

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO - UNIFENAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AÇÃO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA
REDUÇÃO DA MICROBIOTA DO CALDO
DE CANA PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA**

NORIVAL FRANÇA

Alfenas – MG
2010

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO - UNIFENAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AÇÃO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA
REDUÇÃO DA MICROBIOTA DO CALDO
DE CANA PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA**

Dissertação apresentada à Universidade José do
Rosário Vellano, como parte dos requisitos exigidos
pelo programa de Mestrado em Ciência Animal para
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Evangelista Fiorini

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Nelma de M. S. Oliveira

Alfenas – MG
2010

França, Norival

Ação da radiação ultravioleta na redução da microbiota do caldo de cana para produção de cachaça / -- Norival França.--
Alfenas: Unifenas, 2010.

48f.

Orientador: Prof. Dr. João Evangelista Fiorini.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -- Universidade
José do Rosário Vellano.

1. Contaminação bacteriana 2. Microbiologia 3. Desinfecção

I. Título

CDU: 576.8 (043)

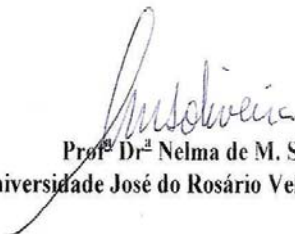
Norival França

**AÇÃO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA REDUÇÃO DA MICROBIOTA DO
CALDO DE CANA PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA.**

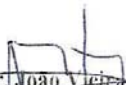
Alfenas, 05 de fevereiro de 2010



**Prof. Dr. João Evangelista Fiorini
Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS**



**Prof. Dr.ª Nelma de M. S. Oliveira
Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS**



**Prof. Dr. João Vieira Monteiro
Fundação de Ensino Superior de Passos
Universidade do Estado de Minas Gerais FESP/UEMG**

**Alfenas-MG
2010**

À minha esposa Vilma e meus filhos Natália e Daniel que são os motivos de minhas lutas e buscas de novos ideais.

A Deus que é o grande criador da vida e motivo da nossa existência.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus e à nossa Mãe Celestial que nos direciona em todos os momentos de nossas vidas.

Ao Prof. Dr. João Evangelista Fiorini que me acolheu como orientando, pela sua experiência científica e pelos seus ensinamentos e competências inigualáveis.

À minha Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nelma de M. S. Oliveira pelas excelentes dicas no trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos UNIFENAS Luciana Rosa Alves Rufino e Grazielle Esteves pela ajuda na realização do trabalho.

Ao Prof. Edson Antônio Velano pela criação de um Centro de Estudos e Pesquisas de Excelência (*In Memoriam*).

À Reitora Prof^a. Maria do Rosário Velano por me proporcionar esta conquista.

Ao Coordenador do Mestrado Prof. Dr. Paulo Figueiredo pela atenção.

A todos os Professores do Programa de Mestrado, pelos conhecimentos a nós transmitidos.

A Prof^a. Dr^a. Roberta Bessa Veloso pela excelente ajuda na parte de estatística dos dados analíticos.

A Prof^a. Dr^a. Odila Rigolin de Sá pela valiosa contribuição no trabalho.

Aos meus colegas de viagens Luciene Oliveira Costa, Michael Silveira Reis, Tânia Cristina Telles e Wander Andrade Silva pelos momentos que passamos juntos durante a caminhada.

Ao meu pai Antônio França dos Santos (*In Memoriam*) e minha mãe Cecília Ferreira Soares que muito contribuíram para formação dos alicerces de minha educação.

Aos meus irmãos que de alguma forma sempre me ajudaram.

À Indústria e Comércio de Aguardente Tucaninha na pessoa do Sr. Leandro Godinho por ter contribuído para a instalação e desenvolvimento do experimento.

À Usina Itaiquara de açúcar e álcool nas pessoas dos funcionários do Laboratório, Sr. Luiz Antônio da Silva e de Sra. Daniela Gonçalves pelas realizações das análises.

Ao Laboratório de Análises Ambientais e Produtos Alimentícios da Fundação de Ensino Superior de Passos e aos estagiários pela realização das análises.

À Fundação de Ensino Superior de Passos pela concessão da ajuda de custo nas viagens.

À Universidade do Estado de Minas Gerais – UEMG, pelo apoio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, pela bolsa de estudo sob processo n. n. 90302/08.

À UNIFENAS por me proporcionar a realização deste sonho.

MUITO OBRIGADO

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Fluxograma de produção da cachaça.	18
FIGURA 2- Espectro eletromagnético	24
FIGURA 3- Ilustração da moagem da cana-de-açúcar.....	27
FIGURA 4- Ilustração das lâmpadas de radiação ultravioleta instaladas nos tampos	29
FIGURA 5- Ilustração da câmara de desinfecção para tratamento do caldo de cana	29
FIGURA 6- Ilustração da coleta do caldo de cana para análise microbiológica.....	31
FIGURA 7- Ilustração da diluição seriada das amostras de caldo de cana	31
FIGURA 8- Ilustração das placas de petrifilm após período de incubação.	32
FIGURA 9- Ilustração das dornas de fermentação do caldo de cana.....	32
FIGURA 10- Ilustração do aparelho destilador (alambique)	34

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Médias da porcentagem de impurezas, do pH e brix do caldo de cana antes de ser submetido à radiação ultravioleta.	36
TABELA 2. Número médio de microrganismos, em UFC/mL, no caldo de cana radiado de acordo com os tempos estudados.	38
TABELA 3. Médias dos parâmetros analisados para o vinho resultante do caldo de cana antes e após ser submetido à radiação ultravioleta.	39
TABELA 4. Análises físicas e químicas de cachaças produzidas com caldo de cana radiado e não radiado com ultravioleta comparado a legislação vigente...	41

LISTA DE ABREVIATURAS

- CCR - Caldo de cana Com Radiação.
- CHCR - Cachaça Com Radiação.
- CHSR - Cachaça Sem Radiação.
- CSR - Caldo de cana Sem Radiação.
- UV - Ultravioleta.
- VCR - Vinho Com Radiação.
- VSR - Vinho Sem Radiação.

RESUMO

FRANÇA, Norival. Ação da radiação ultravioleta na redução da microbiota do caldo de cana para produção de cachaça. Orientador Dr. João Evangelista Fiorini. Alfenas - MG, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, área de concentração microbiologia vegetal e animal).

