



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL**

**AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DO CALDO DE
DIFERENTES VARIEDADES E PARTES DO COLMO DA CANA-DE-
AÇÚCAR SOB MANEJO ORGÂNICO**

CRISTINA MARTINI

**Araras
(2009)**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL**

**AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DO CALDO DE
DIFERENTES VARIEDADES E PARTES DO COLMO DA CANA-DE-
AÇÚCAR SOB MANEJO ORGÂNICO**

CRISTINA MARTINI

ORIENTADOR: PROFa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

CO-ORIENTADOR: PROF. Dr. LUIZ ANTONIO CORREA MARGARIDO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural como requisito parcial à obtenção do título de **MESTRE EM AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL**

Araras

(2009)

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M386aa

Martini, Cristina.

Avaliação dos aspectos microbiológicos do caldo de diferentes variedades e partes do colmo da cana-de-açúcar sob manejo orgânico / Cristina Martini. -- São Carlos : UFSCar, 2009.
79 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Agroecologia. 2. Levedos. 3. Fermentação. 4. Cana-de-açúcar. 5. Garapa. 6. Manejo orgânico. I. Título.

CDD: 630 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
DE

CRISTINA MARTINI

APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL, DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 14 DE ABRIL DE 2009.

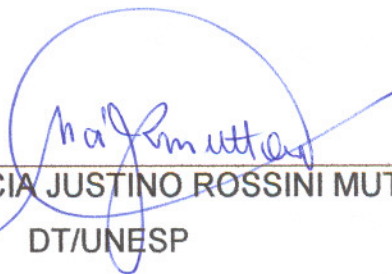
BANCA EXAMINADORA:



Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

ORIENTADORA

PPGADR/UFSCar



Profa. Dra. MÁRCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON

DT/UNESP



Prof. Dr. ANDRÉ RICARDO ALCARDE

ESALQ/USP

“Ninguém está imune de cair, de ver ruir seu patrimônio e muitos de seus sonhos. O importante na vida é o saber se levantar, o reconstruir, o se dar as mãos para ajudar quem está no chão, recolher os cacos e reedificar a vida sem lamentar as ruínas, deixando-as para trás. Idealizar novos sonhos e seguir em frente. É esse o segredo de sair vitorioso e enriquecido de qualquer situação”.

(Ivana Maria França de Negri, Escritora Piracicabana).

DEDICO

Aos meus pais Antônio Francisco Martini e Ida Maria Ferrazzo Martini, à minha irmã Beatriz Martini e à minha avó Domingas (Minga), pelo carinho e amor constantes, além do apoio e confiança durante todo o tempo da realização deste trabalho.

À minha orientadora, Profa. Sandra Regina Ceccato Antonini, pelo voto de confiança, pela oportunidade de fazer parte de sua equipe de pesquisa, pelo apoio e compreensão em todos os momentos, e principalmente por sua fundamental dedicação para o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças para seguir em frente, superando as dificuldades e proporcionando a cada dia novas oportunidades;

À Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini, pelos ensinamentos, orientação, confiança, amizade, carinho e por todo apoio durante a realização deste trabalho;

Ao co-orientador Prof. Dr. Luiz Antonio Correa Margarido, pela orientação e pelas valiosas sugestões;

Aos meus pais que sempre me apoiaram em todos os momentos da minha vida, sem medir esforços; possibilitando a realização de mais uma conquista - "Papai DKV e Mamãe Lela: a ajuda e orientação de vocês foi extremamente essencial, amo muito vocês";

À minha irmã Beatriz (Bia), pela presença constante, fundamental e carinhosa em minha vida, o que me motiva a seguir em frente buscando superar todos os obstáculos;

À minha querida Vó Minga, pela presença nos momentos em que mais precisei, proporcionando a conclusão deste trabalho, me incentivando constantemente com toda sua fé;

Aos meus avós Carmem e Giovanni Ferrazzo (*in memorian*), que mesmo distantes me fortalecem, com a energia da paz, amor e coragem;

Ao meu avô João Martini (*in memorian*), por transmitir esperança e coragem;

Às tias Neca, Iraídes e Ivanilde e aos primos Bete, Luizinho, Berto, Alexandre, Débora e Sandra, pelo apoio e torcida;

Às amigas Andrezza Layanna Francis, Maira Prearo e Zilda (UFSCar), pela amizade tão importante;

À Profa. Silvana P. Meneghin, pelas eventuais dúvidas ao longo do desenvolvimento deste trabalho e principalmente pelo apoio, respeito e amizade;

À Eng^a. Agrônoma Edjane Gonçalves, pela realização das análises estatísticas.

À técnica do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), Lúcia T. Picollo Silva, pelo apoio, carinho e prestatividade ímpares;

À minha “estagiária” Carolina Codato, pela sua dedicação nas análises físico-químicas e microbiológicas;

À toda equipe de amigos do LAMAM, que direta ou indiretamente colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho: Ana Paula, Carol, Cárol, Diogo, Emilie, Fabiano, Fabrícia, Lucínha, Manú, Mônica, Pedro, Wesley, Simone, Vanda, Vanessa, em especial as amigas e companheiras de trabalho constante, Afra Vital, Márcia Rosa e Maria Cristina Meneghin , por toda paciência e compreensão.

Aos funcionários da Seção Agrícola (UFSCar), especialmente aos cortadores de cana, pelo apoio na realização do corte e transporte;

À Profa. Maria Teresa Mendes Ribeiro Borges, por permitir a utilização da estrutura do Laboratório de Análise e Simulação Tecnológica (LAST) e toda equipe pela cordialidade, respeito e amizade;

Aos técnicos do LAST, Cidinho e Renato e as estagiárias Edilaine, Juliana e Renata pela colaboração durante a realização do processamento do caldo da cana-de-açúcar e pela colaboração nas análises físico-químicas;

À Profa. Marta Regina Verruma-Bernardi, pela colaboração, sugestões e incentivo;

À secretária do curso de Agronomia, Vânia Maria de Oliveira, pela amizade e conselhos;

Ao Prof. Dr. Norberto Lavorenti, diretor do Centro de Ciências Agrárias da UFSCar, por sua colaboração;

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural, pelo companheirismo e colaboração durante o curso;

Ao coordenador Prof. Dr. Paulo Beskow e a todos os professores da Pós-Graduação, pela dedicação e preciosos ensinamentos;

À Fapesp, pelo apoio a pesquisa (processo 07/06979-8).

Sumário

	Pag.
ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	Vi
ABSTRACT.....	Viii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 A cana-de-açúcar.....	5
2.2 O fermento para produção de cachaça.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Coleta de amostras e extração do caldo.....	21
3.2 Análises do caldo.....	24
3.2.1 Físico-químicas.....	24
3.2.1.1 Brix.....	24
3.2.1.2 Pol.....	24
3.2.1.3 Açúcar redutor (AR).....	24
3.2.1.4 Açúcar redutor total (ART).....	25
3.2.1.5 Proteína.....	26
3.2.1.6 Acidez.....	26
3.2.1.7 pH.....	26
3.2.1.8 Compostos fenólicos.....	26
3.2.1.9 Pureza.....	27
3.2.2 Microbiológicas.....	27
3.3 Análise estatística.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1 Avaliação das características microbiológicas e físico-químicas do caldo de 10 variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob manejo orgânico.....	30
4.1.1 Análise microbiológica.....	30
4.1.2 Análise físico-química.....	42

4.1.3 Considerações.....	45
4.2 Avaliação das características microbiológicas e físico-químicas do caldo de três variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob manejo orgânico, extraídos de diferentes partes do colmo.....	48
4.2.1 Análise microbiológica.....	48
4.2.2 Análise físico-química.....	56
4.2.3 Considerações.....	64
5 CONCLUSÕES.....	67
6 LITERATURA CITADA.....	68
APÊNDICE.....	77

ÍNDICE DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1. Características das variedades de cana-de-açúcar utilizadas neste trabalho.....	23
Tabela 2. Composição dos meios de cultura utilizados para os isolamentos de leveduras (Ceccato-Antonini, 2004).....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
<p>Figura 1. Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar de 10 variedades cultivadas sob manejo orgânico. Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% entre os parâmetros estudados (variedades em A, períodos em B e meios de cultura em C).....</p>	31
<p>Figura 2. Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar de 10 variedades cultivadas sob manejo orgânico, em diferentes meios de cultura. Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% entre as variedades (legenda na Figura 1.).....</p>	33
<p>Figura 3. Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar de 10 variedades cultivadas sob manejo orgânico, em diferentes períodos de tempo. Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% entre as variedades (legenda na Figura 1.).....</p>	34
<p>Figura 4. Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar de 10 variedades cultivadas sob manejo orgânico, em diferentes meios de cultura, em maio. Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% entre as variedades (legenda na Figura 1.).....</p>	35
<p>Figura 5. Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar de 10 variedades cultivadas sob manejo orgânico, em diferentes meios de cultura, em setembro. Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% entre as variedades (legenda na Figura 1.).....</p>	36
<p>Figura 6. Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar de 10 variedades cultivadas sob manejo orgânico, em diferentes meios de cultura, em dezembro. Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% entre as variedades (legenda na Figura 1.).....</p>	37
<p>Figura 7. Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar de 10 variedades cultivadas sob manejo orgânico, em diferentes meios de cultura, para cada período de tempo analisado. Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% entre os meios de cultura.....</p>	38

Figura 8. Número de leveduras (UFC/mL) isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar de 10 variedades cultivadas sob manejo orgânico, em diferentes meios de cultura, para cada período de tempo analisado. O número de <i>Saccharomyces</i> se refere à subtração dos valores encontrados em Ágar Lisina dos valores em WLN. (Continua.....)	39
Figura 9. Proporção de <i>Saccharomyces</i> (%) no caldo de cana-de-açúcar de 10 variedades cultivadas sob manejo orgânico em três períodos (maio, setembro e dezembro/2007).....	41
Figura 10. Parâmetros físico-químicos analisados no caldo de cana-de-açúcar de 10 variedades cultivadas sob manejo orgânico, em diferentes períodos de tempo (maio, setembro e dezembro/2007). (Continua.....)	43
Figura 11. Comportamento das variedades de cana com relação ao período útil de industrialização (PUI). Fonte: Novaes et al. (1974) apud Nogueira; Venturini Filho, 2005.....	46
Figura 12. Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar extraído de diferentes partes do colmo da cana (1-base, 2-meio e 3-ponta) e três variedades (1-RB72454, 2-RB835486 e 3-RB867515) cultivadas sob manejo orgânico, em três períodos de amostragens (1-maio/2007, 2-setembro/2007, 3-dezembro/2007) utilizando diferentes meios de cultura (1-WLN, 2-WLD e 3-Agar Lisina). Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% dentro de cada parâmetro estudado.....	49
Figura 13. Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar extraído de diferentes partes do colmo da cana (base, meio e ponta) de três variedades (RB72454, RB835486 e RB867515) cultivadas sob manejo orgânico. Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% entre as variedades para cada parte do colmo.....	51
Figura 14. Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar extraído de diferentes partes do colmo da cana usando meios de cultura geral (WLN) e seletivos (WLD e Agar Lisina) a partir de três variedades (RB72454, RB835486 e RB867515) cultivadas sob manejo orgânico. Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% entre as variedades para cada meio de cultura.....	52

- Figura 15.** Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar em três períodos (maio, setembro e dezembro/2007), a partir de três variedades (RB72454, RB835486 e RB867515) cultivadas sob manejo orgânico. Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% entre as variedades para cada período de tempo..... 52
- Figura 16.** Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar extraído de diferentes partes do colmo (base, meio e ponta) de três variedades cultivadas sob manejo orgânico, usando meios de cultura geral (WLN) e seletivos (WLD e Agar Lisina. Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% entre as partes do colmo da cana para cada meio de cultura..... 53
- Figura 17.** Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar extraído de diferentes partes do colmo (base, meio e ponta) de três variedades cultivadas sob manejo orgânico, em três períodos (maio, setembro, dezembro/2007). Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% entre as partes do colmo para cada período de tempo..... 53
- Figura 18.** Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar utilizando meios de cultura geral (WLN) e seletivos (WLD e Agar Lisina) em três períodos de amostragens (maio, setembro e dezembro 2007), a partir de três variedades cultivadas sob manejo orgânico. Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% entre os meios de cultura para cada período de tempo..... 54
- Figura 19.** Proporção de *Saccharomyces* (%) encontrada no caldo de cana-de-açúcar extraído de diferentes partes do colmo da cana (base, meio e ponta), a partir de três variedades (RB72454, RB835486 e RB867515) cultivadas sob manejo orgânico, em três períodos (maio, setembro e dezembro/2007). O número de leveduras *Saccharomyces* foi deduzido a partir dos números encontrados no meio WLN e no meio Agar Lisina, como descritos em Material e Métodos..... 55
- Figura 20.** Parâmetros físico-químicos analisados no caldo de cana-de-açúcar de diferentes partes do colmo (base, meio e ponta) da variedade RB72454, cultivada sob manejo orgânico, em diferentes períodos de tempo (maio, setembro e dezembro/2007). (Continua.....)..... 57

- Figura 21.** Parâmetros físico-químicos analisados no caldo de cana-de-açúcar de diferentes partes do colmo (base, meio e ponta) da variedade RB835486, cultivada sob manejo orgânico, em diferentes períodos de tempo (Maio, Setembro e Dezembro/2007). (Continua.....)..... 59
- Figura 22.** Parâmetros físico-químicos analisados no caldo de cana-de-açúcar de diferentes partes do colmo (base, meio e ponta) da variedade RB867515, cultivada sob manejo orgânico, em diferentes períodos de tempo (Maio, Setembro e Dezembro/2007). (Continua.....)..... 61

AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DO CALDO DE DIFERENTES VARIEDADES E PARTES DO COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB MANEJO ORGÂNICO

Autor: CRISTINA MARTINI

Orientador: Profa. Dr. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

Co-Orientador: Prof. Dr. LUIZ ANTONIO CORREIA MARGARIDO

RESUMO

Na produção artesanal de cachaça, bebida obtida através da destilação do caldo de cana-de-açúcar fermentado, tradicionalmente utiliza-se o fermento natural ou também chamado de caipira. Para o seu preparo, os pequenos produtores utilizam caldo de cana misturado com milho moído, farelo de arroz e sucos de frutas cítricas. A fonte primária de microrganismos, especialmente de leveduras, é o próprio caldo da cana, e embora reconheça-se a qualidade sensorial da bebida quando este tipo de fermento é utilizado, há alguns inconvenientes como dificuldades no controle de qualidade devido ao alto nível de contaminantes e longos períodos de preparação. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as características microbiológicas (número de leveduras) e físico-químicas do caldo de cana extraído de 10 variedades de cana-de-açúcar, em três períodos da safra (Maio, Setembro e Dezembro) em uma área sob manejo orgânico, e de diferentes partes do colmo (base, meio e ponta) nos mesmos períodos, de três variedades (RB72454, RB835486 e RB867515) sob manejo orgânico, no intuito de gerar informações para o manejo de variedades que permita o preparo do fermento caipira de forma mais eficiente e rápida. Ocorreu uma diminuição significativa no número de leveduras (UFC/mL) em Setembro, quando verificou-se o ponto máximo de maturação para a maioria das variedades. Porém, observou-se que a proporção (%) de *Saccharomyces* aumentou em decorrência da maturação da cana, de forma que as variedades precoces e precoces/médias (RB835054, RB835486, RB845210 e RB855156), devem ser utilizadas no início da safra (em Maio) para o preparo do fermento caipira, o que poderia proporcionar uma diminuição no tempo de preparo do fermento e uma fermentação mais rápida. Entre as variedades precoces, a RB845210 é indicada por apresentar também mais alta concentração de açúcar redutor e proteína no caldo. Para o caldo extraído das diferentes partes do colmo, o caldo da ponta (do 11^o ao 15^o internó, sem o palmito) poderia ser indicado para a preparação do fermento caipira por apresentar maiores contagens de leveduras, mais alta concentração de açúcar redutor e acidez, o que propicia e favorece o desenvolvimento de leveduras. Verificou-se que as leveduras *Saccharomyces* apresentam uma distribuição temporal (ao longo da safra) e espacial (ao longo do colmo), seguindo um gradiente de concentração de açúcar. O conhecimento deste

comportamento aliado às características das variedades pode facilitar o manejo das mesmas visando a produção e um desempenho mais eficiente do fermento caipira, procurando contribuir para a produção da cachaça orgânica.

MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF THE JUICE FROM DIFFERENT VARIETIES AND STALK SECTIONS OF SUGAR CANE CULTIVATED UNDER ORGANIC MANAGEMENT

Author: CRISTINA MARTINI

Adviser: Profa. Dr. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

Co-adviser: Prof. Dr. LUIZ ANTONIO CORREIA MARGARIDO

ABSTRACT

For the artisanal cachaça production, which is a beverage obtained after distillation of the fermented sugar cane juice, natural starter ferment (“caipira” ferment) is utilized, in which crushed corn, rice bran and citric fruit juice are added to sugar cane juice. The primary source of microorganisms, yeasts especially, is the sugar cane juice itself, and although the cachaça sensorial quality is recognized when this ferment is utilized, there are some inconvenients as difficulties in the quality control due to the high level of contaminants and extensive preparation periods. In this context, this work aimed the evaluation of microbiological (yeast numbers) and physico-chemical aspects of the juice extracted from 10 sugar cane varieties, in three harvesting periods (May, September and December) in an area under organic management. The same analysis were performed for the juice extracted from different stalk sections (lower, medium and upper section) from three sugar cane varieties (RB72454, RB835486 e RB867515) under organic management, seeking for information which could contribute to the variety management allowing a faster and efficient natural ferment preparation. A significant decrease in the yeast numbers (CFU/mL) in the juice were observed when the maximum point of maturation was reached for the majority of the varieties. However, the proportion (%) of *Saccharomyces* increased with the sugar cane maturation, in such a way that early and medium maturation varieties (RB835054, RB835486, RB845210 and RB855156) may be utilized at the beginning of the harvest period (in May) for the natural ferment preparation, which could result in diminished preparation time and faster fermentation. Among the early maturation varieties, RB845210 is indicated because it also presented high reducing sugar and protein in the juice. Regarding the juice extracted from different stalk sections, the upper section (from 11th to 15th internode, without the “palmito”) could be indicated for the natural ferment preparation because of higher yeast numbers, higher reducing sugar concentration and acidity, which promote the yeast growth. It was verified that *Saccharomyces* yeasts show a transient and spatial distribution along with sugar concentration gradient. The knowledge of this behavior and variety characteristics can ease the variety management aiming the production and performance of the natural starter ferment, in order to contribute for the organic cachaça production.

1 INTRODUÇÃO

De acordo com os dados da safra brasileira de cana-de-açúcar 2008/2009, a produção nacional destinada à indústria sucroalcooleira é de 571,4 milhões de toneladas, 13,9% superior aos 501,5 milhões de toneladas processadas na safra passada, das quais 43,1% são para a fabricação de açúcar e 56,9% para a produção de álcool. Atualmente a área ocupada com essa cultura é de 8,5 milhões de hectares, sendo que a região Centro-Sul é responsável pela industrialização de 87,9% da cana, e a região Norte-Nordeste por 12,1%, sendo este volume o maior registrado no país. A produção total nacional de cana-de-açúcar destinada ao setor sucroalcooleiro e a outros fins é de 651,5 milhões de toneladas, sendo que desse total 80,1 milhões de toneladas são destinados à cachaça, rapadura e ração animal (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2008).

Do ponto de vista de suas potencialidades, utilizando tecnologias químicas e biotecnológicas, a cana pode dar lugar a um número importante de produtos, apenas superado por aqueles que se obtém da petroquímica. A utilização dos produtos e subprodutos da cana permite um desenvolvimento industrial dentro de um ciclo fechado de aproveitamento integral, que abrange até os resíduos, utilizando-se estes de forma tal que não prejudiquem o meio ambiente e ao mesmo tempo tenham utilidade econômica (MANUAL..., 1999).

Entre os produtos da cana-de-açúcar, destaca-se a aguardente, que é a segunda bebida alcoólica mais consumida no Brasil, e vem conquistando mercados em razão dos esforços do setor produtivo aliados a ações governamentais em diversos níveis. Obtida pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar, sem adição de açúcar, corante ou outras substâncias químicas, a cachaça vem se destacando por sua qualidade e pelo empreendedorismo de muitos produtores (SORATTO et al., 2007).

Segundo Margarido (2005), a produção de cachaça no Brasil está se expandindo, principalmente a de qualidade, isto impulsionado pelas exportações e os programas de associações de produtores visando uma produção com qualidade.

De acordo com Alves (2009), as exportações de cachaça cresceram aproximadamente 18% em valor, ultrapassando os US\$ 16 milhões e tiveram um crescimento de 20% em volume. Atualmente, o setor de cachaça gera 650 mil empregos diretos e indiretos no país, sendo São Paulo, Pernambuco, Ceará, Minas Gerais e Paraíba os principais Estados produtores. No quesito consumo, os principais apreciadores da bebidas concentram-se em São Paulo, Pernambuco, Rio de Janeiro, Ceará, Bahia e Minas Gerais. Em 2008, foram exportados US\$ 16.418.978,00 (11.092.088 litros) para aproximadamente 60 países. O mercado interno possui capacidade instalada de produção de cachaça de aproximadamente 1,2 bilhões de litros, e atualmente são mais de 40 mil produtores. As microempresas correspondem a 99% do total de produtores.

Atualmente, o mercado mundial e também o brasileiro de melhor poder aquisitivo está ávido por produtos denominados “naturais”. O produto artesanal tem maior apelo comercial, permitindo ao micro, pequeno e médio produtores a chance de competição com o chamado “produto industrial”, sendo imprescindível para isso que ele apresente qualidade (CARDOSO, 2001).

Ainda de acordo com Margarido (2005), a produção de aguardente orgânica nas pequenas propriedades, categoria em que hoje está instalada a maioria dos alambiques, permitiria agregar um diferencial ao produto, elevando de maneira significativa a receita do produtor.

No processo de produção da cachaça artesanal, os produtores não utilizam ingredientes químicos; todos os nutrientes originam-se de fontes naturais (RIBEIRO, 2002). De maneira geral, os aguardenteiros artesanais preferem trabalhar com o fermento caipira e os mais modernizados usam o fermento caipira misto ou fermento prensado para panificação. As leveduras puras, isoladas de mostos regionais, conduzem sempre a bons resultados, mas exigem técnicas apropriadas para a sua multiplicação, instalação adequada e condições rigorosas de higiene (LIMA, 1999).

Fermento caipira é a denominação dada ao fermento preparado a partir de caldo de cana, farelo de arroz, fubá, bolacha e caldo de limão ou laranja, com variações nos ingredientes, quantidades e modo de preparo. O caldo de cana é portanto, a fonte primária de microrganismos, especialmente leveduras, no chamado processo caipira, ativados por certos tratamentos cuja finalidade é ativar a multiplicação microbiana, uma vez que a quantidade de leveduras selvagens na cana é pequena, razão principal dos insucessos que ocorrem na prática quando se prepara o inóculo (LIMA, 1999).

O caldo de cana, por conter nutrientes orgânicos e inorgânicos, alta atividade de água, pH entre 5,0 e 5,5 constitui-se em ótimo substrato para o crescimento de grande e diversificada microbiota (GALLO; CANHOS, 1991 apud OLIVEIRA et al., 2007). Os microrganismos mais importantes em associação com o caldo de cana são essencialmente aqueles oriundos do solo e dos vegetais, dentre os quais se destacam os fungos filamentosos, e leveduras e as bactérias lácticas e esporuladas (SILVA, 1988; GALLO, 1989; SILVA; CANHOS, 1990 apud OLIVEIRA et al., 2007). A composição do caldo é variável em função da variedade, idade e sanidade da cana, solo, condições climáticas e planejamento agrícola, conservando todos os nutrientes existentes na cana-de-açúcar que lhe deu origem (DELGADO et al., 1975 apud OLIVEIRA et al., 2007).

Numa dimensão mais ampla, o presente trabalho procura atender os princípios da sustentabilidade no tocante ao uso de recursos renováveis local/acessíveis; baixa dependência de *inputs* comerciais; preservação da diversidade biológica e cultural da população local; e produção de mercadorias

para o consumo interno e exportação, entre outros (CAPORAL; COSTABEBER, 2002).

Desta forma, visando contribuir para o segmento dos produtos naturais ou orgânicos na produção de bebidas alcoólicas como a cachaça, este trabalho se propôs a realizar um estudo das características microbiológicas e físico-químicas do caldo de dez variedades de cana cultivadas sob manejo orgânico em diferentes períodos da safra. Além disso, especificamente para o preparo do fermento caipira, foram também avaliadas as características microbiológicas e físico-químicas do caldo de cana extraído de diferentes partes do colmo da cana, no decorrer da safra.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A cana-de-açúcar

Nos últimos anos, o Brasil vem obtendo aumentos significativos em sua participação mundial na produção de cana-de-açúcar e seus derivados, sendo um dos produtos de maior competitividade no cenário do agronegócio (ANUÁRIO BRASILEIRO DA CANA-DE-AÇÚCAR, 2005).

