiology, v. 32, nº 1, p.10-14, 2001.**

PIGGOTT, J.K. et al. The science and techonology of whiskies. New York; Longman, 1989.

POTTER, N.N. Food science. Westport: Avi, 1980, p. 653.

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

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

REAZIN, G.; SALES H.; ANDREASEN A. **Production of higher alcohols from threonine and isoleucine in alcoholic fermentations of different types of grain mash.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, v. 21, n. 1, p. 50-54, 1973.

SOUSA, J.P.B.; FURTADO, N.A.J.C.; JORGE, R.; SOARES, A.E.E.; BASTOS, J.K. Perfis físico-químico e cromatográficos de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia, João Pessoa, v.17, n.1, 2007.**

SUOMALAINEN, H. LEHTONEN, M. **The production of aromatic compounds by yeast.** Journal Institute of Brewing, v, 85, p. 149-156, 1979.

STUPIELLO, J.P. **Produção de Aguardente: Qualidade da matéria-prima.** In: MUTTON, M.J.R.; MUTTON, M.A. **Aguardente de cana: Produção e Qualidade.** Jaboticabal: FUNEP, 1992. p.9-12.

STUPIELLO, J.P., HORII, J. **Considerações sobre tratamentos de caldo de cana para a fermentação alcoólica.** Álcool & Açúcar, v.2, n. 3, p. 40-6, 1982.

THOMAS, K. C., Hynes S. H.; INGLEDEW W. M. **Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash.** Journal of Applied Microbiology, Oxford, v. 90, n. 5, p. 819-828, 2001.

VASCONCELOS, J. N. **Influência do pH do mosto sobre o desempenho da fermentação alcoólica desenvolvida por leveduras livre e imobilizada em colmos de cana-de-açúcar.** STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos, Piracicaba, v. 18, n. 2, p. 52-52, 1999.

VILLELA, L.G.V. Fermentação etanólica para produção de cachaça: reflexos da qualidade da matéria-prima e do inóculo. **(Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias). Unesp, Jaboticabal – SP, 2003, p. 56.**

WEBB, A.D., INGRAHAM, J.L. Fusel oil. *Advances in Applied Microbiology*, v. 5, p. 317-353, 1963.

YOKOYA. Efeito da densidade celular no metabolismo de leveduras. In: Usinas de açúcar e álcool: estudo das leveduras e dos fatores que afetam a fermentação. **Campinas, 1995, 215p.**