O processo fermentativo para produção de cachaça é influenciado pela qualidade da matéria prima. Desta forma uma matéria prima que contenha alta carga microbiana resulta em uma fermentação ineficiente, cujo resultado é refletido na qualidade final da cachaça. Neste contexto, objetivou-se, nesta investigação, avaliar a ação da radiação ultravioleta como desinfetante alternativo na desinfecção do caldo de cana para produção de cachaça. O experimento foi instalado na unidade de produção de cachaça TUCANINHA na cidade de São João Batista do Glória-MG. Confeccionou-se uma câmara de tratamento em chapas de alumínio com dimensões de 10,0m x 43cm x 13cm com cinco tampos de dimensões 2,0m x 43cm x 14cm, onde foram instaladas lâmpadas germicidas por radiação ultravioleta. A câmara foi instalada na saída da moenda para passagem do caldo de cana sob a ação da radiação ultravioleta em um sistema de fluxo contínuo. A eficiência do tratamento foi avaliada através de análises microbiológicas do caldo de cana em cinco tempos de tratamento. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e três repetições, apresentando um P valor de 64,63 %. Analisaram os vinhos fermentados com caldo tratado com a radiação ultravioleta e o caldo não tratado, considerando dois tratamentos e 10 repetições. As análises de acidez, porcentagem de álcool e o pH, apresentaram P valor maior que 0,05%. As cachaças produzidas com caldo de cana irradiado e não irradiado apresentaram valores que estão de acordo com a legislação vigente. Concluiu-se que as características físicas e químicas do caldo de cana influenciaram na ação da radiação sobre os microrganismos presentes no caldo de cana, eliminando uma pequena parte dos microrganismos, não sendo suficiente para considerar a radiação ultravioleta eficiente na eliminação de microrganismos presente no caldo de cana.

Palavras chave. contaminação bacteriana; microbiologia; desinfecção.

ABSTRACT

FRANÇA, Norival. Action of ultraviolet radiation on the reduction of microbiota from cachaça-producing sugarcane. Adviser: Prof. Dr. João Evangelista Fiorini. Alfenas, MG, 2010. Dissertation (Master's degree in Animal Science; area of concentration: Plant and Animal Microbiology).

The fermentation process for the production of *cachaça* (the most popular alcoholic distilled beverage) in Brazil is influenced by the quality of the raw material. Thus any raw material containing a high microbial load results in an ineffective fermentation, which is reflected on the final quality of the cachaça. This study evaluated the action of ultraviolet radiation as an alternative disinfectant for cachaça-producing sugarcane juice. The experiment was carried out at the TUCANINHA cachaça-producing unit in the city of São João Batista do Glória, MG. A 10.0m × 43cm × 13cm aluminum plate treatment chamber was made with five 2.0 × 43cm × 14cm heads for germicidal UV lamps. The chamber was installed at the outlet of the mill for the passage of the UV-treated sugarcane juice in a continuous flow system. The effectiveness of the treatment was assayed by microbiological analyses of the cane juice at five treatment times. The statistical design was completely randomized, with five treatments and three replications, with a P value of 64.63%. Two types of fermented wines were analyzed: those from UV radiation-treated broth and the ones from untreated broth, consideration two treatments and 10 repetitions. The tests for acidity, alcohol percentage, and pH showed a P value higher than 0.05%. The cachaças produced with irradiated and non-irradiated sugarcane juice showed values in accordance with the current legislation. It was concluded that the physical and chemical characteristics of the sugarcane juice influenced the action of the radiation on the cane juice microorganisms. Only a small amount of microorganisms were eliminated, what demonstrates that ultraviolet radiation is not effective to eliminate the microbiota of sugarcane juice.

Keywords: bacterial contamination; microbiology; disinfection.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	CONCEITO DE BEBIDA ALCOÓLICA	15
2.2	CENÁRIO DA CACHAÇA NO BRASIL	16
2.3	PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CACHAÇA	16
2.3.1	Fermentação Alcoólica	20
2.3.2	Processo de Destilação	22
2.4	DESINFECÇÃO DO CALDO DE CANA	23
2.4.1	Radiação Ultravioleta (UV)	24
2.4.2	Lâmpadas de Vapor de Mercúrio	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	LOCAL DE CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO	27
3.2	PREPARAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA	27
3.3	CÂMARA DE DESINFECÇÃO	28
3.4	DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS, PH E BRUX	29
3.5	AMOSTRAS PARA ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	30
3.6	FERMENTAÇÃO	32
3.7	AMOSTRAS DO PRODUTO FINAL PARA ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS	33
3.8	DESTILAÇÃO DO VINHO FERMENTADO	33
3.9	MÉTODOS ESTATÍSTICOS EMPREGADOS	34
3.9.1	Caldo de Cana-de-açúcar	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1	ANÁLISES DO CALDO DE CANA A SER SUBMETIDO À RADIAÇÃO UV	36
4.2	ANÁLISES DO VINHO VSR E VCR	38
4.3	ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS DA CACHAÇA	39

5	CONCLUSÕES	42
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

A cachaça é uma bebida genuinamente brasileira produzida praticamente em todo o Brasil. A produção de cachaça desempenha uma grande função econômica no país, contribuindo muito na agricultura familiar onde os pequenos e médios produtores fazem de sua produção uma complementação para a renda familiar. A cachaça produzida no Brasil apresenta diferenças na sua qualidade devido à regionalização do produto, ou seja, cada produtor utiliza variedades diferentes de cana-de-açúcar em épocas de colheitas distintas, e outras artimanhas, como a utilização de ingredientes na fermentação.

Os procedimentos empregados no processamento da bebida, como os cuidados na higienização, adequação aos métodos utilizados para produção e o cumprimento da legislação vigente, são medidas que agregam valores, contribuindo para que o produto final tenha a qualidade necessária para competir com outros produtos no mercado interno e externo. A qualidade do produto inicia-se com os cuidados com o solo, que deve ser analisado periodicamente e, se necessário, fazer as correções exigidas pela cultura da cana-de-açúcar, permeando todas as fases do processo de fabricação, envelhecimento, até a comercialização do produto final.