De acordo com a UNICA (2009), no acumulado da safra 2008/2009, o volume registrado até o último dia de dezembro de 2008 chegou a 496,7 milhões de toneladas. No entanto, o Estado de São Paulo responde por 69% do total da cana esmagada no Centro-Sul, com um volume de 341,8 milhões de toneladas. A região Centro-Sul esmagou 16,6 milhões de toneladas, respondendo por 3,4% do total da cana na região. Ao longo da safra 2008/2009, ainda segundo o levantamento da UNICA, as condições climáticas também foram favoráveis ao desenvolvimento vegetativo da cana, proporcionando um incremento na produtividade agrícola de 4,3% em relação à safra anterior. Por outro lado, houve uma redução na quantidade de produtos obtidos por tonelada de cana. Em relação a quantidade de açúcares redutores (ART), os 141,27 quilos obtidos por tonelada de cana esmagada é inferior ao acumulado na safra anterior em 2,39%. O crescimento na moagem de 15,47% e a redução na quantidade de produtos resultou num crescimento total de 12,72% na produção de açúcar e de etanol na safra. A distribuição da produção

entre açúcar e etanol no acumulado foi de 39,78% para a produção de açúcar e 60,22% para a produção de etanol. A produção de açúcar no acumulado é de 26,6 milhões de toneladas e a produção de etanol foi de 24,61 bilhões de litros, sendo a produção de etanol anidro de 8,53 bilhões de litros, e a do hidratado de 16,08 bilhões de litros. As saídas físicas de etanol para o mercado externo no período compreendido entre abril a dezembro de 2008 atingiram 3,93 bilhões de litros, um incremento de 74%. No mercado interno, foram comercializados 15,5 bilhões de litros, uma alta de 25% - deste total, 11 bilhões de litros referem-se a etanol hidratado, um aumento de 34% sobre as saídas no mesmo período da safra anterior.

A cultura da cana-de-açúcar deve ser avaliada não somente pela sua indiscutível importância econômica, mas também visando a busca de tecnologias adequadas no sistema produtivo, compreendendo aspectos técnicos, biológicos e sociais (VASCONCELOS, 1998).

Neste sentido, acrescentando os aspectos ambientais, a produção de cana por sistemas orgânicos vem ganhando crescente interesse e consolidando-se. Em todo o mundo, o setor de produtos orgânicos movimenta cerca de 12 bilhões de dólares. O mercado internacional absorve quase 70% da produção brasileira, tendo o Brasil 800 mil hectares de área cultivada com orgânicos. Ocupa o 2º lugar no *ranking* mundial (6,5 milhões de hectares) em área cultivada, atrás somente da Austrália, contabilizando as áreas de extrativismo sustentável (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS, 2009). A maior área plantada é com frutas (26%), depois cana (23%) e palmito (18%), segundo AmbienteBrasil (2009).

O sistema orgânico de produção agropecuária adota técnicas específicas, mediante a otimização do uso dos recursos naturais e socioeconômicos disponíveis e o respeito à integridade cultural das comunidades rurais. Objetiva a sustentabilidade econômica e ecológica; a minimização da dependência de energia não-renovável; a maximização dos benefícios sociais, empregando, sempre que possível, métodos culturais, biológicos e mecânicos, em contraposição ao uso de materiais sintéticos; a eliminação do uso de organismos geneticamente modificados e radiações ionizantes, em qualquer

fase do processo de produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização, e a proteção do meio ambiente, segundo a legislação vigente no Brasil (BRASIL, 2003).

Na década de 80, o sistema de cultivo orgânico da cana-de-açúcar intensificou-se, com o projeto denominado de “Cana Verde”, realizado pela Usina São Francisco de Sertãozinho. Entretanto, em 1994, iniciou-se a produção de cana-de-açúcar orgânica para produção de açúcar, surgindo também outras empresas, como a Usina UNIVALEM e a Usina Santo Antonio, ambas de Piracicaba, todas com sucesso, principalmente após a exigência da cana crua sem queima com colhedoras modernas para terrenos não muito acidentados. A produção de cana-de-açúcar orgânica é viável, pois atinge produtividades similares às aquelas obtidas com a agricultura convencional (MATSUOKA et al., 2002).

As aplicações de técnicas alternativas de cultivo, com adubação orgânica, controle mecânico de plantas infestantes e uso de inseticidas naturais e controle biológico de pragas, sem adição de qualquer defensivo ou adubo químico e com colheitas sem queima, envolvem o sistema de cultivo orgânico da cana-de-açúcar (PASCHOAL, 1994).

O processo de produção orgânica elimina todos os tipos de pesticidas e herbicidas, com isso ocorre o reaparecimento de várias espécies antes eliminadas. Nota-se que os fungos que antes eram eliminados com o uso de produtos químicos, servem como alimentos para insetos que por sua vez, servem de alimento para pequenos répteis, que alimentam aves e que alimentam animais maiores, formando-se uma cadeia alimentar balanceada: além disto, este mesmo processo também ocorre em benefício do controle biológico de pragas e doenças dos canaviais (PASCHOAL, 1994).

Além da substituição das queimadas, procuram-se meios que favoreçam a manutenção da palhada, com o estímulo à microfauna e à microflora detritívoras, como animais, bactérias, fungos e algas do solo que são capazes de transformar a palha da cana em matéria orgânica, estimulando a “vida do solo”. Deve-se levar em consideração a presença de minhocas, que garantem um solo muito mais fértil, aerado e melhor estruturado do que

qualquer ação humana (COMPANHIA ALBERTINA, 2006). Vagarosamente, diversos representantes da fauna silvestre se instalam entre os talhões de cana, devido principalmente à ausência dos agrotóxicos e de um meio ambiente equilibrado (NATIVE ALIMENTOS, 2006).

A queima da cana como método de despalha não é permitido; além disso, é realizada a lavagem de todos os equipamentos antes de iniciar a colheita. Em relação à produtividade, ocorre uma fase de adaptação do orgânico ao ecossistema resultando no primeiro ciclo, uma pequena queda na produtividade, mas retornando à normalidade e até aumentando no decorrer do manejo (MACHADO, 2008).

No plantio da cana-de-açúcar orgânica são recomendados os seguintes tratamentos: rotação de culturas; plantio da cana em sistema de consórcio; após o plantio da cana, capina manual e/ou capina mecânica; e uso do composto orgânico, em substituição à adubação mineral (MACHADO, 2008).

Em canas já nascidas, é realizada a capina manual das plantas infestantes existentes no local, visto que muitas espécies rebrotam mesmo após o preparo inicial do solo. Tal trabalho é realizado desde o nascimento da cana orgânica até a sua maturação, quantas vezes forem necessárias entre os tratamentos culturais, recomenda-se o uso de resíduos orgânicos industriais não contaminados, compostados ou não; plantio de leguminosas ou culturas brancas na entrelinha da cana, e controle biológico e cultural de pragas e doenças (MACHADO, 2008).

Para o controle de pragas e doenças, também se utilizam produtos alternativos, permitidos pela legislação referente à agricultura orgânica, tais como calda bordalesa e ácido pirolenhoso (ABREU JÚNIOR, 1998).

Segundo Calegari (1995), para o manejo integrado de pragas, podem ser formadas equipes de monitoramento de formigas, cupins, cigarrinhas e brocas. Já para controlar nematóides, os venenos cedem lugar à rotação de culturas como, por exemplo, a crotalária (*Crotalaria spectabilis*), leguminosa usada para adubação verde.

A utilização de leguminosas nas entrelinhas auxilia no controle de plantas infestantes, diminuindo a necessidade de capinas, além da fixação de

nitrogênio, que beneficia a cultura da cana, dispensando a utilização de adubos químicos nitrogenados. Os benefícios ao solo foram ressaltados, com melhorias na estruturação das partículas, possibilitando maior infiltração de água, de acordo com observações de agricultores familiares (GOULART et. al., 2006).

Para a agricultura familiar, a produção de cana-de-açúcar orgânica torna-se uma alternativa viável quando integrada em sistemas diversificados e sustentáveis. Dessa forma, o agricultor familiar pode aumentar a sua renda com a fabricação artesanal, organizada individualmente ou em formas de cooperação, dos sub-produtos da cana-de-açúcar, como o açúcar mascavo, rapadura e cachaça, tendo essa última uma demanda crescente (DEPARTAMENTO DE ESTUDOS SÓCIO-ECONÔMICOS RURAIS, 2006).

Qualquer que seja a finalidade de uso, a cana-de-açúcar deverá estar madura e recém cortada por ocasião de seu processamento. O tempo entre o corte e a moagem não deve ultrapassar 48 horas, sendo que para a produção de cachaça este tempo não deve ser superior a 24 horas. A cana-de-açúcar deve estar limpa, livre de matéria estranha vegetal ou mineral e íntegra, isenta de doenças, principalmente a podridão vermelha internamente nos colmos, o que provoca a inversão de sacarose e a perda de qualidade dos produtos finais (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS, 2004).

A cana-de-ano (12 meses), plantada em setembro-outubro, tem seu desenvolvimento máximo de novembro a abril, diminuindo em seguida devido às condições climáticas adversas do período de inverno no Centro-Sul, podendo essa colheita ocorrer a partir de julho, dependendo da variedade (RODRIGUES, 1995).

A cana-de-ano e meio (18 meses), plantada de janeiro ao início de abril, apresenta taxa de crescimento mínima, nula ou mesmo de maio a setembro, como já dito acima, no Centro-Sul, em função das condições pouco favoráveis do inverno, como pequena disponibilidade hídrica no solo ou mesmo déficit hídrico, baixas temperaturas e menores intensidades de radiação. Já com o início das precipitações, aumento da intensidade luminosa e também da

temperatura, a fase de maior desenvolvimento da cultura acontece de outubro a abril, com o pico do crescimento por volta de dezembro a abril (RODRIGUES, 1995).

Para a fabricação de cachaça artesanal, rapadura, açúcar mascavo, melado, forragem e outros produtos, a cana-de-açúcar deve ser cortada e despilhada sem o uso de fogo, tomando-se o cuidado de realizar o corte dos colmos bem rente ao nível do solo, não deixando “tocos” e aproveitando melhor a matéria-prima, uma vez que a base do colmo é a parte mais rica em sacarose. Esta prática evita, ainda, a emissão de brotações aéreas, uma vez que é desejável que a rebrota ocorra abaixo do nível do solo, com a conseqüente emissão de novas raízes (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS, 2004).

Atualmente predomina o cultivo de variedades híbridas, melhoradas geneticamente, menos exigentes, mais resistentes às doenças e muito mais produtivas, destacando-se aquelas variedades que possuem a sigla RB (República do Brasil), produzidas pelo PLANALSUCAR, agora Universidade Federal de São Carlos, pelo Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar, e a sigla SP (São Paulo), produzidas pela COPERSUCAR (Cooperativa dos Produtores de Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo) atualmente denominada de CTC (Centro de Tecnologia Canavieira), de acordo com Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (2004).

Ainda segundo Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (2004), para a obtenção de derivados da cana-de-açúcar de qualidade reconhecida, torna-se necessário que a variedade apresente, dentre outras, as seguintes características:

- Boa produtividade de colmos por hectare;
- Alto teor de sacarose;
- Teor de fibra da cana médio / baixo;
- Resistência às principais doenças e pragas;
- Fácil despalha;
- Resistência ao tombamento;
- Boa adaptação a diferentes tipos de solos e climas;

- Ausência de florescimento;
- Boa brotação de soqueiras;
- Rápido crescimento inicial e fechamento;
- Ausência de joçal (pelos lignificantes nas bainhas das folhas);
- Ausência de rachaduras;
- Ausência de brotações laterais;
- Período de utilização industrial longo (maior tempo de corte).

Não existe uma variedade que possua todas estas características. Todas elas apresentam algum defeito ou discordância em relação a alguns dos pontos acima mencionados. O maior número de qualidades em relação aos defeitos é que torna recomendável uma variedade para o plantio em determinada região (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS, 2004).

Do ponto de vista tecnológico, a cana-de-açúcar destinada ao processo industrial no Brasil apresenta baixos teores de amido. Entretanto, com a utilização crescente de cana colhida sem queima prévia, manual ou mecanicamente, tem se observado incremento dos teores de impurezas vegetais, comprometendo a qualidade da matéria prima. Neste caso verifica-se maior heterogeneidade do carregamento, com maior relação ponta/colmos maduros, ou seja, mais palmito e cartucho. Deve-se entender como ponteiros (pontas) os entrenós imaturos, o cartucho contendo o meristema apical e parte das folhas, que em condição normal é da ordem de 10 a 15% (PUGLIA, 2006). As pontas apresentam composição variável em função do estágio de maturação, com pureza variando de 35 a 70%, enquanto o colmo apresenta pureza de 83 a 90% (STUPIELLO, 2000). Neste caso, as pontas, em condição de baixa maturação, apresentam elevados teores de açúcares redutores, aminoácidos, amido, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e polissacarídeos totais, além de menores teores de sacarose (PUGLIA, 2006).

A utilização de cana com elevados teores de pontas deverá interferir no processo produtivo destinado à produção de etanol, uma vez que os compostos fenólicos, presentes em concentrações até seis vezes superiores

nas pontas, atuam como inibidores das leveduras fermentadoras, reduzindo a viabilidade e o brotamento das células (RAVANELI, 2005). Além disso, possui baixa riqueza sacarina (NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2005).

Na fabricação de aguardente artesanal não é recomendável o aproveitamento da ponta da cana, que favorece a diluição do caldo e o torna mais rico em proteínas. A ponta de cana ativa a fermentação em sua fase tumultuosa, podendo provocar transbordamento do mosto nas dornas. Nesse caso são necessárias as lavagens freqüentes da sala de fermentação para se evitar o desenvolvimento de contaminações (CACHAÇAS, 2009).

Segundo VALSECHI (1960), relativamente à parte superior do colmo, sabe-se que nas usinas de açúcar os gomos verdes da ponta (palmito) são prejudiciais à fabricação. Nas fábricas de aguardente, se bem que não se conhecem muitas experiências a respeito, não parece haver muita contra-indicação, desde que a cana pertença ao próprio produtor. Neste caso, talvez o inconveniente mais sério esteja no fato do caldo proveniente de tais colmos originar fermentações excessivamente tumultuosas, com grande tendência de transbordamento das dornas. Portanto, sendo de produção própria, pode se tolerar canas com um pouco mais de palmito. No caso de compra de cana, esta tolerância não é interessante, uma vez que o palmito tem o inconveniente de diminuir o rendimento em caldo por unidade de peso de cana. Além disso, o caldo é sempre mais impuro e menos rico em açúcares.

2.2 O fermento para produção de cachaça

A cachaça, desde o período colonial até a década de 60, era fundamentalmente consumida no meio rural pelos produtores e trabalhadores do campo. Seu menor consumo no meio urbano devia-se aos grandes preconceitos que até hoje ainda afetam sua valorização como a “bebida típica dos brasileiros”. Na década de 60, cerca de 70% da população brasileira vivia no meio rural e 30% na cidade. A partir dos anos 80, essa situação se inverteu. Já na década de 90, cerca de 75% da população vivia no meio urbano e 25%

no campo. A migração rural urbana, que continua acontecendo, trouxe para as cidades o hábito de beber cachaça (RIBEIRO, 2002).

Nesse processo de migração, durante um longo período, o apreciador dessa bebida não se identificava como consumidor, bebendo na intimidade do seu lar. Progressivamente, a ascensão social de uma parcela de indivíduos de origem rural refletiu-se na demanda de cachaça em restaurantes e hotéis, consolidando a presença da bebida nos cardápios até mesmo nos estabelecimentos mais requintados (RIBEIRO, 2002).

Com cerca de 2 bilhões de litros produzidos no ano de 2001 por mais de 30 mil produtores, em quase todas as regiões do Brasil, onde é encontrada em mais de 960 mil pontos de venda, a cachaça é a bebida destilada mais consumida no país, ocupando o segundo lugar entre as bebidas alcoólicas, ficando atrás somente da cerveja (COSTA, 2005).

A cachaça produzida mediante processos artesanais é uma das bebidas destiladas mais saborosas do mundo. Seu aroma, rico e agradável, é resultado de um complexo número de elementos encontrados em sua composição (RIBEIRO, 2002).

A cachaça produzida principalmente em pequenos alambiques artesanais, em termos econômicos, não apresentava condições de competitividade com as aguardentes industrializadas. Os rendimentos agrícolas em média de 60 toneladas de cana por hectare, e industriais, entre 60 e 100 litros de cachaça por tonelada de cana, obtidos pelos produtores mineiros, são bem inferiores àqueles alcançados pelos fabricantes do Estado de São Paulo, maior estado produtor de aguardente do país. Neste, os rendimentos são de aproximadamente 80 toneladas de cana por hectare e 150 litros de cachaça por tonelada de cana (RIBEIRO, 2002).

Na produção de aguardente, o desdobramento dos açúcares resulta como produto predominante, o álcool, porém, além deste, de acordo com o processo fermentativo e com a destilação formam-se também outros produtos que, em conjunto, são chamados “produtos secundários da fermentação alcoólica”, constituídos principalmente por aldeídos, ésteres, ácidos, alcoóis superiores, furfural, etc. São justamente estes componentes que dão cheiro e

gosto (*bouquet*) à aguardente, pois, sem estes produtos secundários, a aguardente seria apenas uma solução hidro-alcóolica com cheiro e gosto típico do álcool etílico. É claro que deve existir uma quantidade mínima e uma máxima para tais componentes e o que é muito importante, eles devem estar dentro de uma proporção harmônica para que a aguardente apresente, no conjunto, as características essenciais de um produto fino e de grande aceitação comercial (NOVAES, 1966).

O aumento do consumo de aguardente de qualidade e a possibilidade de exportação exigem que o processo de fabricação dessa bebida seja baseado em práticas criteriosamente determinadas para obtenção de um produto padronizado e com qualidade comprovada nos aspectos físico-químicos e sensoriais. A qualidade da aguardente requer conhecimentos científicos e tecnológicos apurados, competência, sensibilidade e dedicação (CARDOSO, 2001).

A partir de 1997 (Decreto Federal 2314), os termos "aguardente de cana, caninha ou cachaça" referem-se à bebida alcóolica produzida tomando-se por base a cana-de-açúcar. Portanto, "cachaça" não se refere mais àquela bebida obtida com melão; inclusive, agindo assim, o Ministério da Agricultura o fez principalmente para atender a uma velha reivindicação do Estado de Minas Gerais, onde o termo "cachaça" sempre foi empregado para se referir à aguardente de cana (CARDOSO, 2001). O Decreto nº. 4072, de 03 de janeiro de 2002, apresenta as seguintes definições para aguardente de cana e cachaça:

- Aguardente de cana é a bebida com graduação alcóolica de 38 a 54°G.L., a 20°C, obtida de destilado alcóolico simples de cana de açúcar ou pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g/L.
- Cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcóolica de 38°G. L a 48°G.L., a 20°C e com características sensoriais peculiares.

O conceito de que o bebedor de cachaça não se interessa pela qualidade, comparando as marcas em função do preço mais barato, não é verdadeiro. Nesse processo, que envolve a educação do consumidor quanto à valorização de produtos de qualidade, o Estado de Minas Gerais passou de aproximadamente 20 marcas rotuladas (legalizadas no mercado), em 1982, para cerca de 400 marcas (RIBEIRO, 2002).

O grande desafio para o tecnologista de bebidas é a definição da composição química do produto final, devido ao fato de as substâncias que são responsáveis pelo *flavor* e por outras características das bebidas serem encontradas em quantidades mínimas, dificultando seu isolamento, caracterização e quantificação, e sem o conhecimento delas torna-se muito difícil modificar as características, e/ou controlar a qualidade do produto (BOZA; HORII, 1998).

A comunidade microbiana presente na fermentação é a responsável pela produção dos compostos secundários, como alcoóis, aldeídos, ácidos orgânicos, e ésteres. Estes compostos, em quantidades equilibradas, são responsáveis pela formação do sabor e aroma do produto (*bouquet*) (PACKOWSKI, 1978). Espécies de *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Propionibacterium* contribuem para a formação do *bouquet* da cachaça, entretanto em grandes quantidades são consideradas prejudiciais (SCHWAN et al., 2001). Em diversos aspectos, a fermentação é mais determinante do que a matéria prima na formação dos componentes secundários da bebida (MAIA, 1994), e as bactérias presentes durante a fermentação, em quantidades equilibradas, não são consideradas como contaminantes e sim como fundamentais para a qualidade final da bebida (CARVALHO NETTO, 2007).

Neste contexto, torna-se importante avaliar a utilização do fermento caipira para a produção da cachaça e sua contribuição para a qualidade sensorial da bebida.

No processo de produção da cachaça artesanal, os produtores não utilizam ingredientes químicos, sendo os nutrientes originados de fontes naturais (RIBEIRO, 2002). De maneira geral, os aguardenteiros artesanais preferem trabalhar com o fermento caipira enquanto os mais modernizados

usam o fermento caipira misto ou fermento prensado para panificação. As leveduras puras, isoladas de mostos regionais, conduzem sempre a bons resultados, mas exigem técnicas apropriadas para a sua multiplicação, instalação adequada e condições rigorosas de higiene (LIMA, 1999).

A quantidade de leveduras selvagens na cana é pequena, razão principal dos insucessos que ocorrem na prática quando se prepara o inóculo (pé-de-cuba) pelo chamado processo caipira. O fermento caipira nada mais é do que o resultado do aproveitamento das leveduras naturais do mosto de forma concentrada, mediante certos tratamentos cuja finalidade é ativar a sua multiplicação (LIMA, 1999). A fonte primária dos contaminantes na fermentação alcoólica da cana-de-açúcar é a própria matéria-prima (YOKOYA, 1991). O número de microrganismos presentes na planta varia muito encontrando-se entre 10^4 a 10^8 bactérias e 10^3 a 10^4 fungos por grama de colmo (DUNCAN; COLMER, 1964 apud YOKOYA, 1991). Entre as espécies encontradas destacam-se as bactérias Gram-negativas dos gêneros *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Klebsiella*; as bactérias Gram-positivas dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Arthrobacter* e *Corynebacterium*; os actinomicetos dos gêneros *Streptomyces* e *Actinomyces*; e os fungos (leveduras e bolores) como *Saccharomyces*, *Torula*, *Pichia*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium* (BEVAN; BOND, 1971 apud YOKOYA, 1991).

Durante a colheita, transporte e armazenamento, alguns desses microrganismos tendem a penetrar nos colmos da cana através de lesões e se multiplicam agravando o problema da contaminação. Entretanto, na lavagem da cana, há duas possibilidades: (1) remoção parcial dos contaminantes se a qualidade da água de lavagem e os cuidados operacionais forem adequados; ou (2) um incremento drástico no número de contaminantes em caso oposto. Com um controle adequado de matéria-prima, da água de lavagem e do processo de extração, pode-se obter um caldo misto com pH ao redor de 5,5 (BAYMA, 1973 apud YOKOYA, 1991) e com número de contaminantes inferior a 107 UFC/mL (COPERSUCAR, 1983 apud YOKOYA, 1991).

Pode-se definir levedura contaminante como qualquer levedura presente no processo fermentativo, que não seja a levedura selecionada para a condução da produção de álcool (CABRINI; GALLO, 1999).

Leveduras contaminantes podem sobrenumerar o fermento em poucos dias desde o início da safra, devido a alguns fatores como agressividade na competição por nutriente, maior velocidade de multiplicação, pressão de seleção favorável e proporção inicial significativa. Estes fatores ainda são poucos conhecidos para casos específicos (TAVARES, 1992 apud CABRINI; GALLO, 1999).

Tais leveduras podem trazer sérios prejuízos ao processo fermentativo como redução no rendimento, maior tempo de fermentação, problemas operacionais, etc. Contudo, as leveduras contaminantes podem, ao contrário dos efeitos prejudiciais citados anteriormente, apresentar um bom desempenho fermentativo, podendo serem selecionadas para atuarem como as leveduras de processo numa safra posterior (CABRINI; GALLO, 1999).

Há várias maneiras de se preparar o fermento caipira. Basicamente misturam-se farelo de arroz, fubá, bolacha, caldo de limão ou laranja (VALSECHI, 1960) ou farelo de arroz, fubá, sulfato de amônio, superfosfato e caldo de limão ou laranja (LIMA, 1999), adicionados de caldo de cana diluído (mosto).

O mosto diluído com água limpa até a concentração de 7ºBrix é acrescentado à pasta de nutrientes, a temperatura de 26-30°C. O fubá e o farelo de arroz fornecem nitrogênio e vitaminas; os sais, a complementação mineral necessária; e o caldo de cítricos, ou ácido sulfúrico, a reação ácida favorável à levedura. Finalmente o mosto diluído oferece, além de seus nutrientes naturais, os açúcares que os microrganismos necessitam para multiplicação (LIMA, 1999).