A produção de cachaça consiste basicamente em extrair o caldo da cana através da prensagem em moendas. Em seguida, o caldo passa por um processo fermentativo através da ação das leveduras, transformando-se em vinho, que é destilado em alambiques de cobre, aço inox ou em colunas de destilação. A qualidade da matéria prima para a produção de cachaça influencia diretamente na qualidade do produto final. Dessa forma, um caldo de cana, quando submetido ao processo de fermentação com baixa contaminação bacteriana, possibilita uma melhor ação por parte das leveduras em transformar o açúcar em álcool, resultando em um maior rendimento por tonelada de cana e em uma cachaça de melhor qualidade. Por outro lado, quando um caldo de cana apresenta alto índice de contaminação, há uma redução na ação das leveduras no processo fermentativo, produzindo subprodutos indesejáveis na cachaça, comprometendo a sua qualidade.

Os tratamentos do caldo de cana destinados à produção de álcool etílico e aguardente industrializada vêm sendo amplamente utilizados para eliminar bactérias presentes na cana, que se desenvolvem durante o processo de moagem ou em locais denominados pontos mortos na moenda, peneiras de filtração e outras partes do processo. No processo de produção de cachaça, geralmente o caldo de cana não recebe nenhum tratamento para

eliminação de bactérias, sendo utilizado diretamente após o seu processo de extração. Os tratamentos utilizados podem ser pela adição de bactericidas diretamente ao caldo; pasteurização ou adição de polímeros floculantes para remoção de impurezas.

A radiação ultravioleta (UV), como desinfetante alternativo, vem sendo utilizada desde o século vinte na desinfecção de água, esgotos domésticos, em hospitais, nas salas cirúrgicas e laboratórios e, por esta razão, os estudos das aplicações da radiação ultravioleta vêm ganhando popularidade, principalmente nos países Europeus. A radiação UV atinge principalmente os ácidos nucléicos dos microrganismos, promovendo reações fotoquímicas que desestruturam as ligações dos aminoácidos, tornando as bactérias inativas. Ela pode ser obtida por meio de lâmpadas especiais do tipo tubulares fluorescentes, que utilizam a eletricidade como fonte de energia.

O sistema para desinfecção do caldo de cana para produção de cachaça pelos raios UV consiste na passagem direta do caldo por uma câmara de desinfecção em um sistema fechado com lâmpadas especiais que emitem a radiação com comprimento de onda de 253 nm com capacidade germicida, tornando este sistema barato e viável devido ao seu baixo custo de instalação e manutenção.

Alcarde, Walder & Horii (2003) demonstraram a eficiência da redução microbiológica contaminante do mosto de cana-de-açúcar por radiação gama. Porém não há muitos estudos que comprovem a eficiência da radiação ultravioleta na redução de microrganismos presentes em caldo de cana.

O objetivo deste trabalho foi Investigar a ação germicida da radiação ultravioleta (UV) em cinco tempos de tratamentos, como desinfetante alternativo na desinfecção do caldo de cana, submetê-lo ao processo fermentativo, para produção de cachaça de melhor qualidade. Avaliar a fermentação alimentada com caldo de cana radiado com UV e não radiado por meios de análises físicas e químicas e comparar a qualidade da cachaça produzida com caldo radiado com UV e não radiado, em face dos parâmetros vigentes na legislação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CONCEITO DE BEBIDA ALCOÓLICA

Aquarone (2001) enfatiza que as bebidas alcoólicas originaram-se na antiguidade, sendo tão antigas quanto a humanidade. Hebreus, chineses, fenícios, assírios, babilônios, gregos, germanos e romanos fizeram menção sobre as bebidas, e cada povo passou a produzir suas próprias bebidas, utilizando fontes naturais de açúcares e amiláceas, como as frutas, cana-de-açúcar, milho, trigo, arroz, batata, centeio, aveia, cevada e até mesmo raízes e folhas.

O conceito de bebida alcoólica, de acordo com a legislação brasileira, é todo produto industrializado, destinado à ingestão humana, em estado líquido, sem finalidade terapêutica ou medicamentosa, cuja graduação se apresenta entre 0,5% e 54% em volume, a 20°C. A legislação considera como bebidas não alcoólicas aquelas com graduação até 0,5% em volume a 20°C (BRASIL, 2009).

As bebidas alcoólicas geralmente são classificadas em dois grandes grupos, bebidas fermentadas e bebidas destiladas. Em ambos os casos a produção ocorre através do processo fermentativo, porém no último caso o produto resultante da fermentação passa pelo processo de destilação (LIMA, BASSO & AMORIM, 2001).

As bebidas fermentadas, após passarem pelo processo de fermentação, recebem um tratamento de clarificação e acabamento. Entre essas bebidas podem ser citadas o vinho (obtido da uva), a sidra (obtido de maçãs, peras ou de suas misturas), os vinhos de outras frutas, os fermentados obtidos de grãos e de outras partes de vegetais, de seivas e fermentados de mel. As bebidas destiladas também passam pelo processo de fermentação e posteriormente passam pelo processo de destilação, podendo citar vinhos de frutas, de fermentação de grãos, tubérculos, raízes, de seiva de grave, de mel de diversas substâncias açucaradas, como caldo de cana e subprodutos da indústria de açúcar, o resultando são as bebidas como a cachaça, o rum, a tequila, o pisco, o kirsh, o conhaque, o uísque e outras bebidas (LIMA, BASSO & AMORIM, 2001).

2.2 CENÁRIO DA CACHAÇA NO BRASIL

Cardoso (2001) destaca que a produção oficial de cachaça no Brasil é de aproximadamente 1,5 bilhões de litros por ano. Esta atividade é considerada uma fonte substancial de recursos que gera aos cofres públicos IPI, ICM e outros impostos. Minas Gerais destaca-se entre os estados produtores de cachaça com uma produção anual de 120 milhões de litros de aguardente artesanal e um consumo interno de 170 milhões de litros. O setor gera, só no estado de Minas Gerais, cerca de 120 mil empregos diretos e três vezes mais de forma indireta. A atividade é de extrema importância econômica, porém estima-se que aproximadamente 90% da produção artesanal no estado de Minas Gerais ainda seja produzida em alambiques clandestinos.

Dados fornecidos pelo Instituto Brasileiro da Cachaça (IBRAC, 2009) revelam que menos de 1% da cachaça produzida anualmente é exportada. Atualmente estão envolvidas aproximadamente 180 empresas no comércio internacional da bebida, exportando para mais de 55 mercados. Em 2008 foram exportados 11,09 milhões de litros, gerando uma receita de US\$ 16,41 milhões, o que representou um crescimento de 18% em valor e 20% em volume em relação a 2007. Dentre os países importadores da bebida destacam-se a Alemanha, Estados Unidos e França, entre outros.

Segundo Aguiar (2004), a cachaça é a segunda bebida alcoólica mais consumida no país, sendo a cerveja a bebida de preferência nacional. De acordo com Bizelli *et al.* (2000), esta afirmação é diferente da cultura de outros povos, que criaram, aprimoraram e projetaram seus destilados. No Brasil a aguardente é considerada bebida de segunda categoria, porém, vem ocorrendo melhoria da qualidade, adequação e inovação dos processos, fazendo com que surjam novos mercados e novos consumidores. A Revista Cana Brasil (2009) destaca que, do total de cachaça produzido anualmente, apenas 7% se referem à bebida mais refinada, consumida por um público das classes A e B.

2.3 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CACHAÇA

Cachaça é o nome dado à aguardente de cana, bebida típica e exclusiva produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38% a 48% em volume a 20°C, obtida pela

fermentação do caldo de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares. (BRASIL, 2009).

De acordo com o SEBRAE (2001), a cachaça de alambique é obtida através da fermentação e destilação do mosto do caldo de cana-de-açúcar. A composição da cachaça é regulamentada pela Legislação Nacional sob a fiscalização do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. A Legislação estabelece os padrões de identidade e qualidade da bebida. Os padrões são regulamentados através da Instrução Normativa nº 13. Os padrões estabelecidos têm a finalidade de moderar a influência de cada componente nas características sensoriais da bebida (BRASIL, 2005).

Na composição da cachaça, o coeficiente de congêneres é definido pelas somas dos aldeídos, ácidos, ésteres, furfural e alcoóis; esta soma não pode ser inferior a 200 *mg/100 mL* e não superiores a 650 *mg/100 mL* de álcool anidro. A Instrução Normativa nº 13 estabelece os seguintes valores máximos permitidos para cada congêneres:

- Acidez volátil em ácido acético (*mg/100 mL* de álcool anidro) = 150
- Ésteres em acetato de etila (*mg/100 mL* de álcool anidro) = 200
- Aldeídos em aldeído acético (*mg/100 mL* de álcool anidro) = 30
- Furfural (*mg/100 mL* de álcool anidro) = 5
- Álcool superior (*mg/100 mL* de álcool anidro) = 360

A produção de cachaça consiste basicamente na extração do caldo de cana-de-açúcar, fermentação e destilação do vinho fermentado. A Figura 1 mostra as etapas do processo de produção de cachaça.

Fluxograma de produção de cachaça

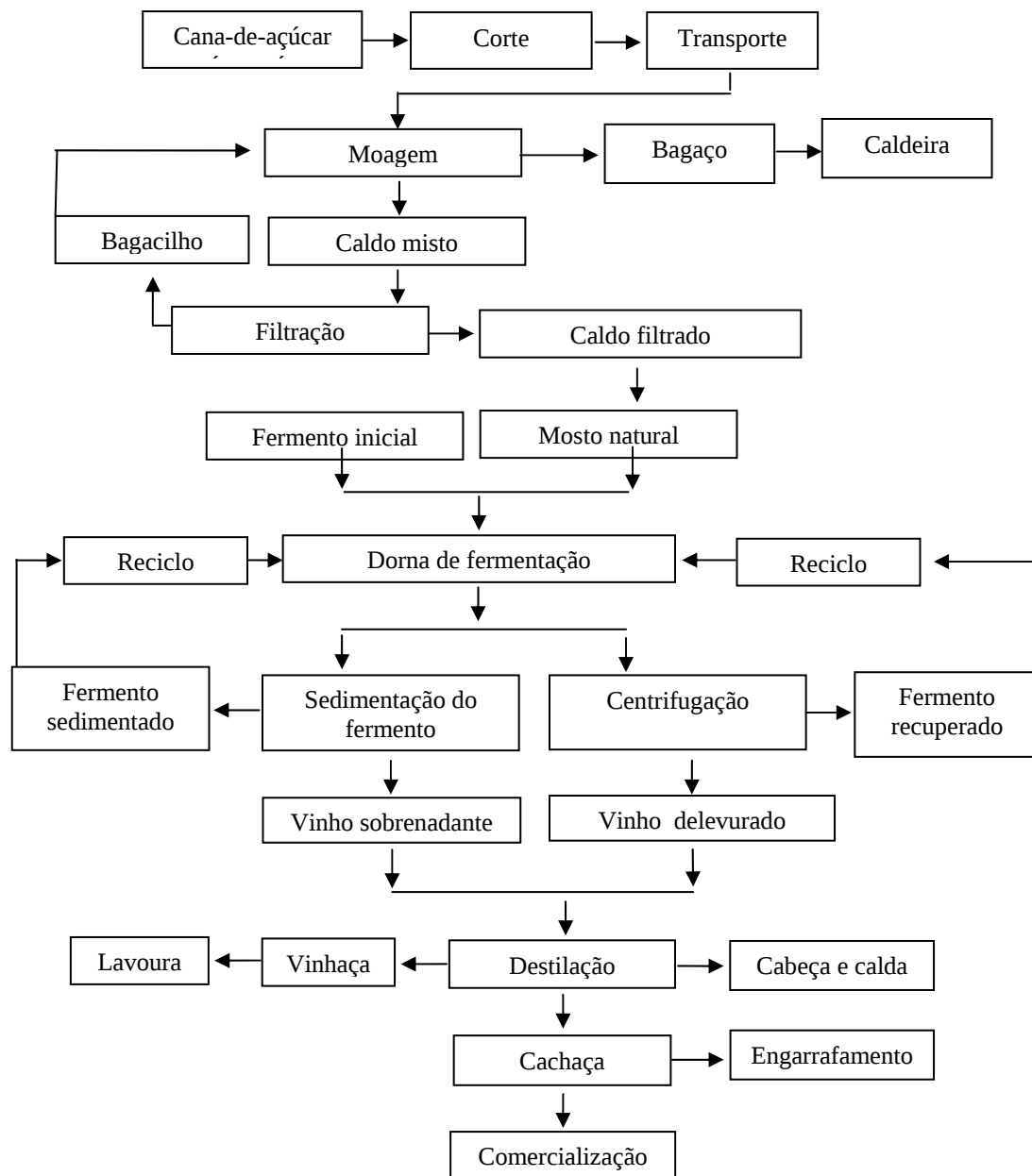


FIGURA 1- Fluxograma de produção da cachaça.