O recipiente deve ser coberto com um pano úmido de algodão, depois da adição do mosto. A fermentação inicia-se um tempo depois se houver leveduras em quantidade suficiente, formando uma camada escura e espessa na superfície do líquido. Esta crosta aumenta de espessura e depois começa a

romper-se em vários pontos. Pelas frestas formadas, visualiza-se uma espuma clara, brilhante, transparente, cuja intensidade aumenta gradativamente até cobrir e fazer desaparecer completamente a crosta.

A fermentação atinge a sua fase máxima, produzindo espuma cada vez mais abundante, intensa, volumosa, ocupando grande parte do espaço livre da dorna. A intensidade da formação desta espuma vai diminuindo aos poucos até desaparecer após algumas horas e deixa o mosto em fermentação a descoberto.

Depois dessa quebra de espuma, a fermentação continua sem grande agitação e termina depois de 18 a 24 horas. O vinho está a 0ºBrix, a fermentação cessa e é o momento de alimentar o fermento. Mais 50 litros de mosto a 7ºBrix e a 26-28ºC são preparados e adicionados ao “pé”, ou seja, ao mosto fermentado no recipiente. Espera-se que a fermentação se complete e o vinho apresente 0ºBrix. Uma terceira alimentação com o mosto diluído e aquecido a 26-28 ºC completa o volume do “pé” de fermentação.

Terminada a fermentação, obtem-se o fermento caipira pronto para ser passado para a primeira dorna de fermentação. Ele se apresenta com cor amarelada característica e cheiro agradável (LIMA, 1999).

Na produção de vinho, normalmente a partir de fermentações espontâneas, a diversidade, composição e evolução das populações de leveduras na uva e sua presença durante a fermentação depende de uma grande variedade de fatores, incluindo a variedade da uva e área de cultivo (ROMANO, 2008).

Apesar de *Saccharomyces cerevisiae* ser uma das leveduras responsáveis pela conversão de suco de uva em vinho, as contribuições de muitas espécies de leveduras como *Candida*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Pichia* e *Kluyveromyces* tem um profundo impacto na qualidade do vinho, de forma que a flora natural de leveduras é um fator importante que influencia a qualidade da bebida (RASPOR et al., 2008). As uvas são as fontes primordiais de leveduras necessárias para a fermentação alcoólica, fornecendo tanto espécies benéficas quanto prejudiciais (ROMANO, 2008).

De forma analógica, é o caldo de cana a fonte primária de microrganismos (leveduras e bactérias) no preparo do fermento caipira para a produção de cachaça. Contudo, reconhecem-se diversas dificuldades para assegurar a qualidade do produto, relacionadas ao controle da matéria-prima, tipo de fermento, condições de fermentação e da destilação e, em especial, adequação nutricional da cana às necessidades do fermento (DOMÍNGUEZ; NELSON; MAIA, 1997).

Quantitativamente o caldo de cana é constituído basicamente por água (80%) e sólidos totais dissolvidos (20%). Dos sólidos totais destacam-se os açúcares sacarose (17%), glicose (0,4%), e frutose (0,2%); os não açúcares orgânicos, constituídos por substâncias nitrogenadas, gorduras, ceras, pectinas, ácidos orgânicos e matérias corantes; e os não açúcares inorgânicos, representados pelas cinzas (STUPIELLO, 1987 apud OLIVEIRA et al., 2007).

O caldo de cana, por conter nutrientes orgânicos e inorgânicos, alta atividade de água, pH entre 5,0 e 5,5 e manter-se na temperatura de 25 a 30°C, constitui-se em ótimo substrato para o crescimento de grande e diversificada microbiota (GALLO; CANHOS, 1991 apud OLIVEIRA et al., 2007). Os microrganismos mais importantes em associação com o caldo de cana são essencialmente aqueles oriundos do solo e dos vegetais, dentre os quais se destacam os fungos filamentosos, as leveduras, e as bactérias lácticas e esporuladas (SILVA, 1988; GALLO, 1989; SILVA; CANHOS, 1990 apud OLIVEIRA et al., 2007).

O caldo de cana possui uma série de compostos que conferem cor ao produto, como a clorofila e compostos fenólicos, cuja presença pode determinar a coloração e aceitabilidade do produto. Uma das alterações mais importantes no caldo de cana é o escurecimento que ocorre logo após sua extração, o qual está relacionado com a formação de melanoidinas, provenientes da reação de Maillard entre açúcares redutores e aminoácidos presentes na cana, contribuindo para a formação da coloração marrom no caldo (DELGADO; CESAR, 1977; BUCHELI; ROBINSON, 1994; QUDSIEH et al., 2002 apud OLIVEIRA et al., 2007).

O que se verifica é que a fabricação da aguardente produzida de modo artesanal, na grande maioria dos casos, carece dos preceitos básicos quanto à higienização e ao controle de qualidade. Raros são os produtores que adotam técnicas, até mesmo simples, para a melhoria de seu produto. A maioria dos produtores é ávido por novos conhecimentos, o que demonstra a falta de informações no campo (CRISPIM, 2000).

Assim, estudar as características microbiológicas do caldo de diversas variedades de cana-de-açúcar pode ajudar os produtores de cachaça artesanal no preparo de um fermento mais eficiente, procurando variedades que possuam maior número e/ou diversidade de leveduras, especialmente com maior ocorrência de *Saccharomyces*. Além disso, a avaliação das diferenças entre as diferentes partes do colmo da cana quanto à sua composição de leveduras, e de que forma a utilização do uso das pontas de cana como fonte de nutrientes para as leveduras (CHAVES, 2002) poderia ser uma recomendação aos produtores, constituem o escopo do presente trabalho.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de amostras e extração do caldo

Colmos de cana-de-açúcar (primeira soca) foram coletados em uma área sob manejo orgânico na Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, Campus de Araras. Foram utilizados os princípios de manejo orgânico com aplicação de bokashi e composto orgânico¹. O solo é do tipo latossolo vermelho-escuro (MANIERO, 1980).

Dez colmos de cada uma de dez variedades de cana-de-açúcar (RB72454, RB835054, RB835486, RB845210, RB855156, RB855453, RB855536, RB867515, RB925211 e RB928064) foram despalhados, despontados e moídos na íntegra, sendo utilizados do primeiro ao décimo quinto entrenó, sem o palmito. Cada colmo de cana-de-açúcar foi colocado em um desfibrador (para plantas forrageiras) resultando em uma massa submetida a uma prensa hidráulica (250 Kgf/cm²) por exatamente 1 minuto. O caldo extraído foi peneirado e armazenado em garrafas de plástico, lavadas anteriormente com água fria e quente, as quais foram imediatamente acondicionadas em congelador. Depois de cada procedimento, o equipamento (prensa) foi lavado três vezes com água destilada, sendo descartado o volume inicial de caldo prensado.

¹ MARGARIDO, L.A.C. CCA, UFSCar – *campus* de ARARAS/SP

Foram também coletados dez colmos de três variedades de cana-de-açúcar (RB72454, RB835486 e RB867515), os quais foram seccionados a cada 5 entrenós e denominados de: base (do primeiro ao quinto entrenó a partir da raiz), meio (do sexto ao décimo entrenó) e ponta (décimo primeiro entrenó ao décimo quinto entrenó, sem o palmito). A metodologia utilizada foi descrita anteriormente.

Todas as amostras foram coletadas em três épocas do ano de 2007 (Maio, Setembro e Dezembro).

As características das dez variedades de cana-de-açúcar utilizadas no presente trabalho estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características das variedades de cana-de-açúcar utilizadas neste trabalho.

Variedades	RB72454	RB835054	RB835486	RB845210	RB855156	RB855453	RB855536	RB867515	RB925211	RB928064
Origem	CP53-76 X?	RB72454 X NA56-79	L60-14 X?	RB72454 X SP70-1143	RB72454 X TUC71-7	TUC71-7 x?	SP70-1143XRB72454	RB72454 X?	RB855206 X?	SP70-1143 X?
Teor de Sacarose	Alto	Alto	Altíssimo	Alto	Alto	Altíssimo	Alto	Alto	Alto	Alto
Perfilhamento	Médio	Médio	Médio	Regular	Bom	Bom	Alto	Médio	Médio/alto	Médio
Fechamento de entrelinhas	Bom	Médio	Bom	Regular	Bom	Bom	Ótimo	Regular	Excelente	Bom
Chochamento	Pouco	Ausente	Pouco	Ausente	Pouco	Médio	Ausente	Pouco	Pouco	Ausente
Maturação	Tardia	Precoce	Precoce / média	Precoce	Precoce	Precoce/ média	Média	Média/ tardia	Precoce/ Média	Média
Florescimento	Pouco	Ausente	Médio	Ausente	Intenso	Intenso	Ausente	Eventual	Eventual	Ausente
Exigência em solo	Baixa	Baixa	Baixa	Médio	Média	Médio	Alto	Baixa	_____	Médio
Produtividade	Cana planta: alta Cana soca: alta	Cana planta : alta Cana soca: alta	Cana planta: alta Cana soca: alta	_____	Cana planta: média Cana soca: média	Cana planta: alta Cana soca: alta	Cana planta: alta Cana soca: alta	Cana planta: alta Cana soca: alta	Alta	Cana planta: alta Cana soca: alta

Referências: Matsuoka (2000); Hoffman et al. (2006); Universidade Federal de São Carlos (2009).

3.2 Análises do caldo

3.2.1 Físico-químicas

As amostras de caldo foram analisadas quanto aos seguintes parâmetros: pH, pol, Brix, açúcar redutor, açúcar redutor total, fenólicos e acidez, segundo metodologia do Laboratório de Análise e Simulação Tecnológica, CCA - UFSCar - *Campus* de Araras; e proteína, no Laboratório de Química e Fertilidade do Solo, CCA - UFSCar - *Campus* de Araras. As análises foram realizadas em duplicatas.

3.2.1.1 Brix

A análise dos sólidos solúveis (°BRIX) no caldo foi realizada mediante o emprego do refratômetro ABBE, conforme FERNANDES (2003).

3.2.1.2 Pol

Inicialmente 200 mL de caldo foram clarificados com 2 g de subacetato de chumbo seco, com agitação energética, e filtração em papel filtro. Após a solução estar límpida e sem turvação, foi realizada a leitura em sacarímetro (FERNANDES, 2003). O cálculo foi feito da seguinte forma:

$$\text{Pol \% caldo} = 0,26 \times L / d,$$

onde L= leitura do sacarímetro; d= densidade do caldo obtida mediante o valor de °Brix.

3.2.1.3 Açúcar redutor (AR)

Foi utilizado o método de Lane & Eynon (1854), onde inicialmente determinou-se o título das soluções A e B de Fehling. A determinação dos

açúcares foi realizada a quente, misturando-se volumes iguais das soluções A e B em um erlenmeyer de 500 mL, adicionados 200 mL de água destilada, levando-se à ebulição. Utilizou-se a amostra de caldo (diluída) como agente titulante, e o aparecimento de precipitado vermelho como indicador do ponto de viragem (FERNANDES, 2003), calculando-se a quantidade de açúcares redutores (AR) da seguinte forma:

$$\text{AR (g/100 mL)} = \text{título} \times \text{diluição} / \text{volume gasto na titulação}$$

3.2.1.4 Açúcar redutor total (ART)

Foi utilizando-se o método de Lane & Eynon (1854), onde inicialmente em um erlenmeyer de 100 mL adicionou-se 5 mL da amostra de caldo de cana coado, 5 mL de HCl concentrado e 20 mL de água destilada, que foram levados à banho maria a 65°C por 5 minutos. Após a inversão da sacarose e o esfriamento da solução, adicionou-se 2 gotas de fenolftaleína e para neutralizar, acrescentou-se NaOH 12,06 N até ocorrer a mudança de cor. Em seguida completou-se para 100 mL com água Milli-Q, agitou-se e retirou-se 50 mL da solução, os quais foram colocados em erlenmeyer de 100 mL e completados com água Milli-Q para 100 mL. Esta solução foi colocada na bureta e titulada através do método volumétrico, sendo preparadas as soluções de Fehling (solução A e solução B) e determinado o título. A determinação dos açúcares redutores totais foi realizada a quente, onde misturou-se volumes iguais das soluções A e B, em um erlenmeyer de 500 mL e adicionou-se 200 mL de água. Após ebulição, titulou-se até a obtenção de cor vermelha escura; após alguns minutos em ebulição, foram adicionados 2 a 3 gotas de azul de metileno a 1%, e após 20 segundos foi completada a titulação, deixando cair gota a gota do caldo de cana até apresentar a coloração característica cor de tijolo. O cálculo foi feito da seguinte forma:

$$\text{ART (g/100 mL)} = \text{título} \times \text{diluição} / \text{volume gasto na titulação}$$

3.2.1.5 Proteína

O teor de proteína (%) foi determinado no caldo de cana através da análise do teor de nitrogênio pelo método de Kjeldahl (HORWITZ, 1975) e multiplicação pelo fator 6,25.

3.2.1.6 Acidez

Utilizou-se o método da acidez titulável, onde titulou-se 25 mL da amostra de caldo de cana com NaOH 0,1 N até atingir pH 7,0. O cálculo foi feito da seguinte forma:

$$\text{Acidez (g H}_2\text{SO}_4\text{/L)} = \text{volume gasto} \times 1,96 \times \text{normalidade do NaOH}$$

3.2.1.7 pH

O pH do caldo de cana foi medido diretamente em pH – metro digital.

3.2.1.8 Compostos fenólicos

Em um bequer, adicionou-se 30 mL de caldo de cana e 3 g de supercel, sendo esta mistura filtrada em funil de Buchner usando papel de filtro número 1, para clarificação do caldo. Em seguida mediu-se o Brix do caldo clarificado e em um balão de 100 mL adicionou-se 3 mL do caldo filtrado e clarificado, completando-se com água Milli-Q. A partir dessa solução foram preparadas as seguintes soluções: padrão (10 mL da amostra diluída, 10 mL de EDTA 0,1M, 4 mL de solução de ácido sulfanílico, 2 mL de solução de nitrato de sódio, completando-se com água Milli-Q em balão de 100 mL; agitar bem e deixar descansar por 60 minutos após a adição da solução de nitrato para o desenvolvimento da cor total); e branco (10 mL amostra diluída, 10 mL de EDTA 0,1M, completando-se com água Milli-Q em balão de 100 mL). Após

repouso de 60 minutos, as amostras foram agitadas e analisadas no espectrofotômetro em comprimento de onda de 420nm.

A solução de ácido sulfanílico foi assim preparada: dissolveu-se 0,08000g de ácido sulfanílico em 45 mL de água Milli-Q quente e após resfriamento, adicionou-se 10 mL de ácido sulfúrico 0,5M em um balão de 100 mL, completando-se o volume com água Milli-Q. Para o preparo da solução de nitrato de sódio pesou-se 1 g de nitrato de sódio e completou-se o volume com 25 mL de água Milli-Q. Foi preparada solução nova a cada 2 horas.

O cálculo da concentração de compostos fenólicos (ppm de ácido gálico) foi realizado no software Microsoft Excel, obtendo-se a curva de regressão linear, utilizando-se a correlação da concentração de ácido gálico com a absorbância.

3.2.1.9 Pureza

Para a determinação da pureza, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Pureza (\%)} = (\text{Pol} / \text{BRIX}) \times 100$$

3.2.2 Microbiológicas

As amostras foram submetidas a processo de diluição em série e plaqueamento em meios seletivos (WLD e Agar Lisina) e de contagem geral, (WLN), segundo Ceccato-Antonini (2004), Tabela 2.

Tabela 2. Composição dos meios de cultura utilizados para os isolamentos de leveduras (Ceccato-Antonini, 2004).

Reagentes	WLN ¹	WLD ²	Agar lisina ³
extrato de levedura	0,4 g	0,4 g	-
bacto yeast carbon base	-	-	1,17 mg
Cicloheximida	-	5,0 mg	-
Lisina	-	-	0,10 g
caseína hidrolisada	0,5 g	0,5 g	-
Glicose	5,0 g	5,0 g	-
ácido nalidíxico*	5,0 mg	5,0 mg	5,0 mg
ampicilina*	5,0 mg	5,0 mg	5,0 mg
fosfato monopotássico*	55,0 mg	55,0 mg	-
cloreto de potássio*	42,5 mg	42,5 mg	-
cloreto de cálcio*	12,5 mg	12,5 mg	-
sulfato de magnésio*	12,5 mg	12,5 mg	-
cloreto férrico*	0,25 g	0,25 g	-
sulfato de manganês*	0,25 g	0,25 g	-
verde de bromocresol	2,2 mg	2,2 mg	-
ágar	2,0 g	2,0 g	2,0 g
água destilada qsp	100 mL	100 mL	100 mL

*Os ingredientes assinalados com asterisco devem ser incorporados ao meio na forma de soluções previamente preparadas e esterilizadas por filtração, enquanto os demais componentes podem ser autoclavados.

1- WLN (Wallerstein Laboratories Nutrient Agar), de acordo com GREEN; GRAY (1950) modificado por OLIVEIRA; PAGNOCCA (1988),

2- WLD (WLN + 50ppm de cicloheximida), de acordo com WALTERS; THISELTON (1953) modificado por MORRIS; EDDY (1957).

3- Agar Lisina, de acordo com WALTERS; THISELTON (1953) modificado por MORRIS; EDDY (1957).

Foram transferidos 10 mL de amostra de cada caldo para tubo falcon estéril, sendo em seguida as amostras centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Foram acrescentados 10 mL de solução salina e a suspensão homogeneizada; em seguida, o tubo foi novamente centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. A seguir, as células foram ressuspensas a 10 mL com solução salina e o tubo agitado para homogeneização.

Das amostras lavadas, foi retirado 1 mL e colocado em um tubo de ensaio com 9 mL de solução salina autoclavada, agitou-se no vortex e novamente repetiu-se o procedimento, e assim sucessivamente até obter a diluição desejada (Tabela 3). Foram plaqueados 100 μ L da amostra nos meios de cultura e espalhados com alça de Drigalsky, sendo em seguida as placas incubadas em estufa a 30°C por 5 dias. Os plaqueamentos foram realizados em duplicata para cada diluição utilizada (para WLN, 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ; para WLD, direto, 10^{-1} , 10^{-2} ; para Ágar Lisina, direto, 10^{-1} , 10^{-2}).

Os resultados foram expressos em número de unidades formadoras de colônias de leveduras (UFC/mL) por volume de caldo, para cada meio de cultura. A avaliação do número e da proporção de leveduras *Saccharomyces* nas amostras de caldo foi estimada utilizando-se as seguintes fórmulas:

$$\text{Número de } Saccharomyces \text{ (UFC/mL)} = (\text{UFC/mL em WLN}) - (\text{UFC/mL em Agar Lisina})$$
$$\text{Proporção de } Saccharomyces \text{ (\%)} = [(\text{UFC/mL de } Saccharomyces) / (\text{UFC/mL em WLN})] \times 100$$

3.3 Análise estatística

Os resultados das análises microbiológicas foram analisados utilizando-se o software SAS através da análise de variância e teste de Tukey para comparação entre os tratamentos.

Os valores das contagens de leveduras (UFC/mL) nos diferentes meios de cultura foram transformados para “log” antes da análise estatística.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação das características microbiológicas e físico-químicas do caldo de dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob manejo orgânico

4.1.1 Análise microbiológica

Segundo Mutton (1998), a composição do caldo de cana é dependente de vários fatores, entre eles as variedades empregadas, as condições ambientais de cultivo e o grau de maturação da cana. Analisando-se as amostras de caldo das 10 variedades de cana-de-açúcar testadas, verificou-se que há diferença significativa quanto ao número de leveduras entre elas. A variedade RB835486 apresentou o menor número enquanto as variedades RB855156 e RB925211 mostraram os maiores números de leveduras (Figura 1).

Quanto aos períodos de amostragem, o número de leveduras foi menor significativamente em setembro, não apresentando diferença significativa entre maio e dezembro (Figura 1).

Com o meio de contagem geral (WLN), obtiveram-se os maiores valores de contagem de leveduras, como era de se esperar, pois este meio não é

seletivo. Já com o WLD e Agar Lisina, os valores foram menores e diferentes entre si, com este último obtendo-se valores superiores ao WLD (Figura 1).

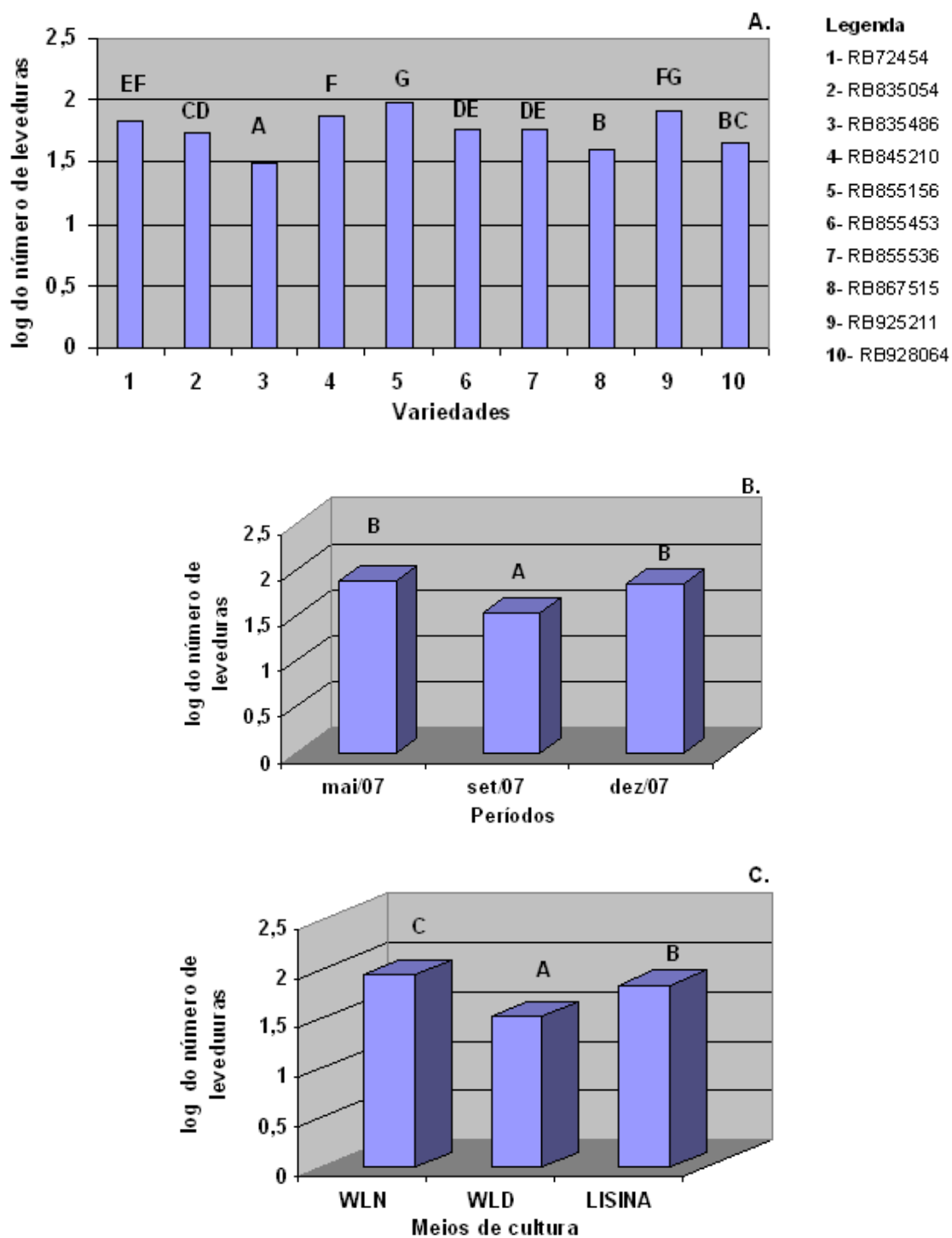


Figura 1. Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar de 10 variedades cultivadas sob manejo orgânico. Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% entre os parâmetros estudados (variedades em A, períodos em B e meios de cultura em C).

Houve interação significativa entre variedades e meios de cultura, de forma que em meios seletivos (WLD e Agar Lisina), os quais permitem contagem e isolamento de leveduras selvagens (resistentes a ciclohexamida e não *Saccharomyces*, respectivamente), houve diferenças mais marcantes entre as variedades do que quando se analisou os resultados para WLN. As variedades que apresentaram maiores valores para as contagens de leveduras foram a RB855156, RB845210 e RB925211, especialmente para WLD e Agar Lisina (Figura 2).

Observou-se que o número de leveduras no caldo variou de acordo com as variedades e o período de tempo. Assim, em maio, três variedades (RB72454, RB855536 e RB925211) apresentaram maiores valores; em setembro, foi a RB855156; enquanto em dezembro, as variedades RB845210 e RB855453 se destacaram significativamente (Figura 3).