De acordo com Lima, Basso & Amorim, (2001), a cana-de-açúcar é uma planta cultivada em quase todo o país e utilizada como matéria prima para a fabricação de aguardente. Outros ingredientes empregados como o fubá, o farelo de arroz ou a farinha de soja (esta última pouco usada em Minas Gerais) são incorporados ao caldo de cana como suplementos nutricionais para o fermento, podendo ser classificados como aditivos ou coadjuvantes.

A cana-de-açúcar é definida por Andrade (2001) como sendo uma planta pertencente à classe Monocotiledônea, família Poaceae (Gramínea), gênero *Sacchararum* com várias espécies. O nome atual da espécie está relacionado ao fato de que todas as variedades cultivadas em todo o mundo tenham sido originado a partir de cruzamentos entre diferentes espécies, tornando-as híbridas, as quais atualmente são utilizadas para produção de açúcar, álcool, aguardente ou forragem (atualmente conhecidas e catalogadas, são trinta as espécies existentes). As principais espécies conhecidas têm sua origem na Oceania (Nova Guiné) e Ásia (Índia e China) (BEZERRA, 1995).

A escolha da variedade da cana é de fundamental importância para o sucesso da atividade. A recomendação de variedades para atender a produção de cachaça são aquelas que reúnem características agronômicas e industriais mais adequadas à produção de açúcar e álcool. Em Minas Gerais, a escolha das variedades produtoras é feita levando em consideração o período médio de maturação das variedades, condições climáticas e de solo (SILVEIRA, BARBOSA & OLIVEIRA, 2002).

Os principais fatores que influenciam na qualidade e na produtividade da cana-de-açúcar são: local de plantio, ambiente, pragas, doenças, variedade e planejamento agrícola. O planejamento está relacionado com o manejo da cultura, como os aspectos de maturação da cana-de-açúcar, colheita e transporte (CTP, 1998).

O caldo de cana é um líquido de cor que varia do pardo ao verde escuro, possui aparência opaca, viscoso e espumoso, de reação ácida e de paladar doce. O caldo possui uma microbiota natural com predominância de leveduras e bactérias. Entre as leveduras são encontrados os gêneros *Candida*, *Criptococcus*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* e *Torulopsis*. Entre as bactérias as mais frequentes são o *Leuconostoc dextranum* e o *Leuconostoc mesenteroides*, com ocorrência da presença de *Streptococcus* (LIMA, BASSO & AMORIM, 2001),

O processo de produção de aguardente, segundo Faria (2000), é um processo rústico, capaz de ocorrer mesmo em condições tecnicamente adversas. A esterilização prévia do caldo de cana não é realizada, possibilitando dessa forma a contaminação capaz de prejudicar o rendimento e a qualidade do produto.

Segundo Yokoya (1991), a contaminação por microrganismos no processo de fermentação é devido à sua ocorrência no solo, na matéria orgânica em decomposição, e pode estar associada às pragas e doenças da cultura. Esta afirmação está de acordo com Graciano (2007), ao relatar que os microrganismos presentes nos sistemas de fermentação alcoólica têm o solo ou as plantas como origem. O caldo de cana é considerado um excelente substrato para

o crescimento de microrganismos, por conter nutrientes orgânicos e inorgânicos, pH e temperatura ideal. As condições de colheita da cana-de-açúcar, extração do caldo e fermentação do mosto, quando apresentam condições assépticas, permitem o desenvolvimento de outros microrganismos, principalmente bactérias. De um modo geral, dentre os microrganismos que prejudicam a fermentação alcoólica, destacam-se os pertencentes aos gêneros *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e outros.

De acordo com Amorim *et al.* (2005), a produção de álcool a partir da cana-de-açúcar vem enfrentando sérios problemas relacionados à contaminação, devido à grande quantidade de microrganismos que fazem parte da microbiota epífita, ou podem estar presentes no solo aderidos aos colmos raízes e folhas. O problema é ainda maior se a cana estiver suja, molhada, velha, deteriorada, com raízes perfuradas por insetos que facilitam a entrada dos microrganismos.

Os agentes mais prejudiciais são as bactérias lácticas e as esporuladas que participam de forma ativa na deterioração da cana-de-açúcar colhida, reduzindo o tempo de armazenamento e introduzindo certos produtos do metabolismo, indesejáveis no processo. Sendo assim, existe a necessidade de fazer a desinfecção do caldo de cana que é adicionado ao pé de cuba para alimentação das leveduras, obtendo um substrato que contenha o mínimo possível de microrganismos que possam interferir de forma negativa no processo de produção de cachaça (AMORIM, *et al.* 2005).

2.3.1 Fermentação Alcoólica

Cardoso (2006) considera que, dentre todas as etapas do processo de produção de cachaça, a fermentação é uma das etapas mais importantes, pois onde ocorre a formação do álcool etílico, predominante na cachaça, formando diversos outros compostos, denominados compostos secundários, como o aldeído, metanol, alcoóis superiores, ácidos e ésteres. A contaminação bacteriana em fermentações industriais, quando estão acima de $5,0 \times 10^6$ UFC/mL, é prejudicial à fermentação, e níveis de contaminação entre $1,0 \times 10^7$ - $1,0 \times 10^8$ UFC/mL ocasionam prejuízos econômicos significativos, diminuindo o rendimento fermentativo.

Cantão (2006) ressalta que o processo fermentativo consiste basicamente na transformação do açúcar (sacarose) em etanol. O processo fermentativo inicia-se pela adição do caldo de cana ao inóculo (pé de cuba na dorna) de fermentação, sendo o volume útil da dorna completada com o caldo de cana diluído para 16 brix. O teor ideal de açúcar no caldo de cana para a fermentação deve estar entre 14 e 16 brix; e teores maiores que 16 brix podem acarretar fermentações mais lentas e frequentemente incompletas. A fermentação deve ser acompanhada com análises de medições do teor de brix, da temperatura do fermento, da acidez e do pH.

O inóculo (pé de cuba) é uma suspensão concentrada, contendo células de leveduras, que será utilizado para dar início a um novo ciclo fermentativo. O pé de cuba deve conter células de leveduras suspensas em um volume correspondente de 10 a 20% do volume útil da dorna preenchida com o caldo fermentado, de forma a prover cerca de 10 a 20 gramas de massa de leveduras por litro, do meio a ser fermentado (FARIA, 2000).

O processo fermentativo do mosto, em condições normais, dura em média 24 horas. A fermentação pode ser conduzida em três formas diferentes: batelada simples (sistema descontínuo), batelada alimentada (sistema semicontínuo) e contínua. Esses sistemas são escolhidos de acordo com o tipo de indústria. No processo de produção de cachaça, os produtores adotam o sistema de batelada simples, sendo que neste sistema o inóculo é colocado juntamente com todo o meio a ser fermentado na dorna. Após 24 horas, o vinho é destilado e o inóculo (pé de cuba) que permanece na dorna é reaproveitado para iniciar um novo ciclo fermentativo (PATARO *et al.* 2002).

Conforme Aquarone (2001), o álcool pode ser obtido através da fermentação e de métodos sintéticos. As bebidas alcoólicas só podem ser obtidas através da fermentação. Durante o processo fermentativo, outros produtos se formam pelas associações de diversas quantidades de várias substâncias que dão aroma e sabor a essas bebidas. A levedura da fermentação alcoólica é a *Saccharomyces cerevisiae*, da qual foram selecionadas várias linhagens, tidas por muito tempo como espécies *Saccharomyces ellipsoideus*, *S. carlsbergensis* e *S. uvarum*. As bactérias e leveduras são microrganismos de maior destaque como agentes potencialmente capazes de contaminar um meio propício ao seu desenvolvimento. O processo fermentativo ocorre espontaneamente devido à contaminação de microrganismos no substrato.

De acordo com Cardoso *et al.* (1999), durante o processo fermentativo ocorre a formação de vários ácidos que são produtos secundários da fermentação alcoólica. O ácido acético (expresso em acidez volátil) tem sido o principal componente da fração ácida das

aguardentes. A acidez presente em aguardente pode ser proveniente da contaminação bacteriana da cana, que contamina as instalações no processo ou do próprio mosto fermentado por bactérias acéticas e outras. No processo fermentativo parte do substrato pode sofrer fermentação acética elevando a acidez e assim prejudicar o rendimento fermentativo, diminuindo a produção de etanol. A acidez apresenta compostos solúveis em água e com elevado ponto de ebulição que estão presentes nas primeiras frações do destilado, na metade final do coração e na totalidade da fração da calda.

Experiências em escala semi-industrial foram efetuadas para verificar o efeito de antibióticos sobre a qualidade da aguardente. Utilizando-se 1000 UI de penicilina por litro de mosto, obteve-se uma redução considerável nos níveis de acidez fixa e volátil e o tempo de fermentação foi um terço menor que o normal necessário gasto na indústria (AQUARONE & BARRUFALDI, 1966).

2.3.2 Processo de Destilação

O processo de destilação é fundamental na determinação da qualidade da bebida, pois nesta etapa ocorrem algumas reações que são induzidas pelo calor e, dessa forma os componentes do vinho podem ser aumentados, diminuídos e ainda originar novos componentes.

Segundo Lima (1993), no final do processo fermentativo, após ter se esgotado todo o açúcar, e de ter separado a fração sólida da fração líquida, a parte líquida passa a ser denominada de vinho. Esta fração é composta de álcool etílico e água em maiores proporções e de muitos outros compostos denominados compostos secundários ou fração não alcoólica, sendo estes os principais responsáveis pelo sabor e aroma da bebida. Entre os principais componentes secundários podem ser citados: aldeídos, ácido acético e ésteres desses ácidos, furfural e alcoóis superiores como o amílico, isoamílico, butílico, isobutílico, propílico e isopropílico.

Os componentes do vinho podem ser separados através do processo de destilação simples ou descontínua e por destilação contínua. A destilação descontínua é a mais utilizada pelas destilarias de pequeno porte e consiste no aquecimento do vinho em alambiques confeccionado em cobre, aço inox ou em alambiques mistos confeccionados em cobre e aço inox. A destilação ocorre graças à diferença de graus de volatilidade entre os componentes.

Os componentes mais voláteis são recolhidos na primeira fração do destilado, constituindo a “cabeça”, e a fração dos componentes menos voláteis que sai no final do processo de destilação é denominada porção da “cauda”. A porção intermediária denominada de “coração” é constituída principalmente de frações imediatamente voláteis (YOKOYA, 1995).

De acordo com Faria (2000), a destilação contínua é utilizada no processo industrial, que consiste no aquecimento do vinho em colunas de destilação. O vapor entra pela parte inferior da coluna e o vinho é adicionado pela parte superior, que, por gravidade, desce no sentido da base indo de contracorrente ao vapor, ocorrendo a evaporação dos componentes. Os compostos arrastados pelo vapor são condensados, obtendo-se o destilado na saída dos condensadores e o resíduo da destilação na parte inferior da coluna, em um processo contínuo.

2.4 DESINFECÇÃO DO CALDO DE CANA

O caldo obtido pela prensagem da cana-de-açúcar em moendas possui em sua constituição cerca de 78 a 86% de água, 10 a 20% de sacarose, 0,1 a 25,0% de açúcar redutores, 0,3 a 0,5% de cinzas e entre 0,5 e 1,0% de compostos nitrogenados (LIMA, BASSO & AMORIM, 2001).

De acordo com Marques, Marques & Junior (2001), no processo de purificação e clarificação do caldo de cana obtém-se como resultado um caldo claro brilhante que ocorre devido à eliminação de material em suspensão e outras impurezas presentes. A purificação ocorre sem afetar a sacarose presente. Quando se faz a clarificação do caldo de cana por aquecimento, há uma redução de microrganismos e, se a fermentação industrial não for conduzida em condições de completa assepsia, a contaminação bacteriana estará sempre presente, sendo esta a principal responsável pelos problemas da fermentação alcoólica.