Em maio, independentemente do meio de cultura, três variedades apresentaram maiores contagens de leveduras, sendo a RB72454, RB855536 e RB925211 (Figura 4). Em setembro, RB855156 se destacou nos três meios de cultura, acompanhado da RB835054, com exceção do meio WLD (Figura 5). Em dezembro, três outras variedades (RB845210, RB855453 e RB928064) apresentaram maiores contagem de leveduras, em quaisquer dos meios (Figura 6).

Na Figura 7, pode ser observado que há diferença estatística entre as contagens de leveduras nos diferentes meios de cultura, em quaisquer dos períodos avaliados.

Os resultados das contagens de leveduras em notação científica estão dispostos na Figura 8. Verifica-se que os números se situam em 10^3 e 10^6 UFC leveduras/mL, dependendo do meio de cultura. Os gráficos também trazem as contagens deduzidas para *Saccharomyces*, obtidas da subtração das contagens em Agar Lisina (não-*Saccharomyces*) daquelas em meio WLN (contagem geral). O meio WLD pode permitir o desenvolvimento de linhagens de *Saccharomyces*, porém não da espécie *S. cerevisiae*, pelo fato desta ser sensível à cicloheximida (KREGGER VAN-RIJ, 1984).

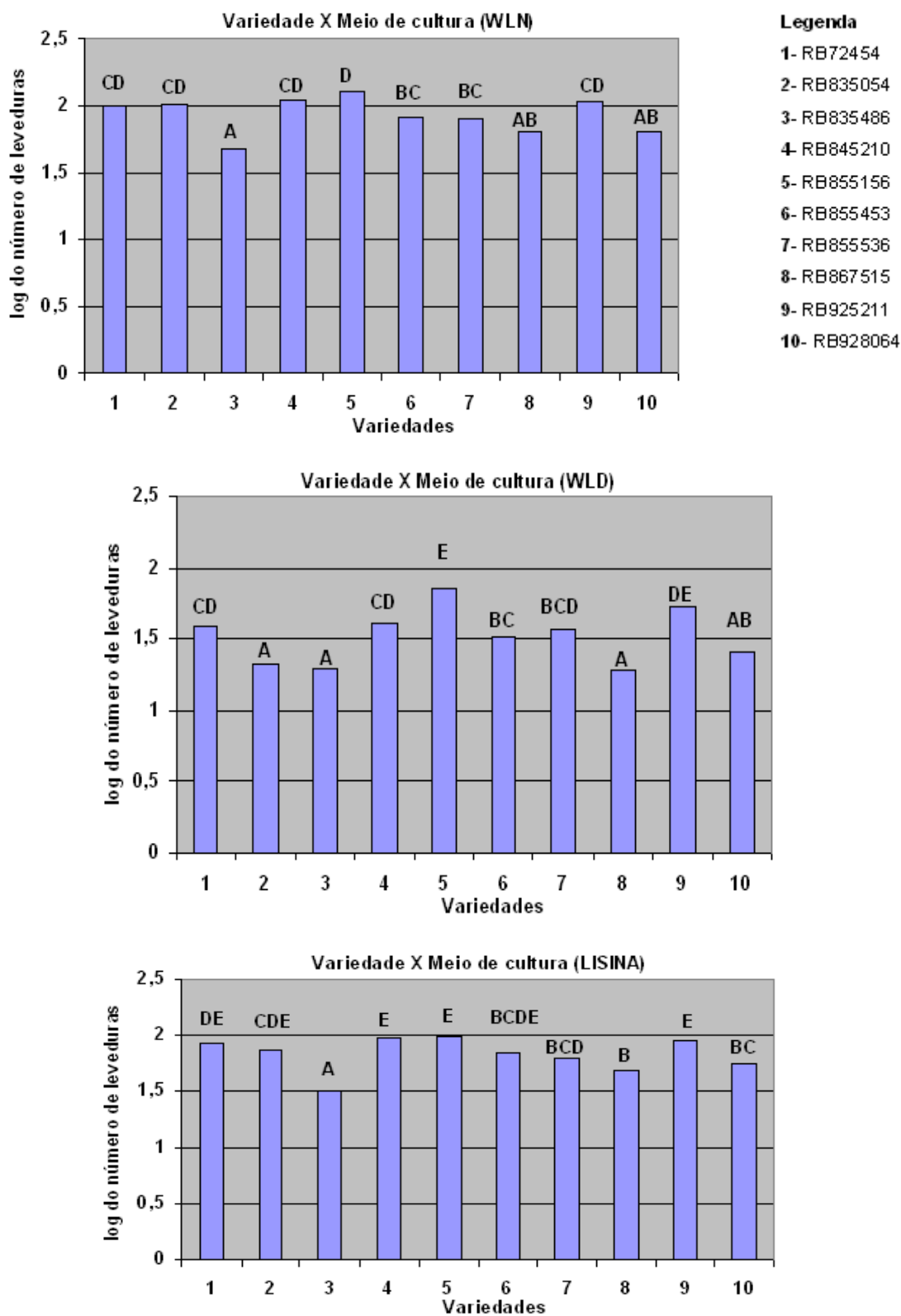


Figura 2. Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar de 10 variedades cultivadas sob manejo orgânico, em diferentes meios de cultura. Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% entre as variedades.

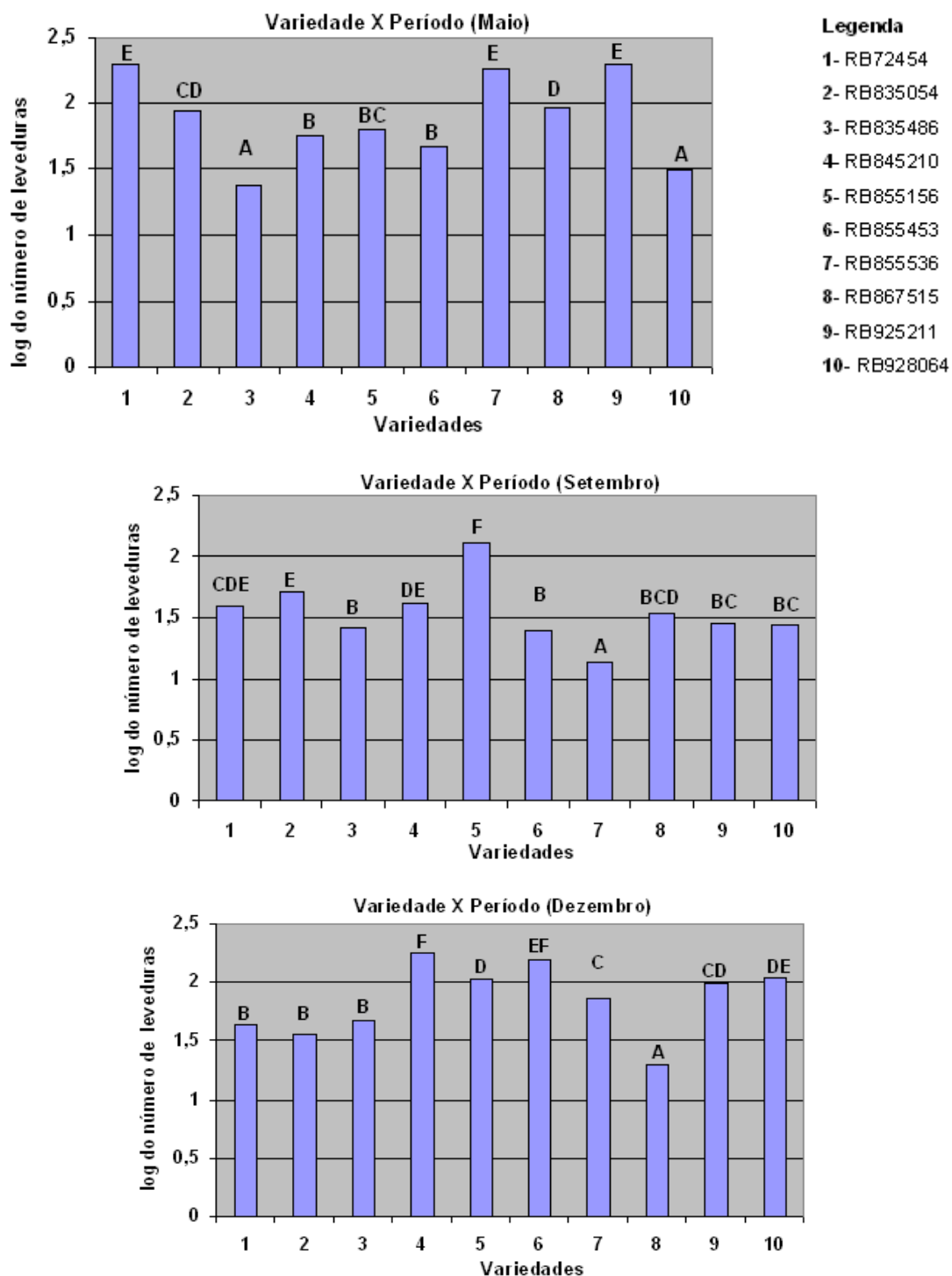


Figura 3. Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar de 10 variedades cultivadas sob manejo orgânico, em diferentes períodos de tempo. Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% entre as variedades.

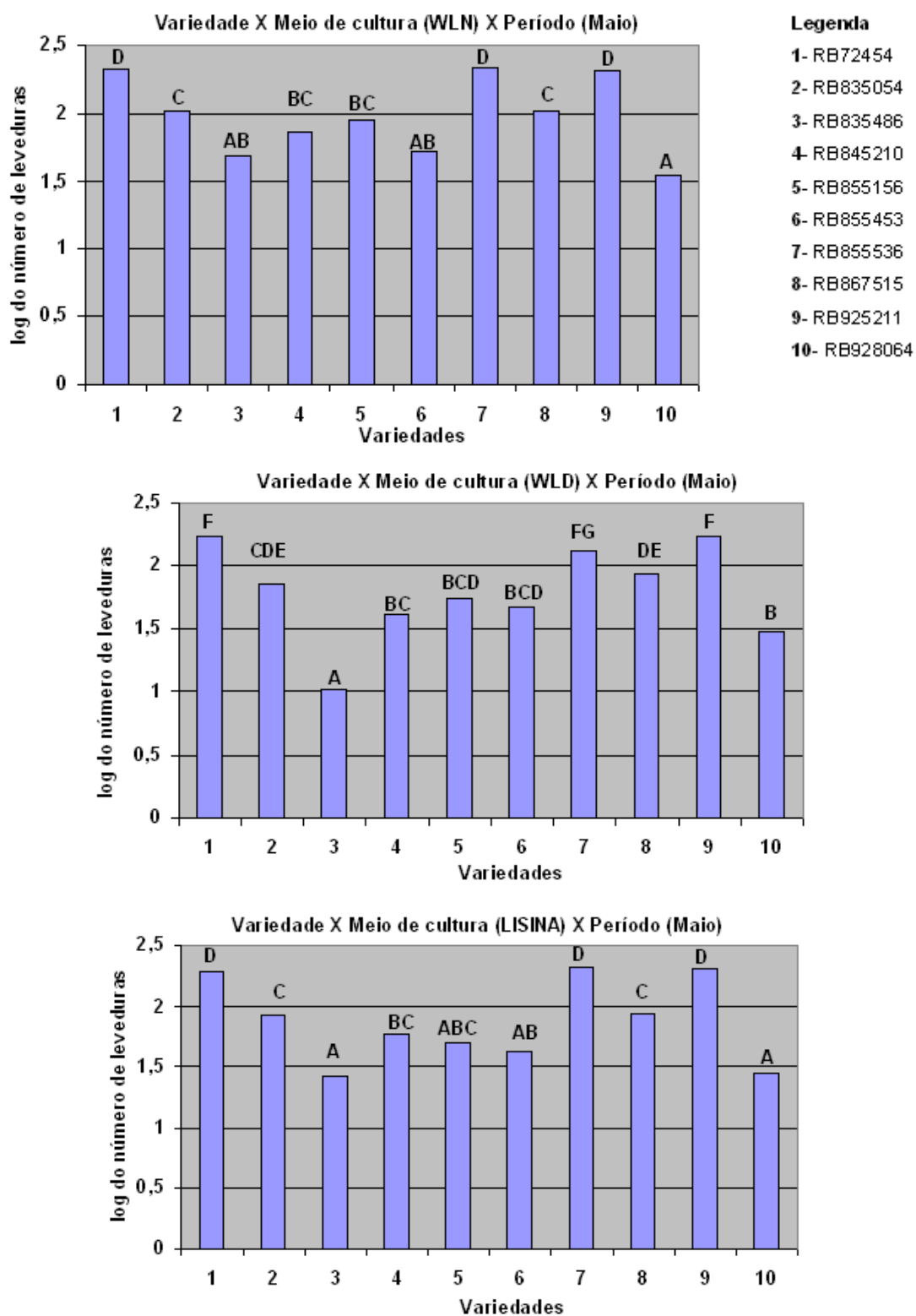


Figura 4. Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar de 10 variedades cultivadas sob manejo orgânico, em diferentes meios de cultura, em maio. Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% entre as variedades.

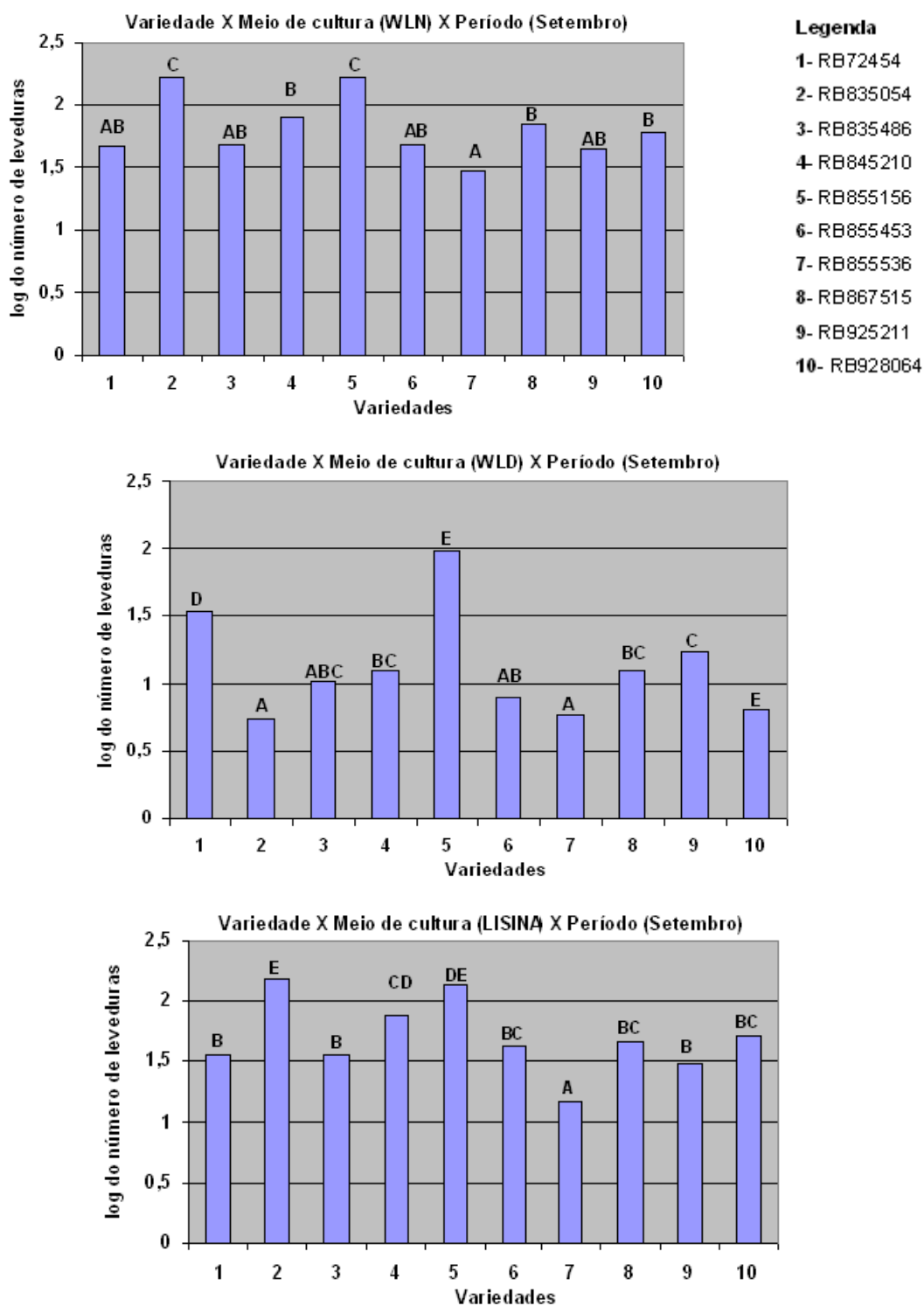


Figura 5. Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar de 10 variedades cultivadas sob manejo orgânico, em diferentes meios de cultura, em setembro. Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% entre as variedades.

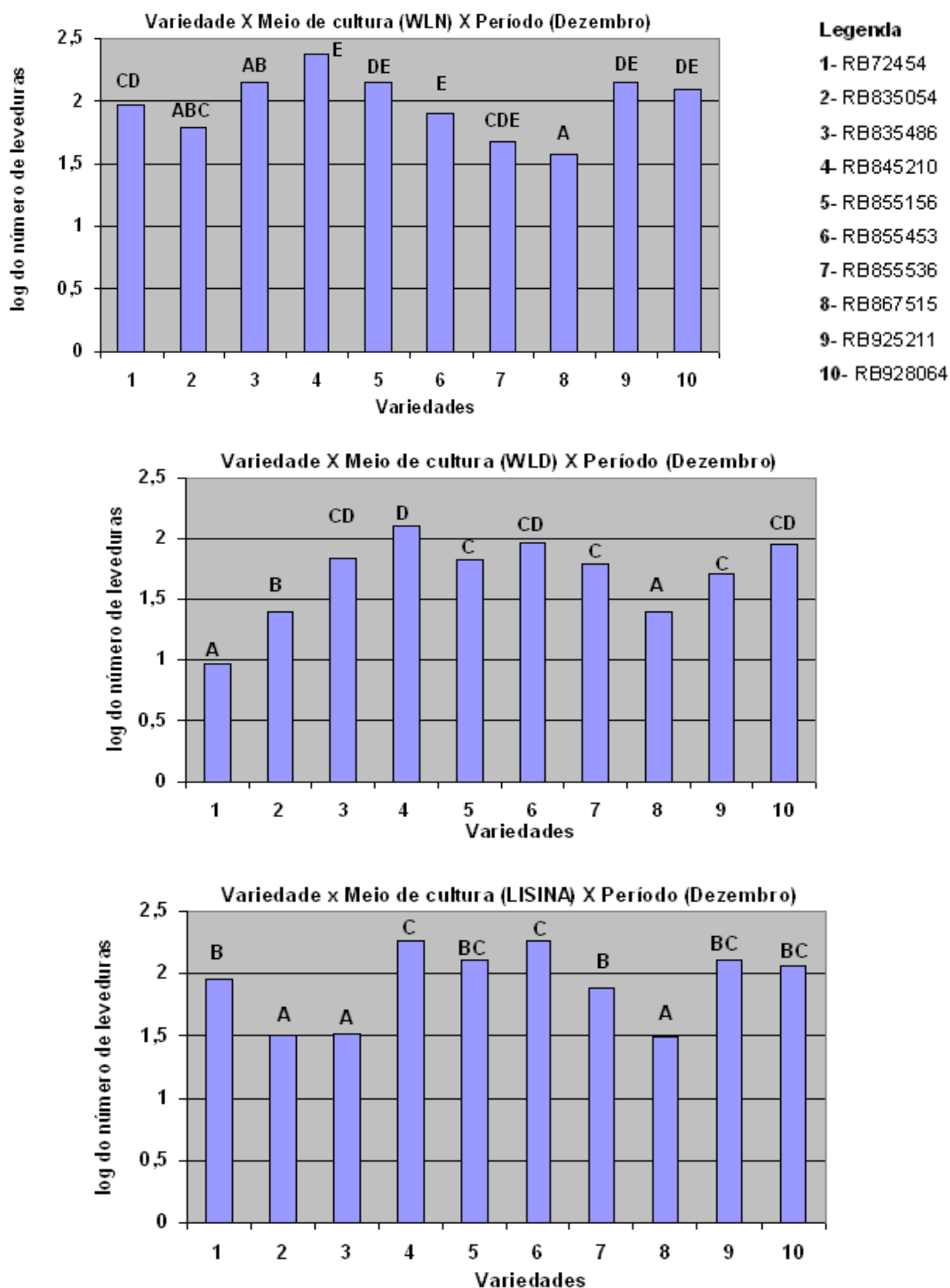


Figura 6. Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar de 10 variedades cultivadas sob manejo orgânico, em diferentes meios de cultura, em dezembro. Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% entre as variedades.

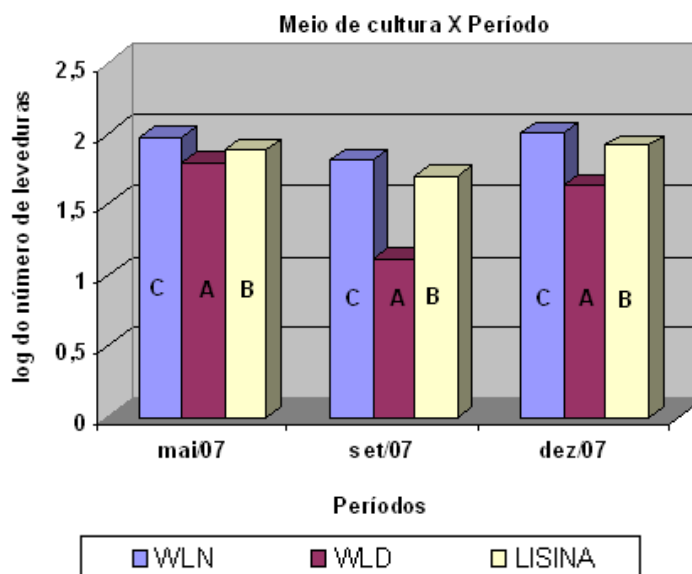


Figura 7. Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar de 10 variedades cultivadas sob manejo orgânico, em diferentes meios de cultura, para cada período de tempo analisado. Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% entre os meios de cultura.

Verificando-se a proporção de leveduras *Saccharomyces* em relação ao número total nas 10 variedades, observam-se tendências diferentes em decorrência da maturação das variedades (Figura 9). Para as precoces, a proporção de *Saccharomyces* diminuiu de maio a setembro, estabilizando ou aumentando os números em dezembro. Para as variedades de maturação média/tardia e tardia, ocorreu um aumento na proporção de *Saccharomyces* de maio a setembro, decrescendo em dezembro. Com relação às tardias, o pico de maturação deve ter sido logo após Setembro, coincidente com as mais altas proporções de *Saccharomyces*. Este ponto será discutido mais à frente.

O caldo de cana apresenta uma microbiota diversificada de leveduras. Com o aumento da concentração de açúcar através do processo de maturação, deve ocorrer uma seleção de espécies de leveduras, favorecendo a espécie *S. cerevisiae*, por exemplo, que resiste a altas concentrações de açúcar (MORAES et al., 1997; PATARO et al., 2000).

Para as variedades de maturação precoce/média e média, observou-se que algumas se comportaram como as tardias e outras como as precoces

(Figura 9). Uma provável explicação para este comportamento pode ser as baixas condições de pluviosidade apresentadas no ano de 2007, conforme dados meteorológicos constantes do Apêndice.