2.4.1 Radiação Ultravioleta (UV)

A radiação UV é emitida em grandes quantidades ao planeta terra através dos raios solares. Os raios ultravioletas pertencem aos espectros eletromagnéticos que possuem comprimentos de ondas na faixa de 40 a 400nm, entre os raios X e a luz visível (Figura 2).

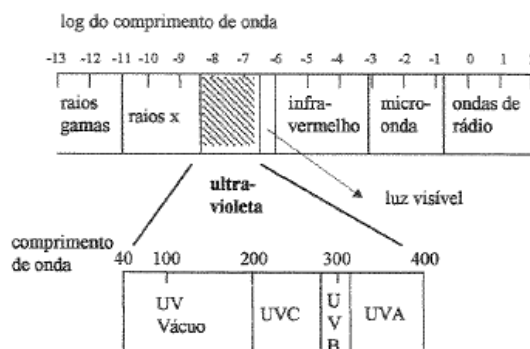


FIGURA 2- Espectro eletromagnético.

Fonte: (WOLFE, 1990; DI BERNARDO 1993).

Segundo Sobotka (1993), a radiação ultravioleta em geral recebe a seguinte divisão:

- Vácuo (40 a 200nm);
- UV – C (200 a 280nm);
- UV – B (280 a 315nm);
- UV - A (315 a 400nm).

A radiação UV tem atuação por meio físico, promovendo reações fotoquímicas que atuam principalmente nos ácidos nucleicos dos microrganismos, tornando-os inativos. A radiação ultravioleta vem sendo bastante estudada e utilizada como alternativa em substituição aos produtos químicos tradicionais utilizados em desinfecção de águas de abastecimentos e de águas residuais. A ação germicida dos raios UV foi reportada pela primeira vez em 1878 por Downs & Blun (KOLLER, 1952). A radiação UV, quando incidida em microrganismos patogênicos, exerce um alto poder de inativação destes microrganismos em um curto espaço de tempo e não produz resíduos tóxicos que afetam o meio aquático.

De acordo com Urenha, Pradella & Rodrigues (2001), a radiação UV é absorvida por muitas substâncias celulares, mas esta absorção é ainda maior pelos ácidos nucleicos, lesionando-os. A lesão é proporcional à dose da radiação aplicada. A região do espectro dos raios UV que possui a ação germicida está situada entre 200 e 300 nm, existindo uma relação entre os comprimentos de onda germicida e aqueles absorvidos pelos ácidos nucleicos ou seus

constituintes. A faixa de absorção do comprimento de onda das purinas e pirimidinas situa-se na região de 260 nm, estando bem próxima da radiação mais efetiva, que é de 253,7 nm.

Segundo Lewin (2001), o DNA é definido como sendo um composto orgânico constituído por uma hélice dupla que consiste de fitas antiparalelas. Estas fitas são compostas por unidades de nucleotídeos que estão unidos por ligações fosfodiester no sentido 5' – 3'; as bases purínicas e pirimidínicas estão empilhadas no interior das fitas em pares nas quais a adenina se liga à timina e a guanina se liga à citosina. O dano no DNA consiste em qualquer modificação capaz de introduzir um desvio da estrutura normal da hélice dupla. A radiação UV causa uma distorção estrutural no DNA, fazendo com que ocorram ligações covalentes entre duas bases adjacentes de timina, resultando no dímero de pirimidina intrafita, e o agrupamento danificado permanece no DNA, continuando a dar problemas estruturais. Estas ligações podem causar erros de leituras do código genético e consequentemente ocorrerão mutações que prejudicarão as funções vitais do organismo, levando à morte celular.

A dose da radiação UV é obtida através da intensidade da radiação em função do tempo de exposição, que é medido em W/cm^2 , como mostra as equações 1 e 2 (QUALLS & JOHNSON, 1983):

$$D = I \times t \quad (1)$$

Onde:

D a dose de radiação UV ($\text{W.s}/\text{cm}^2$); I a intensidade de radiação bactericida (Ws/cm^2) e t o tempo de exposição, em segundos.

A fração de sobrevivência é a relação entre a concentração de microrganismos antes e depois da inativação, e ocorre em função da dose:

$$\frac{N}{N_0} = f(\text{dose}) \quad (2)$$

N : Concentração de microrganismos após tratamento (UFC/mL).

N_0 : Concentração inicial de microrganismos (UFC/mL).

$F(\text{dose})$: função da dose.

De acordo com as equações 1 e 2, a intensidade e o tempo de exposição podem ser variadas reciprocamente, resultando na mesma fração de sobrevivência (QUALLS & JOHNSON, 1983).

2.4.2 Lâmpadas de Vapor de Mercúrio

Segundo Bolton (1999), o comprimento de onda de maior efeito bactericida situa-se na faixa do UV-C e é de 254 nm, sendo este relativo à emissão máxima de lâmpadas de baixa pressão de vapor de mercúrio. A radiação UV utilizada como agente germicida usualmente é obtido através de lâmpadas especiais de baixa e média pressão de vapor de mercúrio ionizado (lâmpadas fluorescentes tipo tubular). Estas lâmpadas são instaladas juntamente com reatores fotoquímicos, construídos de material refletor para aumentar sua eficiência e alimentados com energia elétrica para geração de radiação UV, tornando este método economicamente viável.

Segundo Wolfe (1990), as lâmpadas bactericidas de baixa pressão são construídas com tubos de descargas feitos em vidro especial. A radiação UV emitida pelas lâmpadas é o resultado da descarga nos vapores de mercúrio em baixa pressão (aproximadamente 0,001 atm). A potência das lâmpadas está entre 15 e 60 W. Estas lâmpadas têm sua eficiência em 70% na emissão dos raios ultravioleta. Noventa e cinco por cento do total de emissão estão no comprimento de ondas de 254 nm. O tempo de vida útil das lâmpadas de baixa pressão é de 500 a 1000 horas. Porém, ao longo do tempo ocorre a redução da potência da lâmpada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi conduzido nas instalações do alambique da TUCANINHA – indústria e comércio de cachaça Ltda, situada na fazenda Lava-Pés, na cidade de São João Batista do Glória, na região Sudoeste do Estado de Minas Gerais.

3.2 PREPARAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

Após o corte da cana, as palhas foram retiradas manualmente. Em seguida, a cana foi triturada em máquinas de ensilagem, colocada em carretas e transportada para o alambique, sendo descarregada no galpão próximo à esteira de alimentação da moenda.