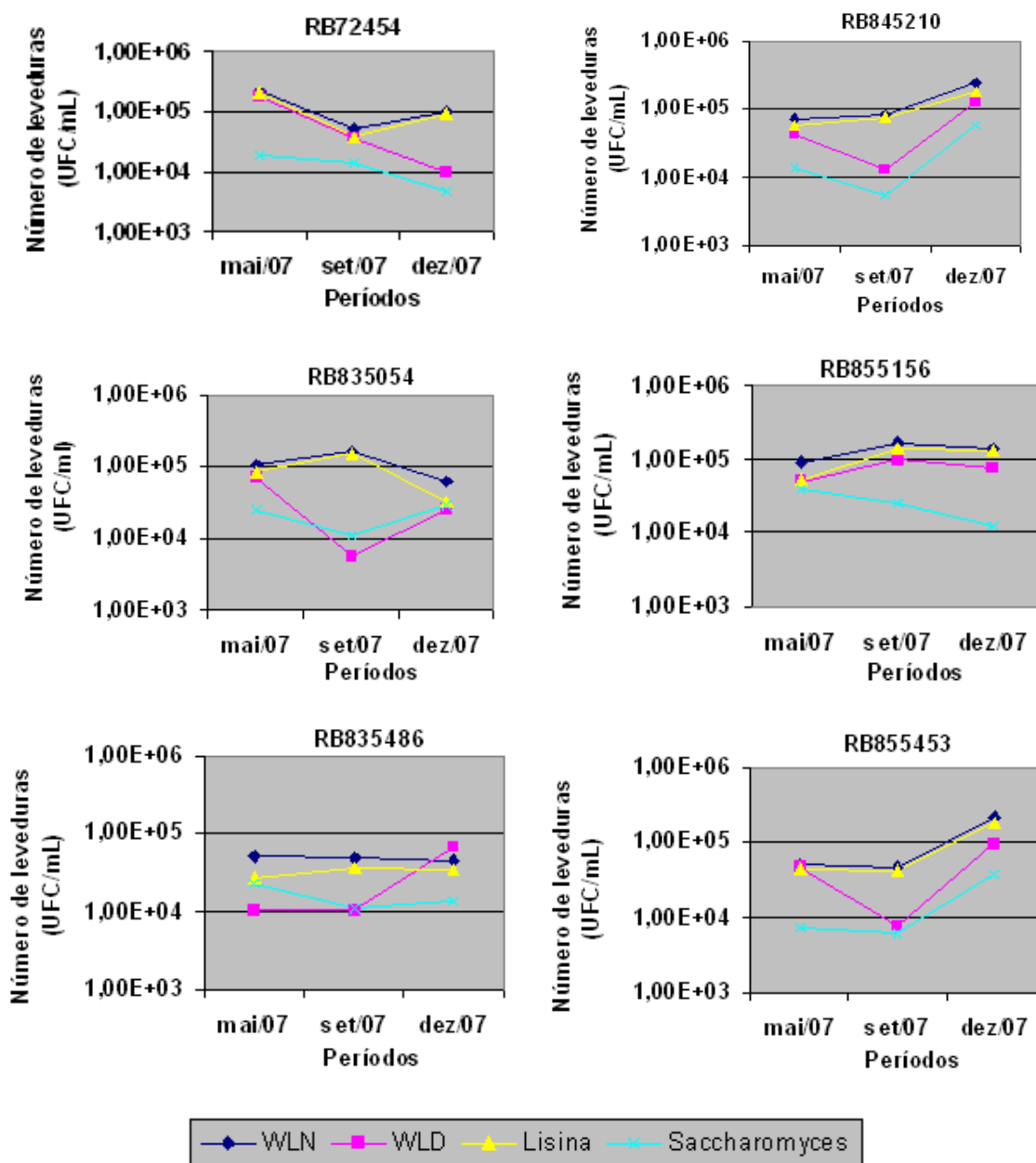


Figura 8. Número de leveduras (UFC/mL) isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar de 10 variedades cultivadas sob manejo orgânico, em diferentes meios de cultura, para cada período de tempo analisado. O número de *Saccharomyces* refere-se à subtração dos valores encontrados em Ágar Lisina dos valores em WLN. **(Continua...)**.

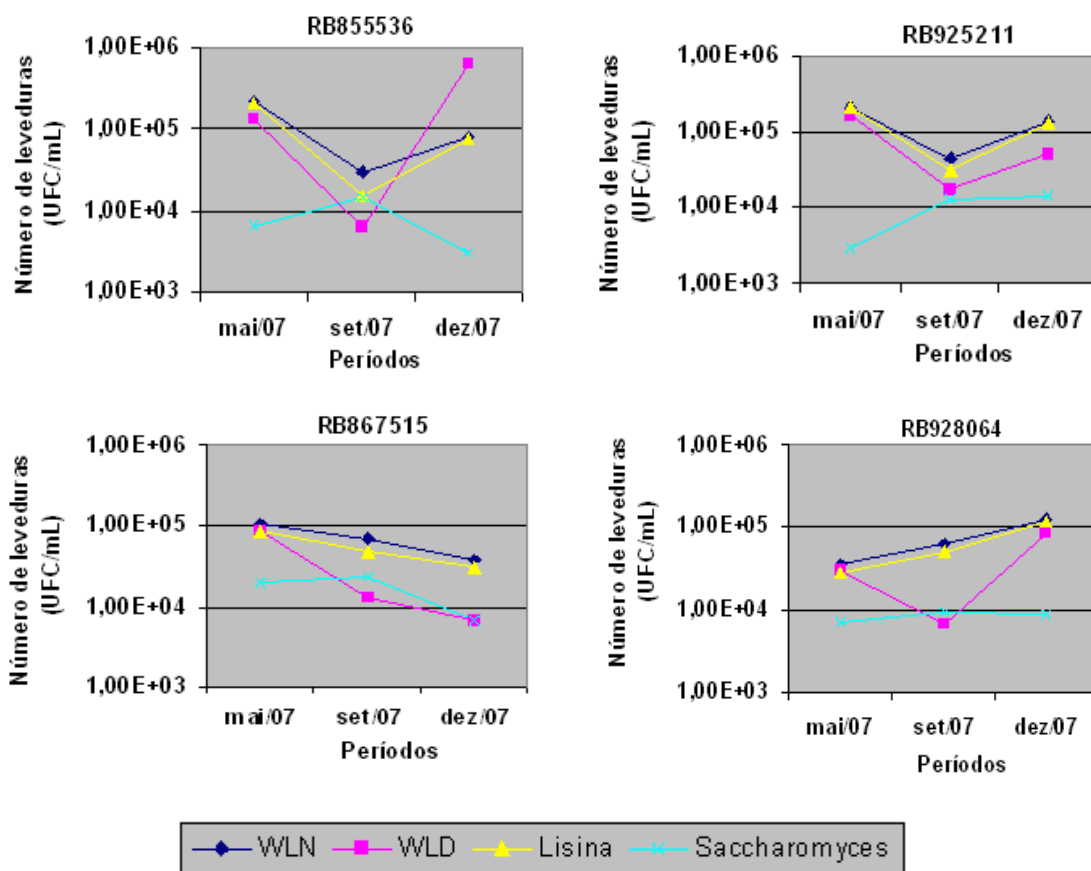


Figura 8. Número de leveduras (UFC/mL) isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar de 10 variedades cultivadas sob manejo orgânico, em diferentes meios de cultura, para cada período de tempo analisado. O número de *Saccharomyces* refere-se à subtração dos valores encontrados em Ágar Lisina dos valores em WLN.

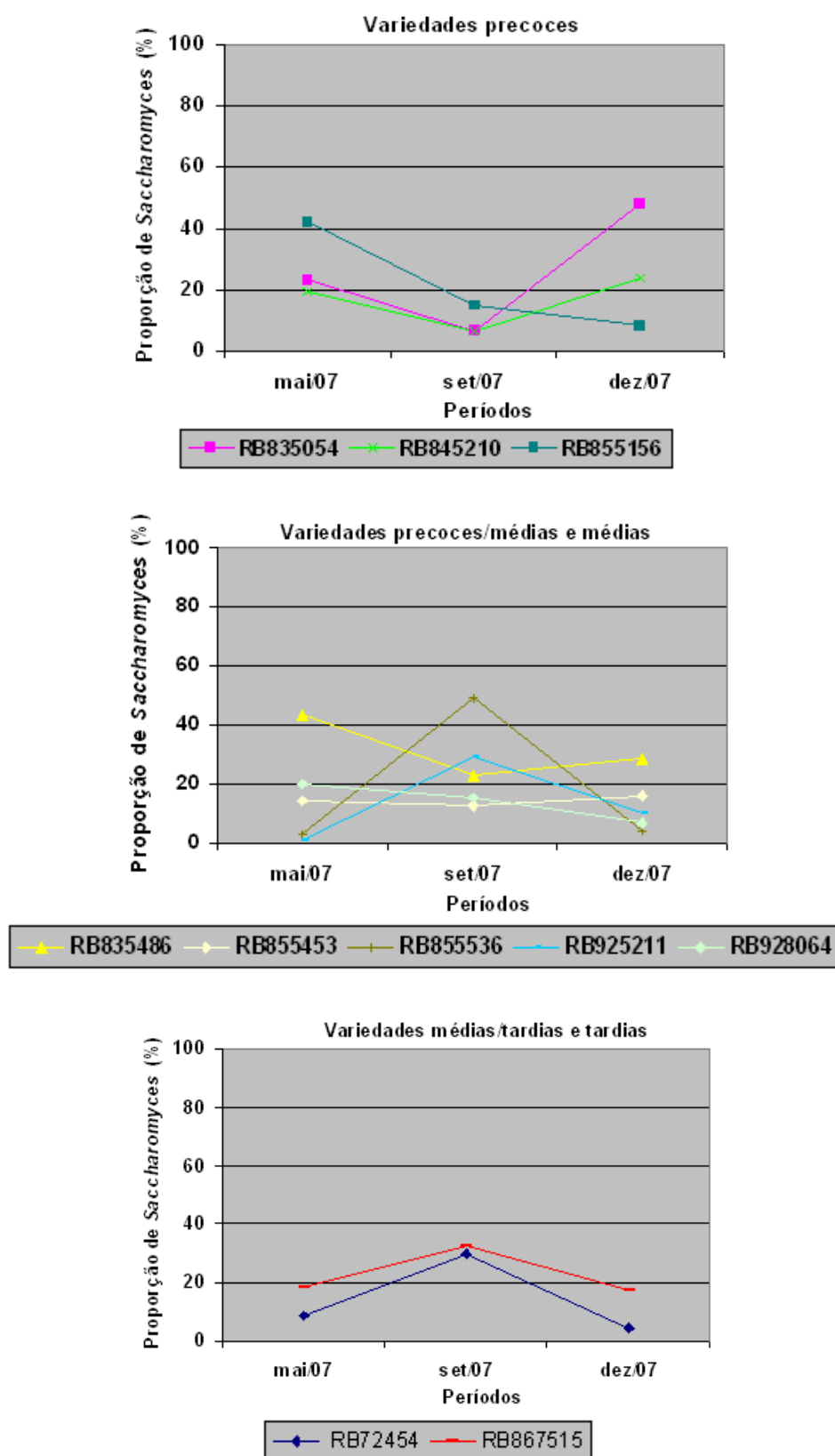


Figura 9. Proporção de *Saccharomyces* (%) no caldo de cana-de-açúcar de 10 variedades cultivadas sob manejo orgânico em três períodos (maio, setembro e dezembro/2007).

4.1.2 Análise físico-química

Os gráficos constantes da Figura 10 mostram que o Brix máximo para a maioria das variedades foi atingido em setembro, mostrando uma elevação em relação a maio, decrescendo a seguir em dezembro. As variedades RB72454 e RB867515 apresentaram uma tendência diferente, mostrando valores crescentes de Brix de maio a dezembro. A mesma observação é válida para os parâmetros Pol e pureza. O pico máximo de acúmulo de sacarose também ocorreu na mesma época (final de agosto) nos experimentos realizados por Ravaneli et al. (2003).

Segundo Saes et al. (1990), em estudo do potencial agrônomo de alguns cultivares de cana-de-açúcar, os melhores ajustes matemáticos para a curva de Brix foram os modelos quadráticos, o que indica redução gradativa do crescimento vegetativo e a entrada das variedades em processo de maturação.

Para a ocorrência da maturação, a cultura da cana exige temperaturas baixas e/ou déficit hídrico, para que haja repouso fisiológico e maior acúmulo de sacarose nos colmos, segundo Alexander (1973) e Andrade (2006). Naturalmente, este processo ocorre a partir dos meses de abril e maio, com clímax no mês de agosto (DEUBER, 1988). É possível induzir a maturação através da aplicação de maturadores, permitindo a obtenção de cultivares produtivos, com maturação precoce, porém a sua eficiência depende da época de aplicação, condições climáticas e características genéticas das variedades (LEITE et al., 2008; MENECHIN, 2008).

Para um grupo de 6 variedades (RB72454, RB835486, RB845210, RB855156, RB925211 e RB835054), os maiores teores de proteína foram obtidos em setembro, variando de 0,6% a 1%, enquanto para 4 variedades (RB855453, RB855536, RB867515 e RB928064), o caldo apresentou os menores teores de proteína neste mês (Figura 10).

Quanto aos teores de açúcar redutor (AR) e açúcar redutor total (ART), as curvas mostraram um decréscimo do primeiro parâmetro, e elevação do segundo, de maio a setembro, com exceção da variedade RB72454, a qual

apresentou valores relativamente constantes de ART ao longo do período (Figura 10).

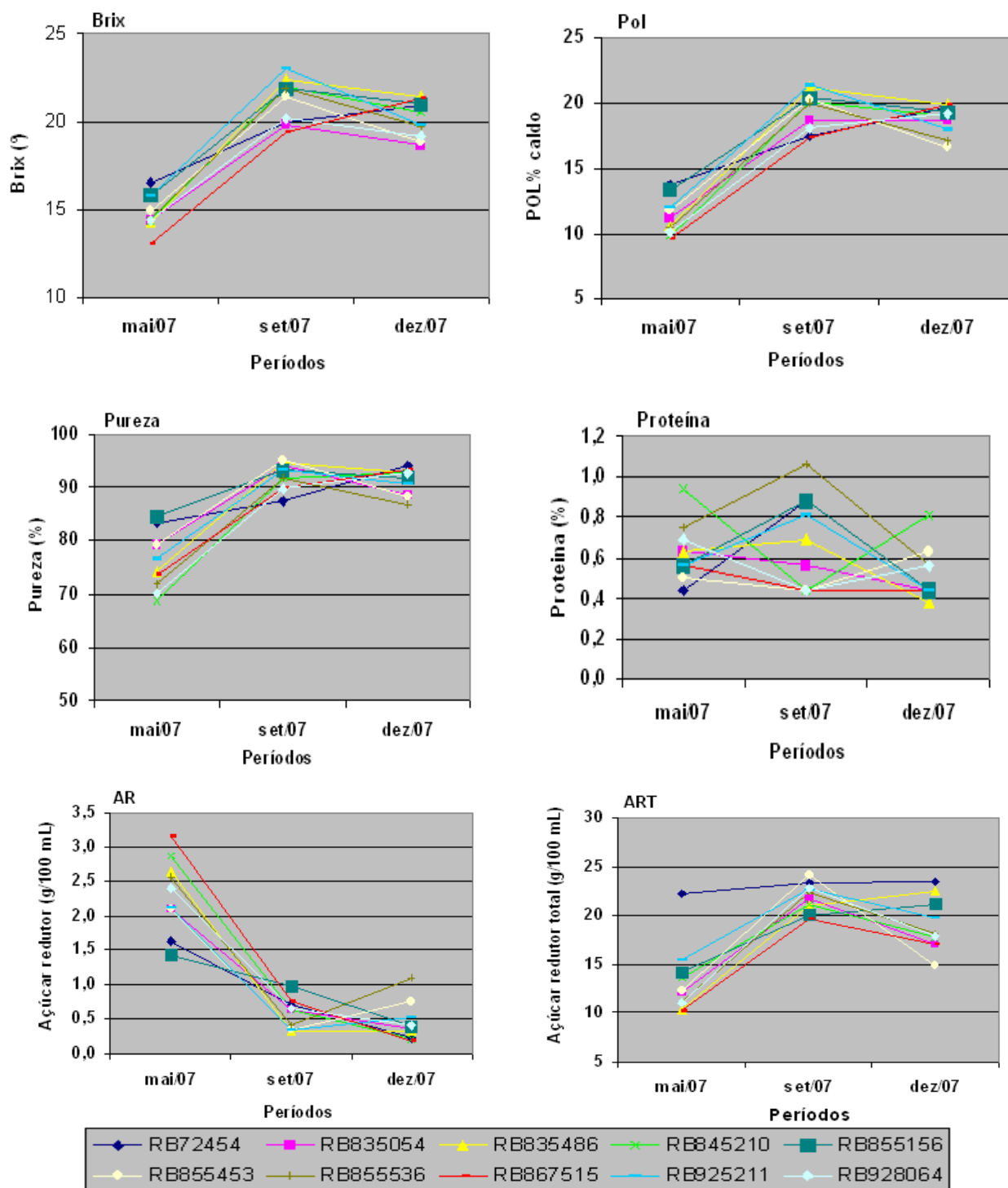


Figura 10. Parâmetros físico-químicos analisados no caldo de cana-de-açúcar de 10 variedades cultivadas sob manejo orgânico, em diferentes períodos de tempo (maio, setembro e dezembro/2007). (Continua...).

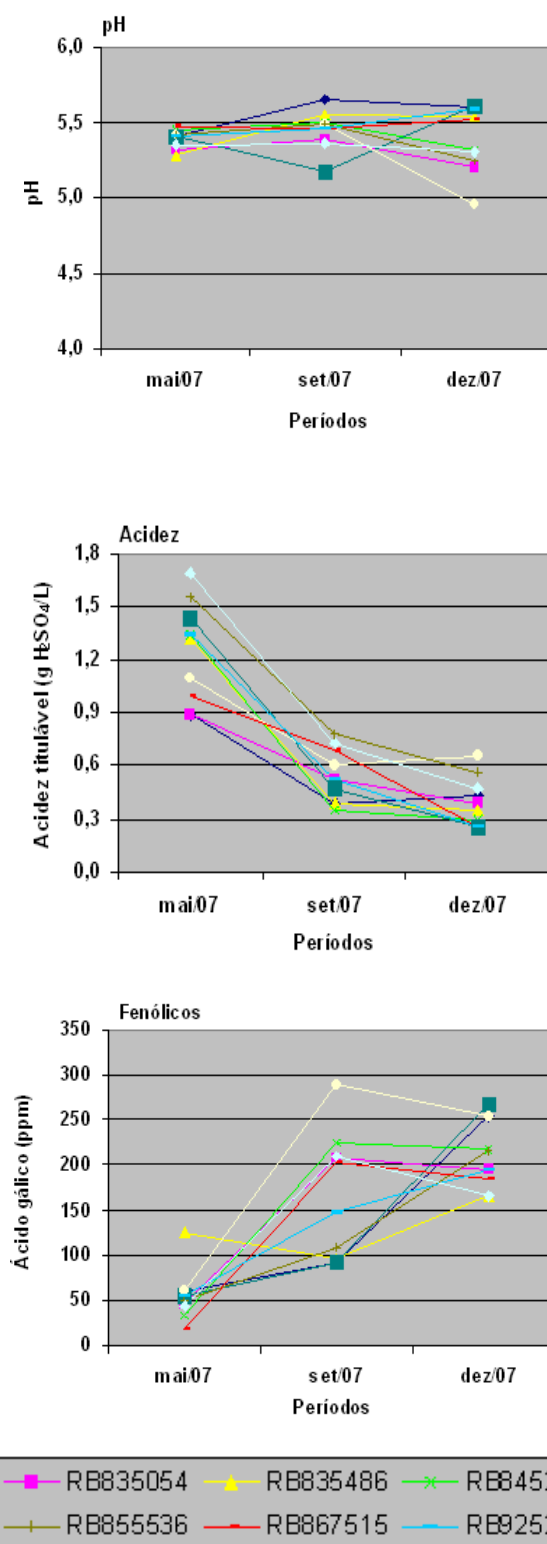


Figura 10. Parâmetros físico-químicos analisados no caldo de cana-de-açúcar de 10 variedades cultivadas sob manejo orgânico, em diferentes períodos de tempo (maio, setembro e dezembro/2007).

A acidez do caldo foi maior em maio, decrescendo substancialmente a seguir. O pH variou de 5,0 a 5,5 no decorrer dos períodos de tempo, com pequenas oscilações e diferenças entre as variedades (Figura 10).

Houve grandes variações na concentração de compostos fenólicos entre as variedades e os períodos de tempo. Verificou-se variedades em que esta concentração elevou-se continuamente de maio a dezembro, como RB855156 e RB867515, atingindo valores de 250 ppm em dezembro. Para as demais variedades, a concentração elevou-se de maio a setembro, estabilizando ou decrescendo em seguida. A variedade RB855453 destacou-se das demais por apresentar elevado teor de compostos fenólicos ao longo do período (Figura 10).

4.1.3 Considerações

Os resultados mostraram que existe influência da variedade e do período da safra sobre o número de leveduras presentes no caldo de cana, além de haver interação significativa entre variedade e período. Isto significa que para o preparo do fermento caipira, poderiam ser utilizadas as variedades RB72454, RB855536 e RB925211 por apresentarem maiores contagens de leveduras no caldo no início da safra (Figura 3). Estas variedades são de maturação média e tardia, o que poderia indicar uma relação entre maturação da cana e número de leveduras.

Para a indústria de aguardente de cana, a escolha da sua variedade segundo a sua maturação justifica-se pela duração da safra de aguardente, que se alonga por vários meses, iniciando-se em maio ou junho e não raramente dezembro. Há necessidade de organização de um plano de produção de cana que permita fornecer canas com bom teor de sacarose no decorrer da safra. O conceito de PUI (Período Útil de Industrialização) é muito importante neste contexto, pois nem sempre é possível colher todas as canas quando apresentam uma maturação ótima (NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2005).

A Figura 11 mostra o comportamento das variedades de cana com relação ao PUI, conforme Novaes et al. (1974) apud Nogueira; Venturini Filho (2005), relacionando as variedades precoces, médias e tardias com a duração do PUI e a faixa de teores de sacarose (Pol) na cana, compreendidos entre 13 e 16% (NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2005).

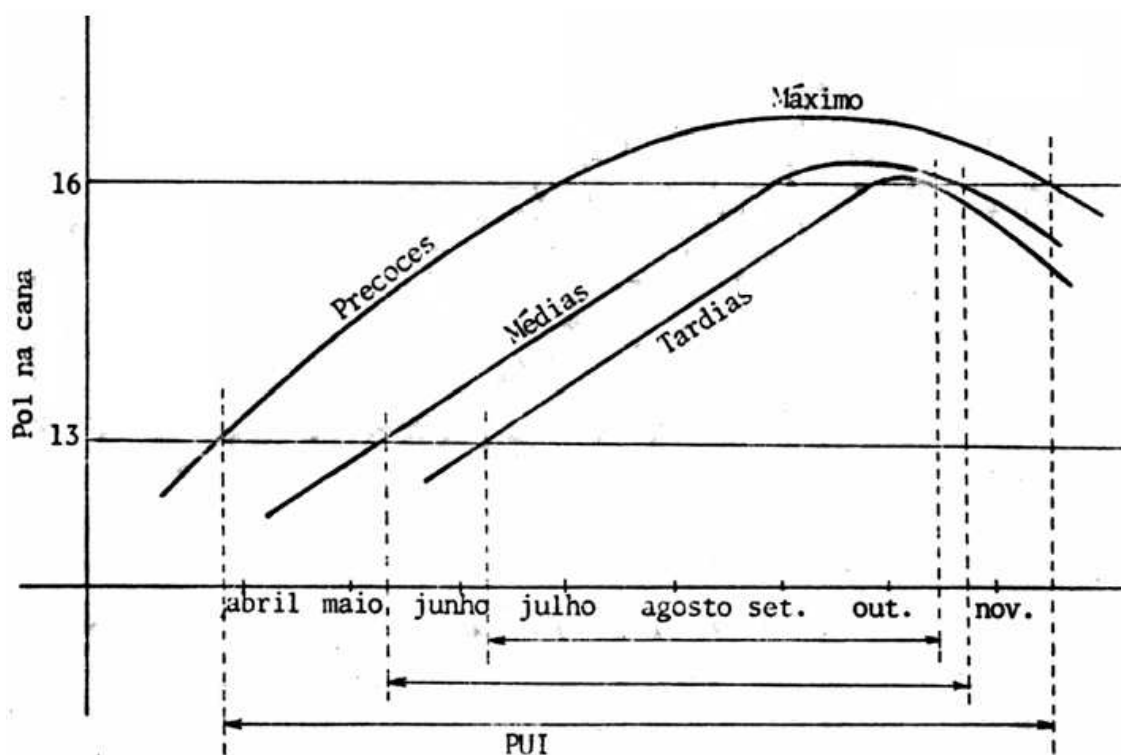


Figura 11. Comportamento das variedades de cana com relação ao período útil de industrialização (PUI).

Fonte: Novaes et al. (1974) apud Nogueira; Venturini Filho, 2005.

Como aqui observado, o máximo obtido para Pol do caldo foi em setembro para as variedades precoces e médias, enquanto as tardias apresentaram ainda elevação da Pol de setembro a dezembro (Figura 10). Porém, as contagens de leveduras foram significativamente menores em setembro (Figura 1), indicando que há uma correlação negativa entre “número de leveduras” e “ponto máximo de maturação da cana”. Esta constatação é ainda reforçada quando se verifica que as variedades de maturação média e

tardia, como RB72454, RB855536 e RB925211 mostraram maiores contagens de leveduras em maio, quando em geral se quer atingirem a Pol mínima para a industrialização, que é por volta de 12 a 13% (Figura 10).

No entanto, pode também ser observado que a proporção de leveduras *Saccharomyces* se eleva com a proximidade do pico de maturação da cana, em setembro, para as variedades média/tardia e tardia (RB867515 e RB72454, respectivamente). Para as precoces, a proporção de *Saccharomyces* foi maior antes de setembro, com exceção da RB835054. Verificando novamente o gráfico da Figura 11, pode-se inferir que estas leveduras devem atingir proporção máxima no colmo próxima ao ponto de inflexão da curva de maturação. Há possivelmente efeito da concentração de sacarose sobre as leveduras e em especial sobre as *Saccharomyces*, de forma que para o preparo do fermento caipira não se deve utilizar caldos com alto Brix e Pol.

As variedades precoces e precoces/médias (como RB835054, RB835486, RB845210 e RB855156, Figura 9) é que deveriam ser utilizadas preferencialmente no início da safra para o preparo do fermento caipira, se o objetivo é ter um fermento mais rico em leveduras *Saccharomyces*, que proporcionariam talvez uma diminuição no tempo de preparo do fermento e uma fermentação mais rápida. Durante a propagação do fermento caipira (natural), a atividade dos microrganismos, oriundos da microbiota natural da cana, ar e solo, promovem a acidificação do mosto, levando a um aumento do teor alcoólico, o que acarreta o desaparecimento de algumas espécies de leveduras. Essas mudanças de pH no mosto e no teor alcoólico, juntamente com o aumento da concentração de açúcar devido à adição constante de caldo de cana, influenciam a seleção de leveduras que prevalecem na produção de cachaça (MORAES et al., 1997; PATARO et al., 2000). Os últimos autores também mostraram que quando o fermento prensado é adicionado como inóculo nas fermentações, o mesmo vai sendo substituído gradualmente pela microbiota natural do caldo de cana, ou seja, por linhagens de leveduras selvagens mais adaptadas às condições de fermentação.

Pelo motivo acima exposto, fica reforçada a idéia de utilizar um caldo com maior proporção de leveduras *Saccharomyces*.

A variedade RB845210 apresentou ainda concentrações mais elevadas de açúcares redutores e de proteína (Figura 10), o que seria interessante para incrementar o desenvolvimento microbiano, nas adições sucessivas de caldo para o preparo do fermento natural. Testes adicionais precisam ser feitos para esta constatação, porém há um indicativo de que há possibilidade de evitar insucessos no preparo do fermento caipira manejando a variedade.

4.2 Avaliação das características microbiológicas e físico-químicas do caldo de três variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob manejo orgânico, extraído de diferentes partes do colmo.

4.2.1 Análise microbiológica

Para esta etapa do trabalho, onde procurou-se avaliar a composição de leveduras ao longo do colmo da cana, foram escolhidas três variedades, RB72454, RB835486 e RB867515. A variedade RB72454 apresenta ampla adaptabilidade e alta estabilidade, além de alta produtividade agrícola e industrial, sendo de maturação tardia. A variedade RB867515, lançada pela Universidade Federal de Viçosa, apresenta várias características de interesse como tolerância à seca; ótima brotação de soqueira, mesmo colhida crua; alto teor de sacarose, com curva semelhante à da RB72454; crescimento rápido com alta produtividade; maturação média/tardia; e boa opção como cana-de-ano. A terceira variedade (RB835486) foi escolhida por ser cana de maturação precoce/média, também com ampla adaptabilidade e altíssima riqueza, sendo inclusive recomendada para plantio em solos acrícos no cerrado (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, 2009).

A análise estatística mostrou diferença significativa entre os tratamentos para cada parâmetro estudado (variedades de cana-de-açúcar, parte do colmo, meio de cultura e período de tempo) assim como para as interações entre

esses parâmetros, exceto para as interações “parte do colmo e meio de cultura” e “variedade, parte do colmo e meio de cultura”.

Em geral, utilizando-se o teste de Tukey para comparação das médias, a variedade de cana-de-açúcar RB72454 mostrou as menores contagens de leveduras; com o meio de cultura WLN obtiveram-se os maiores números; o mês de Maio foi o que apresentou contagens mais elevadas; e as leveduras estão mais concentradas na ponta do colmo da cana-de-açúcar (do décimo primeiro ao décimo quinto entrenó), como mostra a Figura 12.

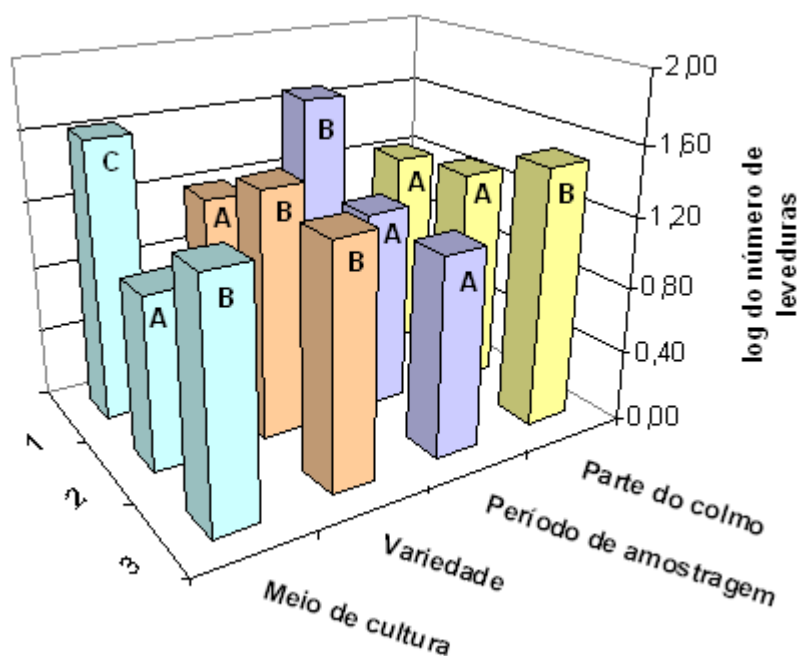


Figura 12. Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar extraído de diferentes partes do colmo da cana (1-base, 2-meio e 3-ponta) e três variedades (1-RB72454, 2-RB835486 e 3-RB867515) cultivadas sob manejo orgânico, em três períodos de amostragens (1-maio/2007, 2-setembro/2007, 3-dezembro/2007) utilizando diferentes meios de cultura (1-WLN, 2-WLD e 3-Agar Lisina). Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% dentro de cada parâmetro estudado.

Segundo Mutton (1998), a colheita do colmo da cana-de-açúcar é feita através do corte basal e apical. No último caso, chamado de desponte, o corte

pode ser realizado em diferentes alturas, com maior ou menor qualidade tecnológica e aproveitamento da matéria-prima. Para a fermentação alcoólica, há resultados mostrando que a produtividade em etanol foi maior em canas não-despontadas, enquanto a velocidade máxima de produção de etanol e rendimento da fermentação não foram afetados pelo desponte (Ferrari; Borzani, 1984). Ravaneli et al. (2003) verificaram que a não realização do desponte promoveu incrementos na viabilidade celular e de brotos no decorrer da fermentação alcoólica, provavelmente pela presença de maiores teores de açúcares redutores e minerais em caldos extraídos de colmos onde a região apical foi mantida. Esta questão será discutida mais a frente, em decorrência dos resultados similares encontrados neste trabalho.

O número de leveduras no caldo da base do colmo da cana (até o quinto entrenó) não se alterou significativamente entre as variedades de cana-de-açúcar, mas para o meio e ponta, a variedade RB72454 mostrou os menores números (Figura 13). Os mesmos resultados foram observados quando diferentes meios de cultura foram utilizados com estas variedades, especialmente para os meios seletivos como Agar Lisina e WLD. Em WLN, essas diferenças entre as variedades não foram tão notáveis, como observado anteriormente na análise das 10 variedades, o que poderia sugerir que leveduras não selvagens (as quais não assimilam lisina como única fonte de nitrogênio e/ou não são resistentes à cicloheximida, como *Saccharomyces*) são mais freqüentes no caldo da variedade RB72454 (Figura 14).

Em maio, as diferenças no número de leveduras foram mais evidentes comparando-se as três variedades. O maior valor foi para RB867515, seguido por RB835486 e RB72454, estatisticamente significativos. No entanto, em setembro e dezembro, ocorreu uma grande redução no número de leveduras, de maneira que as diferenças não foram evidentes entre as variedades (Figura 15). Observou-se assim o efeito da sazonalidade.

Observando-se a Figura 16, verifica-se que as leveduras estão concentradas na ponta do colmo da cana-de-açúcar. O número de leveduras na ponta foi maior ou igual àquele do meio do colmo, o que poderia ser

interessante para indicar a ponta da cana para a preparação do fermento natural inicial. De acordo com STUPIELLO (2000), a utilização da ponta da cana-de-açúcar não é indicada para a produção de açúcar porque apresenta um alto teor de compostos fenólicos, os quais são precursores da coloração do açúcar, além de polissacarídeos solúveis e amido, o que contribuiria para o aumento da viscosidade indesejada para a cristalização da sacarose. Para a produção de cachaça, VALSECHI (1960) apontou a inconveniência de usar tais partes (pontas) porque o caldo de cana extraído delas acaba passando por fermentação turbulenta, resultando no transbordamento dos tanques. Isto pode acontecer justamente devido à maior concentração de leveduras nas pontas da cana.

A maior concentração de leveduras no caldo da ponta do colmo da cana persiste nos períodos das amostras (maio, setembro e dezembro), embora ocorra uma diminuição ao longo do tempo (Figura 17).

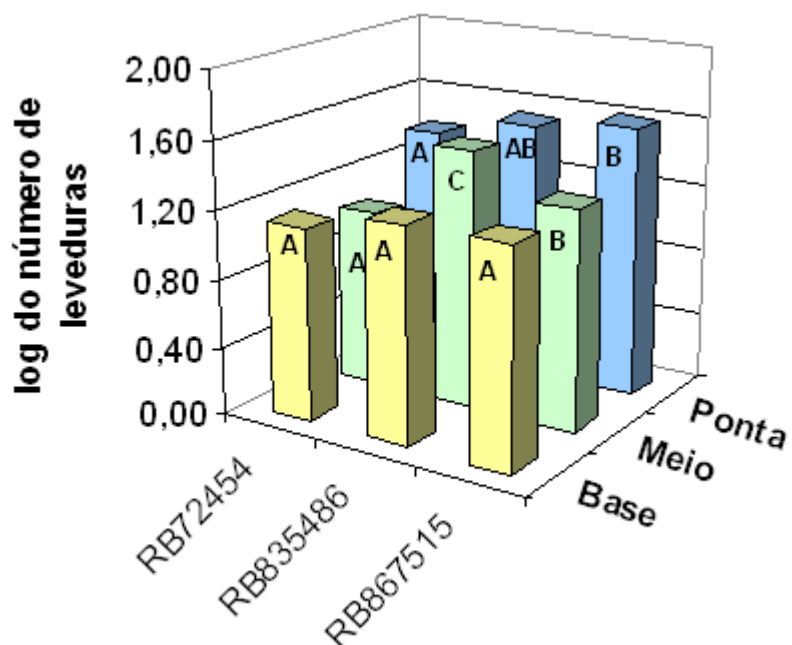


Figura 13. Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar extraído de diferentes partes do colmo da cana (base, meio e ponta) de três variedades (RB72454, RB835486 e RB867515) cultivadas sob manejo orgânico. Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% entre as variedades para cada parte do colmo.

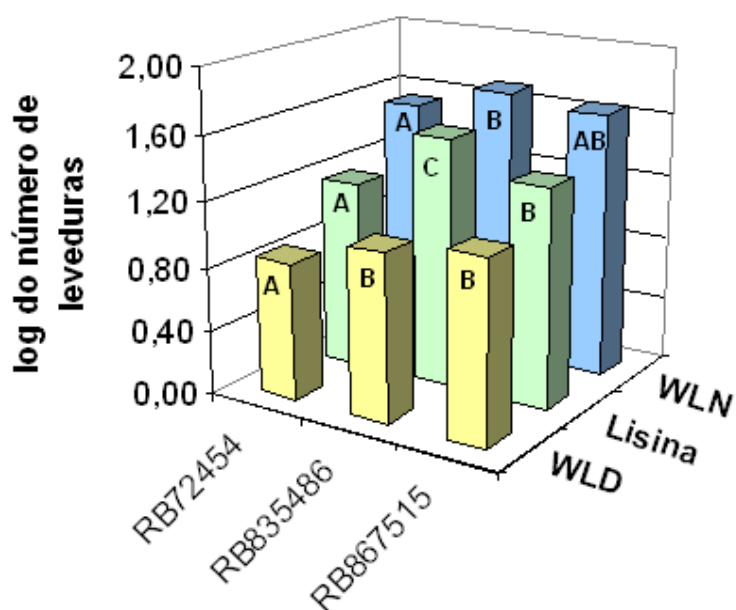


Figura 14. Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar extraído de diferentes partes do colmo da cana usando meios de cultura geral (WLN) e seletivos (Agar Lisina e WLD) a partir de três variedades (RB72454, RB835486 e RB867515) cultivadas sob manejo orgânico. Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% entre as variedades para cada meio de cultura.

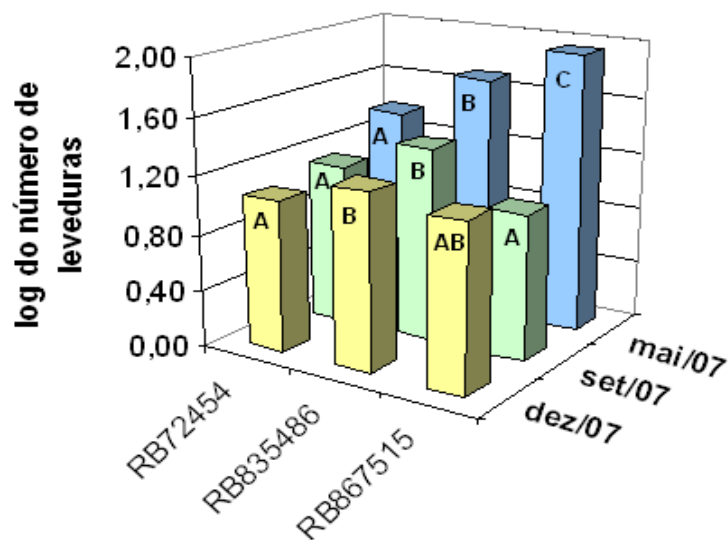


Figura 15. Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar em três períodos (maio, setembro e dezembro/2007), a partir de três variedades (RB72454, RB835486 e RB867515) cultivadas sob manejo orgânico. Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% entre as variedades para cada período de tempo.

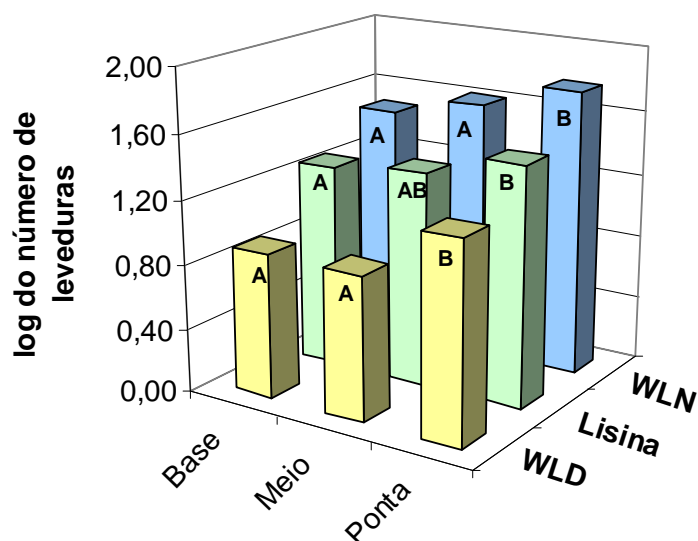


Figura 16. Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar extraído de diferentes partes do colmo (base, meio e ponta) de três variedades cultivadas sob manejo orgânico, usando meios de cultura geral (WLN) e seletivos (Agar Lisina e WLD). Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% entre as partes do colmo da cana para cada meio de cultura.

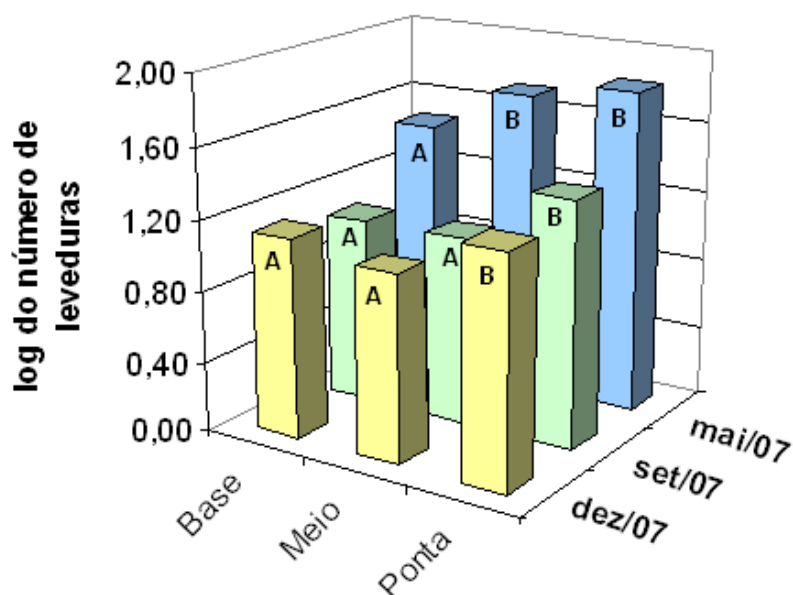


Figura 17. Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar extraído de diferentes partes do colmo (base, meio e ponta) de três variedades cultivadas sob manejo orgânico, em três períodos (maio, setembro, dezembro/2007). Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% entre as partes do colmo para cada período de tempo.

Em maio, a contagem total de leveduras (isoladas a partir de WLN) não diferiu significativamente das contagens de leveduras selvagens (isoladas a partir de WLD e Agar Lisina), sugerindo que o número de *Saccharomyces* não foi expressivo. Embora esse gênero de leveduras não tenha sido avaliado individualmente, é possível obter esta contagem pela subtração do número de leveduras que crescem no meio Agar Lisina (os quais são não-*Saccharomyces*, uma vez que este gênero não assimila lisina como única fonte de nitrogênio) do número de leveduras que crescem no meio WLN (meio não seletivo). A mesma observação é válida para os resultados do mês de setembro, mas em dezembro a contagem de leveduras no meio WLN foi diferente significativamente da contagem em Agar Lisina (Figura 18).

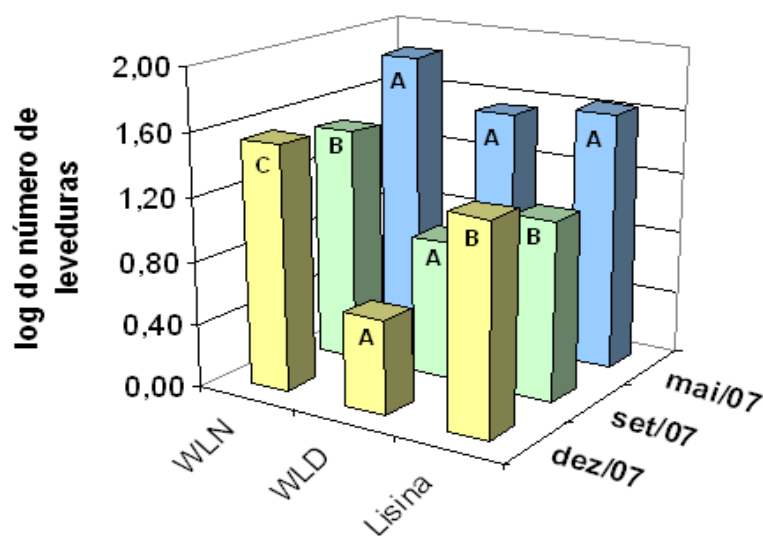


Figura 18. Log do número de leveduras isoladas a partir do caldo de cana-de-açúcar utilizando meios de cultura geral (WLN) e seletivos (WLD e Agar Lisina) em três períodos de amostragem (maio, setembro e dezembro 2007), a partir de três variedades cultivadas sob manejo orgânico. Letras diferentes significam diferença estatística ao nível de 5% entre os meios de cultura para cada período de tempo.

Considerando-se a secção do colmo, as variedades com maturação tardia e média para tardia (RB72454 e RB867515, respectivamente) apresentaram concentração de *Saccharomyces* preferencialmente na ponta,

independentemente do período de tempo, enquanto a variedade RB835486 (maturação precoce/média) mostrou essas leveduras mais concentradas na base e no meio do colmo em maio e setembro. No entanto, em dezembro houve maior concentração de *Saccharomyces* na ponta do colmo. Há também o efeito da sazonalidade na distribuição das leveduras *Saccharomyces* ao longo do colmo da cana. Geralmente o número de *Saccharomyces* foi maior na ponta, exceto para a variedade RB835486 em Maio e Setembro (Figura 19).

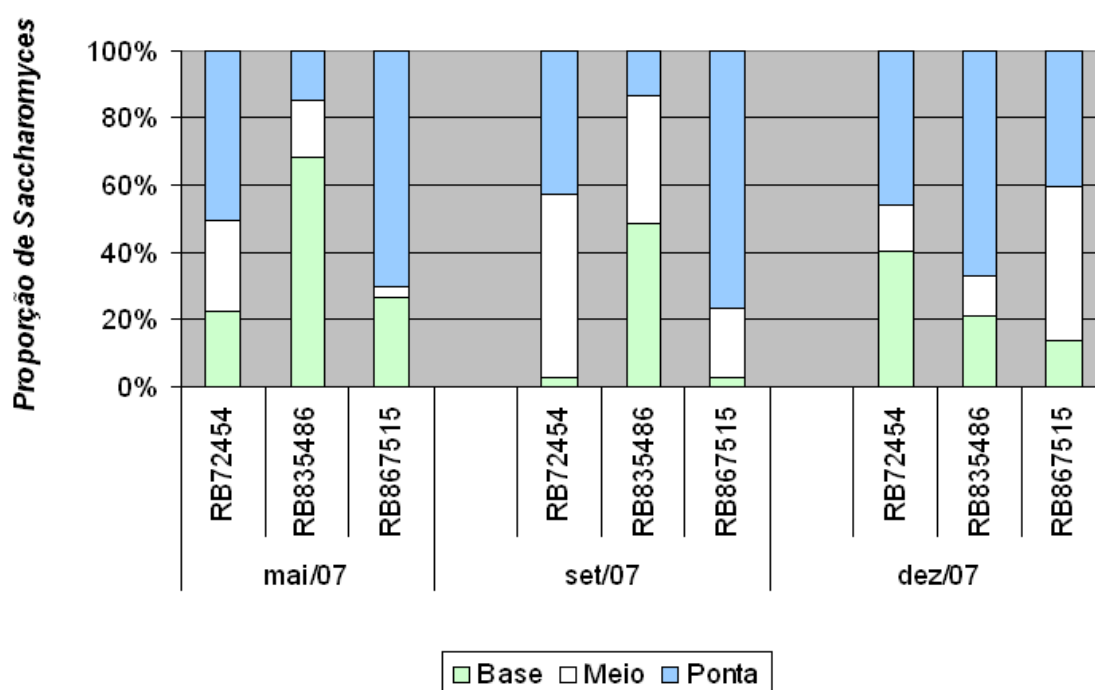


Figura 19. Proporção de *Saccharomyces* (%) encontrada no caldo de cana-de-açúcar extraído de diferentes partes do colmo da cana (base, meio e ponta), a partir de três variedades (RB72454, RB835486 e RB867515) cultivadas sob manejo orgânico, em três períodos (maio, setembro e dezembro/2007). O número de leveduras *Saccharomyces* foi deduzido a partir dos números encontrados no meio WLN e no meio Agar Lisina, como descritos em Material e Métodos.

4.2.2 Análise físico-química

Os gráficos constantes das Figuras 20 a 22 trazem os resultados das análises físico-químicas do caldo das três partes do colmo (base, meio e ponta) das três variedades (RB72454, RB835486 e RB867515) em três períodos de amostragens (maio, setembro e dezembro/2007). Quanto à maturação, as variedades RB72454 e RB867515 apresentaram uma tendência diferente da RB835486, mostrando valores crescentes de Brix de maio a dezembro. Isto é característico de variedades com maturação tardia e média/tardia, respectivamente, em oposição à variedade de maturação precoce como a RB835486. A mesma observação é válida para os parâmetros Pol e pureza.

A ponta da cana (do décimo primeiro ao décimo quinto entrenó) apresentou valores menores de Brix, Pol e pureza, em comparação com a base e o meio, para as três variedades. Porém, em dezembro, os valores tendem a serem iguais para as três seções. No decorrer do processo de maturação, o acúmulo de sacarose ocorre da base em direção à ponta. Assim, admite-se que a cana está madura para a colheita quando o teor de sacarose da base e do meio são similares, e o da ponta, ligeiramente menor do que da base e do meio (NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2005). Nas três variedades aqui estudadas, verificou-se esta ocorrência a partir de setembro, corroborando os resultados anteriores que também mostraram que a maturação, máxima para todas as variedades ocorreu em setembro. Verificou-se também que para as variedades RB72454 e RB867515, de maturação tardia e média/tardia, respectivamente, as observações de Nogueira; Venturini Filho (2005) ocorreram mais claramente em dezembro que em setembro, confirmando o *status* destas variedades quanto à maturação tardia.

Mutton et al. (1995) e Ravaneli et al. (2003) também observaram que nos tratamentos onde o desponte foi realizado, ocorreu um acréscimo no Brix. Os autores argumentam que este efeito é atribuído ao fato da região terminal do colmo apresentar elevada porcentagem de água e baixa concentração de sólidos solúveis, o que promove um efeito diluidor sobre o teor destes sólidos.

Os maiores graus de pureza também foram obtidos em colmos despontados, devido à maior presença de impurezas vegetais na ponta da cana, tais como folhas e tecidos em crescimento (RAVANELI et al., 2003).

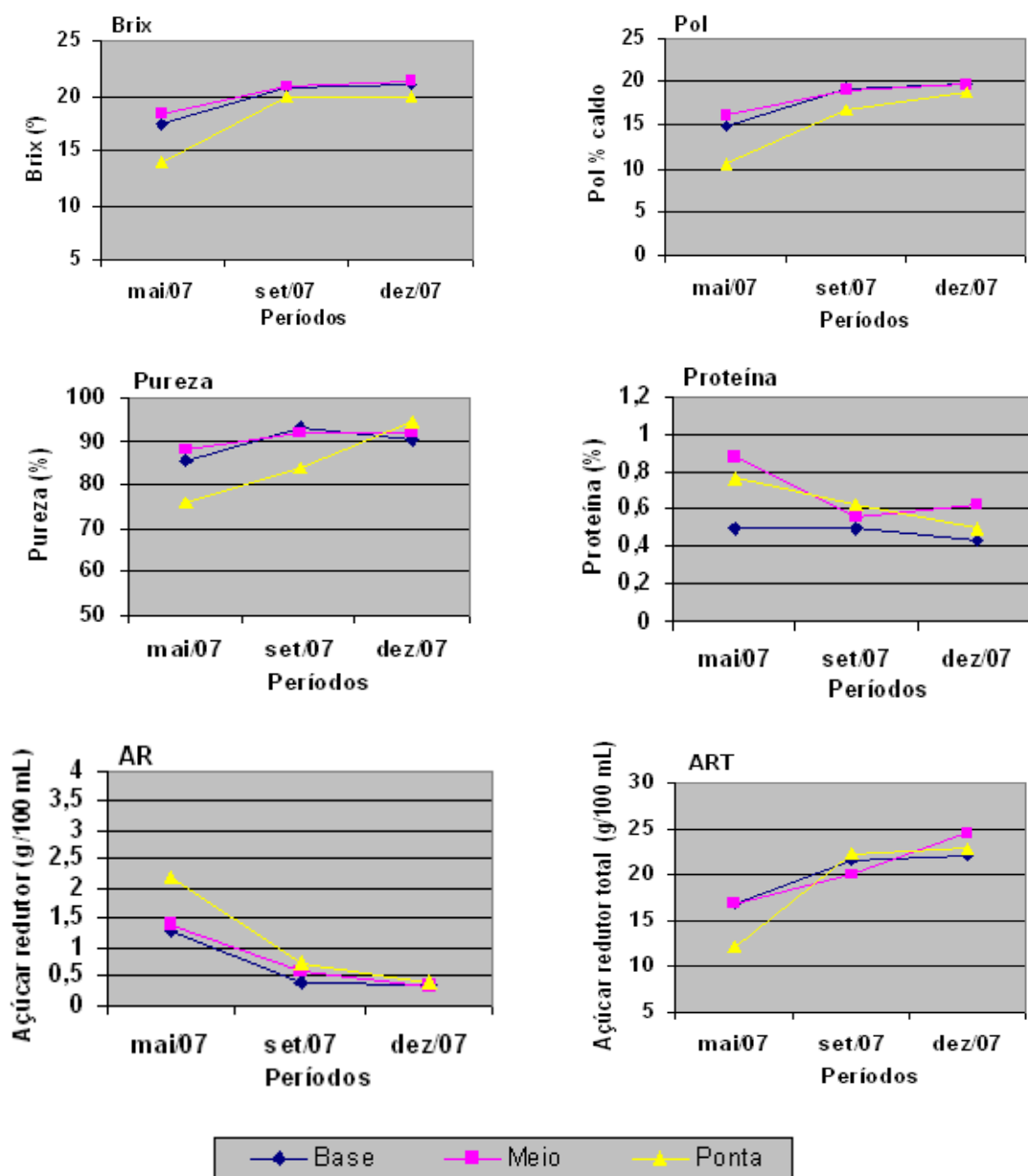


Figura 20. Parâmetros físico-químicos analisados no caldo de cana-de-açúcar de diferentes partes do colmo (base, meio e ponta) da variedade RB72454, cultivada sob manejo orgânico, em diferentes períodos de tempo (maio, setembro e dezembro/2007). (Continua...).

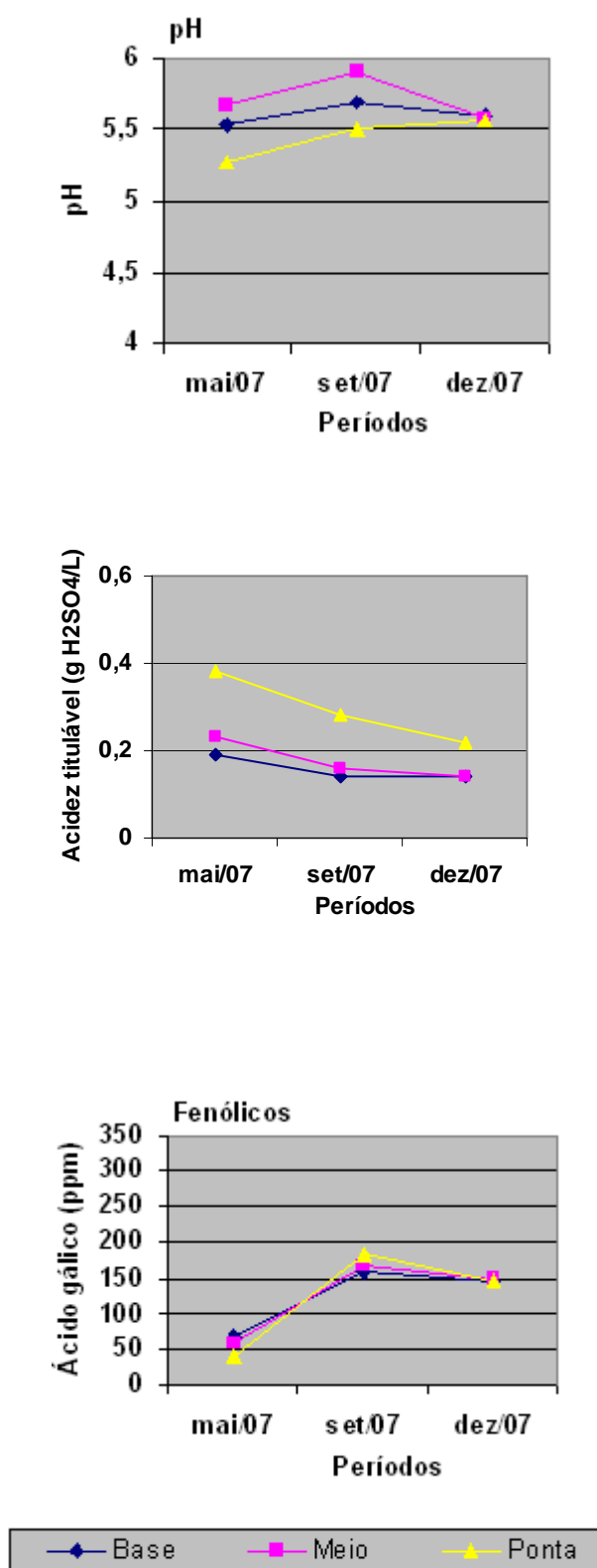


Figura 20. Parâmetros físico-químicos analisados no caldo de cana-de-açúcar de diferentes partes do colmo (base, meio e ponta) da variedade RB72454, cultivada sob manejo orgânico, em diferentes períodos de tempo (maio, setembro e dezembro/2007).

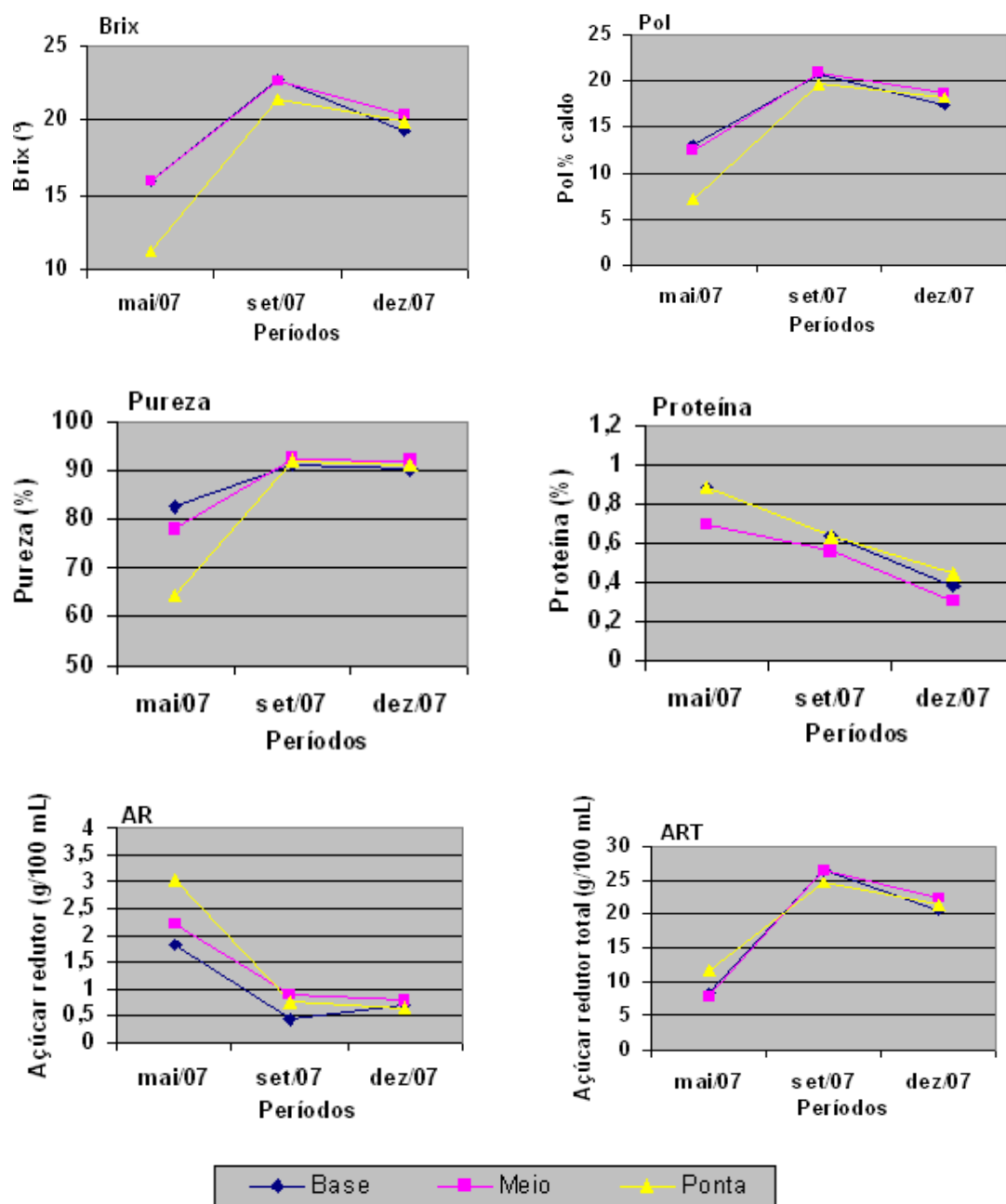


Figura 21. Parâmetros físico-químicos analisados no caldo de cana-de-açúcar de diferentes partes do colmo (base, meio e ponta) da variedade RB835486, cultivada sob manejo orgânico, em diferentes períodos de tempo (maio, setembro e dezembro/2007). **(Continua...)**

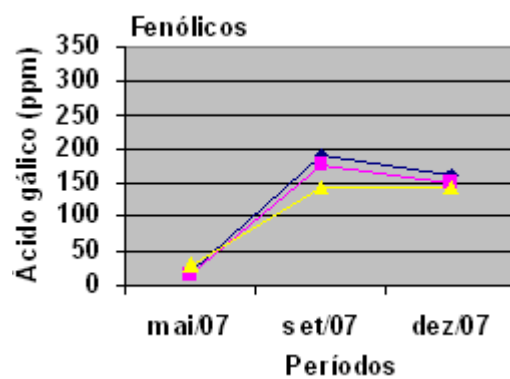
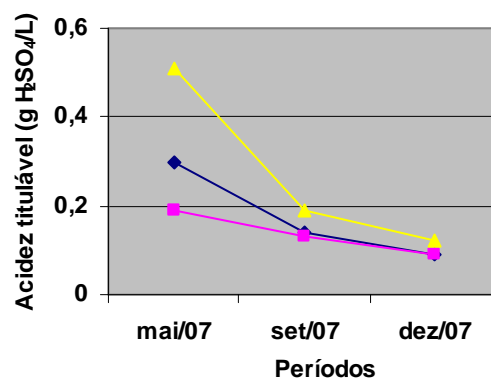
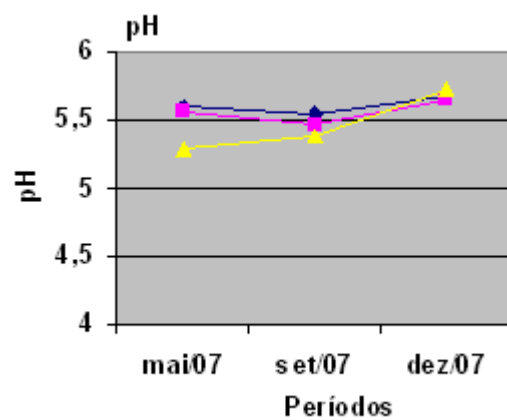


Figura 21. Parâmetros físico-químicos analisados no caldo de cana-de-açúcar de diferentes partes do colmo (base, meio e ponta) da variedade RB835486, cultivada sob manejo orgânico, em diferentes períodos de tempo (maio, setembro e dezembro/2007).

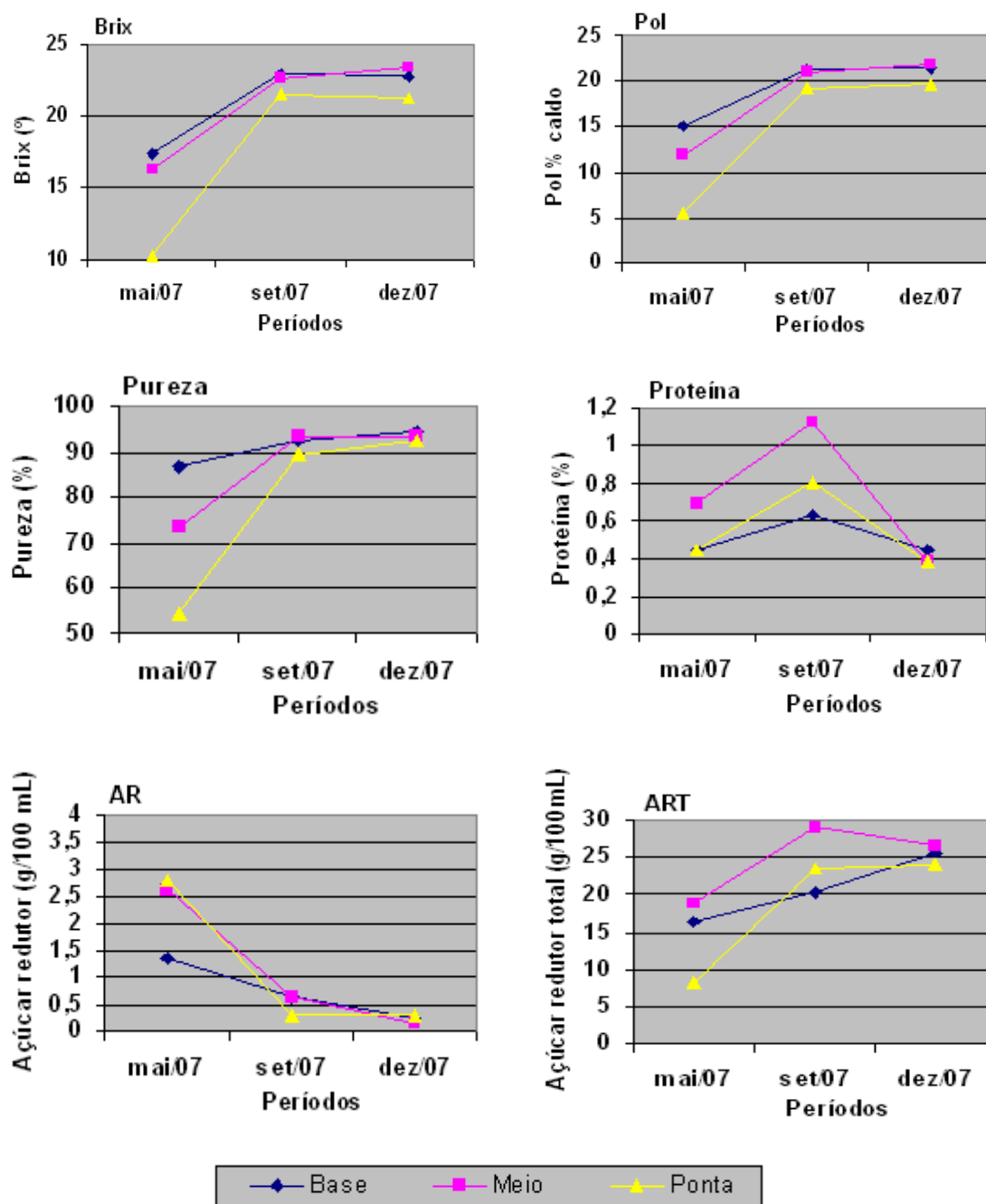


Figura 22. Parâmetros físico-químicos analisados no caldo de cana-de-açúcar de diferentes partes do colmo (base, meio e ponta) da variedade RB867515, cultivada sob manejo orgânico, em diferentes períodos de tempo (maio, setembro e dezembro/2007). **(Continua...)**.

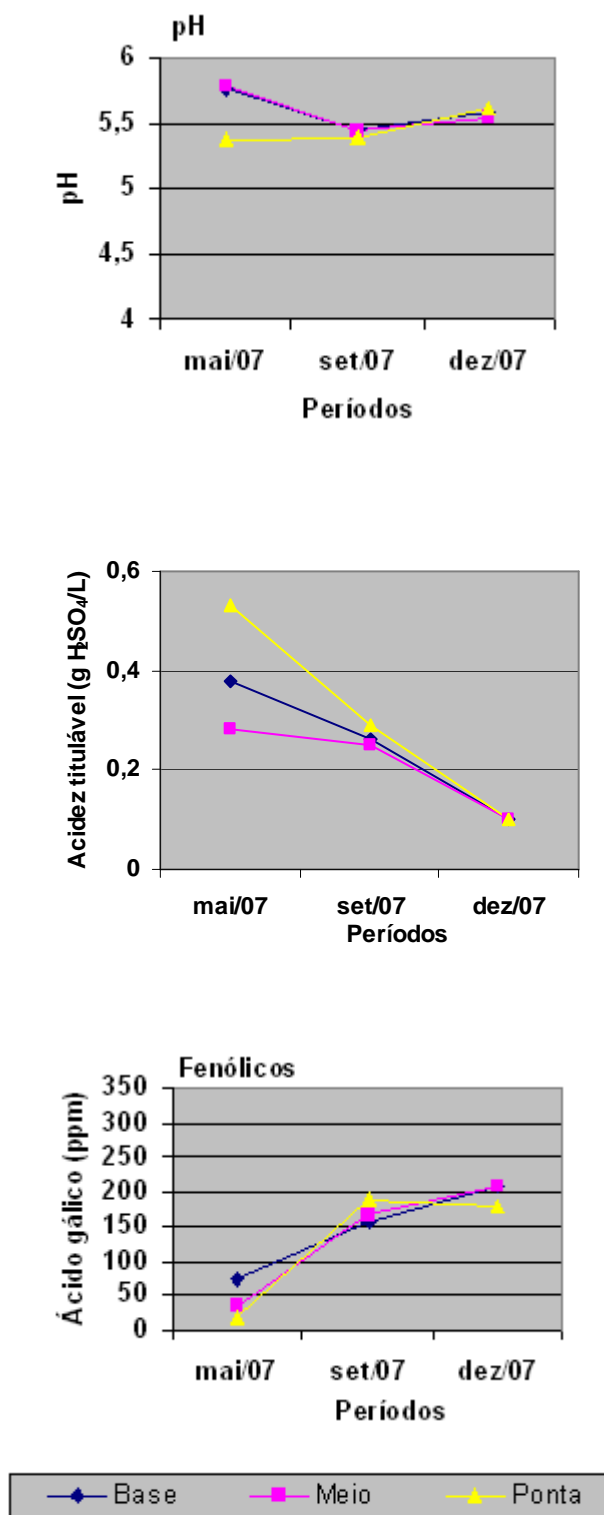


Figura 22. Parâmetros físico-químicos analisados no caldo de cana-de-açúcar de diferentes partes do colmo (base, meio e ponta) da variedade RB867515, cultivada sob manejo orgânico, em diferentes períodos de tempo (maio, setembro e dezembro/2007).

Quanto ao teor de proteína, a variedade RB867515 apresentou valores crescentes de maio a setembro, decrescendo substancialmente em dezembro. Com as outras duas variedades, houve um decréscimo significativo ao longo do período de amostragem (RB835486) ou uma estabilização em dezembro, após um período de declínio (RB72454). Para as variedades RB72454 e RB867515, o teor de proteína foi menor na base, enquanto para a outra variedade, as variações entre as partes do colmo não foram grandes. Estes resultados contradizem aqueles encontrados anteriormente quando foi analisado o caldo na íntegra, sem separação por secção do colmo, para estas três variedades.

Quanto aos teores de açúcar redutor (AR) e açúcar redutor total (ART), as curvas mostraram um decréscimo do primeiro parâmetro, e elevação do segundo, de maio a setembro. A ponta da cana apresentou valores ligeiramente superiores de AR e inferiores de ART, especialmente em maio, independentemente da variedade.

A acidez do caldo foi maior em maio, decrescendo substancialmente a seguir, e é sempre maior na ponta da cana, com tendência a se igualar em dezembro às outras partes do colmo. O pH variou de 5,0 a 6,0 no decorrer dos períodos de tempo, porém verificou-se que a variedade RB72454 apresentou um comportamento diferente, ocorrendo uma elevação do pH de maio a setembro e maiores diferenças entre as partes do colmo.

Com a variedade RB867515, a concentração de compostos fenólicos aumentou ao longo do período de amostragem (de maio a dezembro/2007), enquanto para as outras duas variedades, houve uma tendência à estabilização ou até decréscimo em dezembro, de forma que na primeira variedade atingiu-se em dezembro valor de 200 ppm, enquanto para as outras, este foi de 150 ppm.

Segundo Stupiello (2000), as pontas apresentam composição variável em função do estágio de maturação, com pureza variando de 35 a 70%, quando o colmo apresenta pureza de 83 a 90%. Verificou também que as pontas do colmo da cana apresentam teores mais elevados de açúcar redutor, aminoácidos, amido, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e polissacarídeos

totais e baixo conteúdo em sacarose. Amido e polissacarídeos não foram determinados, mas os compostos fenólicos no caldo não apresentaram valores muito diferentes entre as partes do colmo. Quanto à proteína, houve diferenças mais marcantes na variedade RB867515. Puglia (2006) colocou que os ponteiros (pontas) devem ser entendidos como os entrenós imaturos, o cartucho contendo o meristema apical e parte das folhas, que em condição normal é da ordem de 10 a 15%. Nesse trabalho, considerou-se como ponta uma extensão maior do colmo, o que pode ter tido um efeito diluidor sobre certos parâmetros, como compostos fenólicos, por exemplo. Além disso, o palmito (ou cartucho) foi descartado, não tendo sido integrado à amostra.

4.2.3 Considerações

Os resultados mostraram que o caldo da ponta da cana, considerada neste trabalho do décimo primeiro ao décimo quinto entrenó, apresentou contagens mais elevadas de leveduras, independentemente do período de safra, apesar de decrescer ao longo do tempo (Figuras 12 a 17). Além disso, o caldo desta secção do colmo apresentou teores mais elevados (ou similares à secção do meio, dependendo da variedade) de açúcares redutores, além de mais alta acidez (Figuras 20 a 22). Estas características corroboram as observações de Valsechi (1960) ao apontar fermentações turbulentas, com extravasamento das dornas, quando tais partes do colmo eram utilizadas para a produção de cachaça. As possíveis causas deste efeito podem ser o mais alto número de leveduras e maior concentração de açúcares simples disponíveis para o desenvolvimento microbiano.

Segundo Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (2008), a ponta da cana contém açúcares simples, que também produzem álcool. Além disso, também apresenta vitaminas e outras substâncias que são de grande importância para uma boa fermentação. Para a produção de aguardente, pode-se aproveitar mais da ponta da cana do que, por exemplo, para a elaboração de rapadura ou açúcar mascavo.

A presença de maiores teores de açúcares simples, como glicose e frutose, e minerais (N e P) em caldos extraídos de colmos onde a região apical foi mantida, favoreceu a multiplicação celular e viabilidade de levedura, para a fermentação etanólica (RAVANELI et al., 2003).

Mutton et al. (1995) afirmaram que na ponta da cana há mais água e menor concentração de sólidos solúveis, o que pode explicar também a maior concentração de leveduras na ponta, pois estas condições favorecem o desenvolvimento das leveduras.

O objetivo desta etapa do trabalho foi avaliar a composição do caldo das diferentes partes do colmo da cana-de-açúcar para o preparo do fermento caipira, já que há indicação do uso das pontas da cana como nutrientes para leveduras (CHAVES, 2002). Pode ser verificada a influência da variedade de cana e do período de safra sobre as contagens de leveduras nas três partes do colmo.

Integrando os resultados primeira parte (análise do caldo na íntegra) com aqueles da segunda parte (análise do caldo separadamente por secção de colmo), pode-se verificar que embora o caldo das variedades precoces e precoces/médias apresentem maior proporção de *Saccharomyces* no início da safra (maio, por exemplo), estas leveduras parecem não estar concentradas no caldo da ponta da cana neste período, como mostraram os resultados para a RB835486 (Figura 19). Sendo esta uma variedade de maturação precoce/média, entra em processo de maturação para corte (PUI) a partir de maio-junho. A sacarose começa então a migrar para o meio e a ponta da cana, coincidindo com as mais altas proporções de *Saccharomyces* nestas regiões em setembro e dezembro. Com a variedade de maturação média/tardia (RB867515), fica evidente a maior concentração de *Saccharomyces* em maio e setembro; já com a RB72454 (tardia), o caldo da ponta da cana é rico nestas leveduras desde o começo da safra (Figura 19).

Há necessidade de testar outras variedades de maturação precoce para confirmar este comportamento, porque a variedade testada -RB835486- foi a que apresentou menores números de leveduras no caldo, porém alta proporção

de *Saccharomyces*, quando o caldo foi analisado na íntegra, em maio. Isto indica que as leveduras *Saccharomyces* têm uma distribuição temporal (ao longo da safra) e espacial (ao longo do colmo), seguindo o gradiente de concentração da sacarose.

Segundo Nogueira; Venturini Filho (2005), baseando-se nos estudos da curva de maturação das variedades, existe uma tendência maior em se plantar apenas variedades precoces e médias, sendo que as primeiras em maior proporção. Sendo assim, para o preparo do fermento caipira, no início da safra deve ser utilizado o caldo de variedades de maturação precoce, preferencialmente, para se garantir um maior número de *Saccharomyces*. O caldo da ponta da cana poderia ser adicionado em uma proporção ainda a ser definida, como fonte ativa de inóculo devido às altas concentrações de leveduras; de açúcares simples; além de contribuir para acidificar o fermento, controlando o crescimento bacteriano.

No trabalho de Ravaneli et al. (2003), houve uma tendência de maior produção de ácidos em vinhos provenientes de tratamentos não-despontados, podendo indicar maior contaminação do processo fermentativo, embora a relação leveduras: bactérias no mosto não tenha sido afetada pelo desponte da cana-de-açúcar. Esta observação quanto à maior produção de ácidos nos vinhos pode ser devida ao fato da ponta da cana apresentar maior acidez e não à provável contaminação por bactérias.

Há necessidade de testes adicionais para verificar o efeito da acidez do caldo das pontas no controle da contaminação bacteriana, o que seria uma vantagem.

5 CONCLUSÕES

- As maiores contagens de leveduras foram encontradas em maio, no caldo das variedades RB72454, RB855536 e RB925211, que são de maturação média e tardia. Porém a maior proporção de *Saccharomyces* acompanhou o pico de maturação das variedades;
- Em decorrência de variações no número e composição de leveduras no caldo ao longo da safra, as variedades de maturação precoce estudadas, RB835486, RB845210 e RB855156, poderiam ser indicadas para o preparo do fermento caipira, por apresentar maior proporção de *Saccharomyces* em maio;
- As leveduras e dentre elas as *Saccharomyces*, se concentraram nas pontas da cana (do décimo primeiro ao décimo quinto entrenó, sem o palmito), sugerindo o seu uso para o preparo do fermento caipira, além de ter apresentado maiores teores de açúcar redutor e alta acidez, o que propicia e favorece o desenvolvimento das leveduras.
- As leveduras *Saccharomyces* apresentaram uma distribuição temporal e espacial, seguindo o gradiente de concentração da sacarose ao longo da safra e ao longo do colmo da cana, respectivamente.

6 LITERATURA CITADA

ABREU JÚNIOR, H. de (Coord.). **Práticas alternativas de controle de pragas e doenças na agricultura**: coletânea de receitas. Campinas: EMOPI, 1998. 115p.

ALEXANDER, A.G. **Sugarcane physiology**. Amsterdam: Elsevier, 1973. 752p.

ALVES, M. **Mercado da cachaça**. 40. ed. Brasília, Envasador: Guia de fornecedores, 2009. Disponível em:
http://www.ibrac.net/index.php?option=com_content&view=article&id=130:mercado-de-cachaca&catid=3:noticias&Itemid=57. Acesso em 20 abril de 2009.

AMBIENTEBRASIL. **Principais produtos orgânicos produzidos no Brasil**. Disponível em:
<<http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./agropecuario/index.html&conteudo=./agropecuario/produtosorg.html#produ>>. Acesso em: 06 mar. 2009.

ANDRADE, L.A.B. Cultura da cana-de-açúcar. In: CARDOSO, M.G. (Ed.) **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. Lavras: UFLA, 2006. Cap. 1. p. 25-67.

ANUÁRIO brasileiro da cana-de-açúcar. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2005. 136p.

BOZA, Y.; HORII, J. Influência da destilação sobre a composição e a qualidade sensorial da aguardente de cana-de-açúcar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.18, n.4, out./dez. 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611998000400006&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 10 set. 2008.

BRASIL. Lei nº 10.831, de 23 dez. 2003: define o que é e quais são as finalidades dos sistemas orgânicos de produção. **Diário Oficial**, Seção I, Brasília, 24 dez. 2003, p. 11399.

BUCHELI, C. S.; ROBINSON, S. P. Contribution of enzymatic browning to color in sugarcane juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 42, n. 2, p. 257-261, 1994.

CABRINI, T.K.; GALLO, R.C. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do Estado de São Paulo, Brasil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v 56, n.1, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-90161999000100028&script=sci_arttext> Acesso em: 09 fev. 2006.

CACHAÇAS: tudo sobre a cachaça. Disponível em: <http://www.chefonline.com.br>. Acesso em: 06 mar. 2009.

CALEGARI, A. **Leguminosas para adubação verde de verão no Paraná**. Londrina: IAPAR, 1995. 117p.

CAPORAL, F. R.; COSTABEBER, J. A. Análise multidimensional da sustentabilidade: uma proposta metodológica a partir da agroecologia. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, Porto Alegre, v.3, n.3, jul./set. 2002.

CARDOSO, M.G. **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. Lavras: UFLA, 2001. 264p.

CARVALHO NETTO, O.V. **Identificação de bactérias contaminantes de fermento de cachaça por sequenciamento do gene 16S rDNA**. 2007. 51f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

CECCATO-ANTONINI, S.R. **Métodos de análise e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria.** Araras: UFSCar, 2004. 33p. (Apostila). Disponível em: <<http://www.cca.ufscar.br/lamam/download/apostila-monitoramento-microbiologico.pdf>>. Acesso em: 18 fev. 2006.

CHAVES, J.B.P. **Cachaça: produção artesanal de qualidade.** 2. ed. Viçosa: CPT, 2002. 144p.

COMPANHIA ALBERTINA. **Açúcar orgânico.** Disponível em: <http://www.albertina.com.br/acucar_organico/acucar.htm>. Acesso em: 20 set. 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira Cana-de-açúcar: Safra 2008/2009: terceiro levantamento.** Brasília, 2008. Disponível em: www.conab.gov.br/canabweb/download/safra/1_levanamento0708. Acesso em: 15 dez. 2008.

COSTA, F. **Cachaça: APLS aumentam lucros e geram empregos.** maio 2005. Disponível em: <<http://www.geranegocio.st/html/topo/video/index.asp>>. Acesso em: 15 fev. 2006.

CRISPIM, J.E. **Manual da produção de aguardente de qualidade.** Guaíba: Agropecuária, 2000. 336p.

DELGADO, A. A.; CESAR, M. A. A. **Elementos de tecnologia e engenharia do açúcar de cana.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, 1977. 752 p. v. 2.

DEPARTAMENTO DE ESTUDOS SÓCIO-ECONÔMICOS RURAIS. **Estudo exploratório 04: a conjuntura da produção de cana-de-açúcar no Brasil e a dinâmica das exportações de açúcar no mercado mundial.** Curitiba, 2005. Disponível em: <http://www.mda.gov.br/saf/arquivos/estudo_cana-de-acucar.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2006.

DEUBER, R. Maturação da cana-de-açúcar na região Sudeste do Brasil. In: SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA AGRONÔMICA, 4., 1988, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Copersucar, 1988. p. 33-40.

DOMÍNGUEZ, L.E.V.; NELSON, L.D.; MAIA, A.R.B.A. Influência do fubá e do farelo de arroz sobre a formação de produtos secundários da fermentação alcoólica. **STAB**, Piracicaba, v.15, n.4, p.28-31, mar./abr. 1997.

FERNANDES, A. C. **Cálculos na agroindústria da cana-de-açúcar**. 2. ed. Piracicaba: STAB, 2003. 240p.

FERRARI, S.E.; BORZANI, W. Influência do desponte da cana-de-açúcar, variedade CB 41-76, na fermentação alcoólica do caldo. In: Anais CONGRESSO NACIONAL STAB, 3.; CONVENÇÃO DA ACTALAC, 5., 1984, São Paulo. **Anais...** Piracicaba: STAB, 1984. p.436-442.

GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. 1989. 388 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.

GOULART, S. P. et al. **Cana-de-açúcar**: variedades e metodologias a serviço da agricultura familiar. Disponível em: <http://www.astrf.brtdata.com.br/html/publicacoes/llcba/cana/pub_cana_congrbragro.html>. Acesso em: 19 nov. 2006.

GREEN, S.R.; GRAY, P.P. A differential procedure applicable to bacteriological investigation in brewing. **Wallerstein Laboratories Communications**, New York, v.13, p.357-366, 1950.

HOFFMANN, H.P. et al. **Quatro novas variedades RB de cana-de-açúcar para a região Centro-Sul**. Araras: CCA/UFSCar, 2006. 18p.

HORWITZ, W. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 12.ed. Washington : Analytical Chemistry, 1975. 1094p.

KREGGER van RIJ, N. J. W. **The yeasts**: a taxonomic study. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 1984. 1082p.

LEITE, G.H.P. et al. Reguladores vegetais e qualidade tecnológica da cana-de-açúcar em meio de safra. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.6, p.1843-1850, 2008.

LIMA, U.A. **Aguardente: fabricação em pequenas destilarias**. Piracicaba: Fealq, 1999. 187p.

MACHADO, R. **Sistemas de produção orgânicos para a soca da cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) consorciada com milho (*Zea mays*), feijão (*Phaseolus vulgaris*) e mandioca (*Manihot esculenta*)**. 2008. 87 f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural) - Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2008.

MAIA, A. B. Compostos secundários da aguardente. **STAB**, Piracicaba, v. 12, n. 6, p. 29-34, 1994.

MANIERO, M. A. **Aplicação do método de graus dia em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)** 1980. 76f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1980.

MANUAL dos derivados da cana-de-açúcar: diversificação, matérias-primas, derivados do bagaço, derivados do melaço, outros derivados, resíduos, energia. Brasília: ABIPTI, 1999. 474p.

MARGARIDO, L.A.C. **Integração produção-processamento de alimentos orgânico em pequenas propriedades**. Araras: UFSCar, 2005. Projeto apresentado e aprovado pelo CNPq.

MATSUOKA, S. **Relatório anual do Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar**. Araras: UFSCar, 2000. 49p.

MATSUOKA, S. et al. Comportamento de variedades de cana-de-açúcar em um sistema orgânico de produção. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 8., 2002, Recife, **Anais...** Recife: [s.n.], 2002. p.301-308.

MENEGHIN, S.P. **Efeito da aplicação de fitorreguladores em rizobactérias isoladas de diferentes variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), no município de Araras-SP**. 2008. 95 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

MORAES, P. B. et al. Short communication: characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian sugar-cane aguardente. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. Oxford, v. 13, p. 241-243, 1997.

MORRIS, E.O.; EDDY, A.A. Method for the measurement. of wild yeast infection in pitching yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v.63, n.1, p.34-35, 1957.

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

MUTTON, M.J.R.; MUTTON, M.A.; CASAGRANDE, A.A. Rendimento da fermentação etanólica em fase líquida e semi-sólida em colmos de cana-de-açúcar com e sem despolpa. **STAB**, Piracicaba, v.13, n.16, p. 48-53, 1995.

NATIVE ALIMENTOS. **Cana orgânica promove aumento da biodiversidade**. Disponível em: <<http://www.nativealimentos.com.br/noticias.php?i=1>>. Acesso em: 29 set. 2006.

NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI FILHO, W. G. **Aguardente de cana**. Botucatu: UNESP- Faculdade de Ciências Agrônomicas, 2005. 70p.

NOVAES, R.F. Controle industrial na fabricação da aguardente de cana-de-açúcar. In: SEMANA DA FERMENTAÇÃO ALCOOLICA, 2., 1966, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: I. Z./ Esalq, 1966. p. 160-187. v. 2.

OLIVEIRA, A. C. G. et al. Efeitos do processamento térmico e da radiação gama na conservação de caldo de cana puro e adicionado de suco de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.4, p.863-873, out./dez. 2007.

OLIVEIRA, M.C.F.L.; PAGNOCCA, F.C.; Aplicabilidade de meios seletivos empregados na indústria cervejeira para a detecção de leveduras selvagens em unidades sucroalcooleiras. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 8., São Lourenço, 1988. **Anais...** São Lourenço: SINAIFERM, 1988. p. 78-81.

PACKOWSKI, G.W. Beverage spirits, distilled. In: KIRK, R.E.; OTHMER, D.F. (Ed.) **Encyclopedia of chemical technology**. 3rd ed. New York: John Wiley, 1978. p.830-863. v.3.

PASCHOAL, A.D. **Produção orgânica de alimentos: agricultura sustentável para os séculos XX e XXI**. São Paulo: Globo, 1994. 191p.

PATARO, C. et al. A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil, **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 89, n.1, p. 24-31, 2000.

PUGLIA, A. L. **Desempenho de leveduras selvagens com potencial de produção de enzimas amilolíticas em processo fermentativo**. 2006. 42f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2006.

RASPOR, P.; CADEZ, N.; CUS, F. Biodiversity and functions of indigenous yeast flora on fermentation. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON YEASTS, 12., 2008, Kiev-Ucrânia. **Book of abstracts...** Kiev, 2008. p. 50.

RAVANELI, G. C. **Efeito da cigarrinha-das-raízes com tratamento químico sobre a qualidade da matéria-prima e fabricação de álcool**. 2005. 71f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias, Jaboticabal, 2005.

RAVANELI, G.C. et al. Produção de cachaça: efeito da época e do sistema de manejo da colheita da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. Var. RB855156) sobre o processo fermentativo. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES - SINAFERM, 14., 2003, Florianópolis. **Anais...** Disponível em: <http://www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t262.doc>. Acesso em: 10 set. 2008.

RIBEIRO, J.C.G.M. **Fabricação artesanal da cachaça mineira**. 2.ed. Belo Horizonte: O Lutador, 2002. 221p.

RODRIGUES, J.D. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. Botucatu: IB/UNESP, 1995. 69p.

ROMANO, P. Trend of starter culture use in winemaking. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON YEASTS, 12., 2008, Kiev-Ucrânia. **Book of abstracts...** Kiev, 2008. p. 49.

SAES, L.A. et al. Avaliação preliminar do potencial agrônômico de algumas variedades de cana-de-açúcar no município de Pariquera-Açu, no Vale do Ribeira. **Stab**, Piracicaba, v.26, p.35,1990.

SCHWAN, R.F. et al. Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 79, p. 89-96, 2001.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Brasil e mundo**. Mercado de orgânicos. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/setor/agricultura-organica/o-setor/mercado/brasil-e-mundo>>. Acesso em: 05 mar. 2009a.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Cachaça capixaba**: um pouco de história. Vitória, 2008. Disponível em: <<http://201.2.118.66/arquivos/biblioteca/Cacha%C3%A7a%20Capixaba.pdf>>. Acesso em: 05 mar. 2009b.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Sistema agroindustrial da cachaça de alambique**: estudo técnico das alternativas de aproveitamento da cana-de-açúcar. Belo Horizonte, 2004.

SILVA, N. Influência do resfriamento em torre sobre a microbiota do caldo de cana no processo de produção de álcool. 1988. 118 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - **Faculdade de Engenharia de Alimentos**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1988.

SORATTO, A. N; VARVAKIS, G.; HORII, J. A certificação agregando o valor à cachaça no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.4, p.681-687, out./dez. 2007.

STUPIELLO, J.P. Pontas de cana: problema industrial? **STAB**, Piracicaba, v. 18, n. 4, p.12, 2000.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA-DE-ÁÇÚCAR. **UNICA prevê moagem de até 550 milhões de toneladas de cana na região centro-sul nesta safra 29/04/2009**. Disponível em: <http://www.unica.com.br/noticias>. Acesso em: 20 abril de 2009.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar. **Catálogo RB**. Disponível em: <<http://pmgca.dbv.cca.ufscar.br/html/catal/catvaried.php>>. Acesso em: 05 mar. 2009.

VALSECHI, O. **Aguardente de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Esalq, 1960. 116p.

VASCONCELOS, A.C.M. **Comportamento de clones IAC e variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) nas condições edafoclimáticas da região do Vale do Paranapanema**. 1998. 108f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1998.

WALTERS, L. S.; THISELTON, M. R. Utilization of lysine by yeasts. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v.59, p.401, 1953.

YOKOYA, F. Problemas com contaminantes na fermentação alcoólica, **STAB**, Piracicaba, v.9, n.6, p.38-39, jul./ago. 1991.

APÊNDICE

Análise estatística das 10 variedades de cana X período de tempo

Variável analisada: NÚMERO DE LEVEDURAS UFC/ML

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADE	9	3.637957	0.404217	54.353	0.0000
MEIO_DE_CU	2	5.667633	2.833817	381.048	0.0000
TEMPÓ	2	4.228535	2.114268	284.294	0.0000
REPETIÇÃO	1	0.019356	0.019356	2.603	0.1102
VARIEDADE*MEIO_DE_CU	18	0.533930	0.029663	3.989	0.0000
VARIEDADE*TEMPO	18	10.668317	0.592684	79.695	0.0000
MEIO_DE_CU*TEMPO	4	1.677357	0.419339	56.386	0.0000
VARIEDADE*TEMPO*MEIO	36	3.262950	0.090637	12.188	0.0000
erro	89	0.661885	0.007437		
Total corrigido	179	30.357920			
CV (%) =	4.90				
Média geral:	1.7597835	Número de observações:	180		

Análise estatística das 3 variedades de cana X secção do colmo X período de tempo

Variável analisada: NÚMERO DE LEVEDURAS UFC/ML

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADE	2	1.809530	0.904765	21.789	0.0000
REP	1	0.106360	0.106360	2.561	0.1121
POSICÃO	2	2.349091	1.174545	28.286	0.0000
MEIO_DE_CU	2	10.439530	5.219765	125.706	0.0000
TEMPÓ	2	9.431069	4.715535	113.562	0.0000
VARIEDADE*POSICÃO	4	0.723210	0.180803	4.354	0.0025
VARIEDADE*MEIO_DE_CU	4	0.477589	0.119397	2.875	0.0257
VARIEDADE*TEMPO	4	2.612417	0.653104	15.728	0.0000
POSICÃO*MEIO_DE_CU	4	0.263600	0.065900	1.587	0.1821
POSICÃO*TEMPO	4	0.677666	0.169417	4.080	0.0039
MEIO_DE_CU*TEMPO	4	2.772124	0.693031	16.690	0.0000
VARIEDADE*POSICÃO*ME	8	0.604667	0.075583	1.820	0.0797
erro	120	4.982845	0.041524		
Total corrigido	161	37.249698			
CV (%) =	15.27				
Média geral:	1.3347635	Número de observações:	162		

Dados climáticos de janeiro a dezembro de 2007.

Período: Jan/2007 a Dez/2007

Ano	Mês	Precipit (mm)	Méd hist (mm)	Variação (%)	Dias c/ chuva	Máxima (°C)	Mínima (°C)	Média (°C)	Méd hist (°C)	Variação (%)
2007	Jan	370,4	271,3	36,5	21	28,1	19,4	23,7	23,9	-0,5
	Fev	199,0	197,2	0,9	10	30,8	18,6	24,7	24,1	2,5
	Mar	192,4	156,1	23,2	10	31,5	18,4	25,0	23,5	6,1
	Abr	53,6	67,3	-20,3	9	29,3	17,4	23,3	21,8	7,0
	Mai	81,8	71,7	14,1	6	25,0	12,6	18,8	19,0	-1,3
	Jun	14,4	41,7	-65,5	3	26,1	12,3	19,2	17,9	7,3
	Jul	147,4	35,8	311,5	8	24,1	11,5	17,8	17,7	0,2
	Ago	0,0	30,7	-100,0	0	27,8	11,9	19,8	19,7	0,9
	Set	0,0	68,0	-100,0	0	30,9	15,6	23,3	20,8	11,7
	Out	82,2	121,0	-32,0	8	32,2	16,6	24,4	22,4	9,1
	Nov	152,0	152,2	-0,1	11	29,7	16,4	23,0	23,0	0,3
	Dez	193,8	209,6	-7,6	11	29,7	18,0	23,9	23,4	2,0

Dados do Balanço Hídrico do período de janeiro a dezembro de 2007

BALANÇO HÍDRICO (THORNTHWAITE)												
Latitude:	22°18' S	CAD: 100	Período: Jan/2007 a Dez/2007									
<p>Fonte: UFSCar/CCA</p>												
Ano	Mês	Temp	Precip	ETP	P-ETP	NEG-AC	ARM	ALT	ETR	Déficit	Excedente	
2007	Jan	23,7	370,4	118,2	252,2	0,0	100,0	0,0	118,2	0,0	252,2	
	Fev	24,7	199,0	115,0	84,0	0,0	100,0	0,0	115,0	0,0	84,0	
	Mar	25,0	192,4	125,9	66,5	0,0	100,0	0,0	125,9	0,0	66,5	
	Abr	23,3	53,6	96,7	-43,1	-43,1	65,0	-35,0	88,6	-8,1	0,0	
	Mai	18,8	81,8	54,0	27,8	-7,5	92,8	27,8	54,0	0,0	0,0	
	Jun	19,2	14,4	53,0	-38,6	-46,2	63,0	-29,7	44,1	-8,9	0,0	
	Jul	17,8	147,4	44,7	102,7	0,0	100,0	37,0	44,7	0,0	65,7	
	Ago	19,8	0,0	61,1	-61,1	-61,1	54,3	-45,7	45,7	-15,4	0,0	
	Set	23,3	0,0	94,0	-94,0	-155,2	21,2	-33,1	33,1	-61,0	0,0	
	Out	24,4	82,2	116,2	-34,0	-189,1	15,1	-6,1	88,3	-27,9	0,0	
	Nov	23,0	152,0	101,8	50,2	-42,7	65,3	50,2	101,8	0,0	0,0	
	Dez	23,9	193,8	119,0	74,8	0,0	100,0	34,7	119,0	0,0	40,0	

Os dados climáticos e de balanço hídrico foram obtidos no site www.cca.ufscar.br/servicos/DRN_clima_2.xls