A alimentação da moenda (Figura 3) foi realizada manualmente, utilizando-se uma pá para transportar a cana do piso até a esteira de alimentação, de forma que a esteira foi mantida sempre cheia.



FIGURA 3 – Ilustração da moagem da cana-de-açúcar.

A moenda é composta por dois ternos com quatro rolos cada, com capacidade para moagem de 1500L/h de caldo de cana. No primeiro terno foi extraída a maior porcentagem de caldo da cana e, no segundo terno, ocorreu a embebição com água para

aumentar a extração. As misturas dos caldos extraídos no primeiro e no segundo ternos formaram o caldo misto. O caldo misto foi enviado para a peneira do *cusch-cusch* onde ocorreu a separação dos bagacilhos e do caldo. Os bagacilhos voltaram para o primeiro terno e o caldo foi enviado para uma bandeja de decantação, onde ocorreu a sedimentação de impurezas provenientes do corte da cana.

3.3 CÂMARA DE DESINFECÇÃO

Foi construída uma câmara de desinfecção constituída da parte inferior e superior de folhas de zinco, dotada de entrada e saída para passagem do caldo de cana em um sistema de fluxo contínuo. Para a parte superior, foram construídos cinco tampos com maior largura, de forma que, ao serem colocados sobre a parte inferior da câmara de desinfecção, formaram um sistema fechado evitando a penetração da luz externa. Os objetivos dos tampos foram os de melhorar a eficiência do processo, proteger os funcionários contra a incidência direta da radiação UV e para evitar que caíssem sujidades no caldo da cana. As dimensões da câmara de desinfecção e dos tampos foram, respectivamente, 10,0 metros de comprimento por 43 centímetros de largura e altura de 13 centímetros; 2,0 metros de comprimento de cada tampo por 43 centímetros de largura e 14 centímetros de altura.

Foram instaladas 10 lâmpadas de radiação UV com capacidade germicida na parte interna dos tampos de forma que cada tampo de 2,0 metros recebeu duas lâmpadas de 90 centímetros de comprimento com capacidade de 30 Watts. As mesmas foram ligadas a reatores e *starters* individuais apropriadas, como está ilustrado na Figura 4. O sistema foi ligado a um disjuntor para ligar o sistema somente quando estivesse ocorrendo a moagem da cana-de-açúcar com o intuito de controlar o processamento do caldo de cana submetido ou não ao tratamento com radiação UV e prolongar a vida útil das lâmpadas.

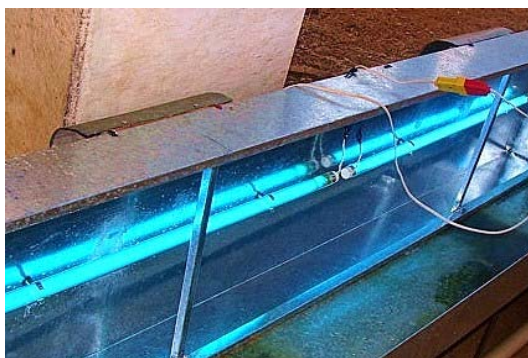


FIGURA 4-Ilustração das lâmpadas de radiação ultravioleta instaladas nos tampos.

A câmara de desinfecção para a passagem do caldo de cana foi instalada e nivelada na saída da caixa de sedimentação de impurezas, ocorrendo a ligação por meio de um cano móvel de PVC de 40 mm de diâmetro por 1,5 m de comprimento (Figura 5). O caldo de cana, após passar pela câmara de desinfecção, foi enviado para uma peneira rotativa para retirada de bagacilhos menores que passaram pelas peneiras anteriores.



FIGURA 5 – Ilustração da câmara de desinfecção para tratamento do caldo de cana.

3.4 DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS, PH E BRUX

Os parâmetros avaliados de porcentagem de impurezas, pH e brix foram obtidos nas amostras do caldo de cana antes de entrar na câmara de desinfecção. As amostras foram obtidas em três coletas, sendo coletadas em frascos de 1000 mL com tampa de vedação. As

análises foram feitas no Laboratório de Análises Ambientais e Produtos Alimentícios da Fundação de Ensino Superior de Passos (FESP/UEMG).

As impurezas foram determinadas através da centrifugação da amostra em uma centrífuga de bancada modelo BABY FANEN[®] com a utilização de tubos graduados de 15 mL. Para avaliar o pH do caldo foi utilizado um pHmetro digital, eletrônico marca pHtec[®], modelo PHS – 3B, pré-calibrado, sendo as amostras submetidas a leituras diretas no aparelho. Determinou-se o brix através da utilização de um refratômetro de campo marca Instrutherm[®], modelo RT-30 ATC, com leitura direta no aparelho.

3.5 AMOSTRAS PARA ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As amostras foram obtidas em três coletas para análises microbiológicas, sendo coletadas em tubos de ensaio com tampas do tipo “roscas”, anteriormente esterilizados, devidamente identificados. As amostras do caldo de cana foram coletadas da seguinte forma:

Amostra 01: entrada na câmara de desinfecção, antes de ser submetido à radiação UV com 0 segundo;

Amostra 02: submissão do caldo de cana à radiação UV a uma distância de quatro metros de entrada da câmara de desinfecção com 53 segundos;

Amostra 03: submissão do caldo de cana à radiação UV a uma distância de seis metros de entrada da câmara de desinfecção com 79 segundos;

Amostra 04: submissão do caldo de cana à radiação UV a uma distância de oito metros de entrada da câmara de desinfecção com 106 segundos;

Amostra 05: submissão do caldo de cana à radiação UV a uma distância de dez metros na saída da câmara de desinfecção com 132 segundos.

A Figura 6 ilustra como as amostras do caldo de cana foram coletadas para posterior análise microbiológica.



FIGURA 6-Ilustração da coleta do caldo de cana para análise microbiológica.

Para a preservação das amostras, os tubos de ensaios foram colocados em caixa isotérmica, sendo imersos em gelo para minimizar a alteração microbiana e transferido imediatamente para o Laboratório de Análises Ambientais e Produtos Alimentícios da Fundação de Ensino Superior de Passos (FESP/UEMG), para realização das análises.

Diluições seriadas e inoculação em triplicatas das amostras foram realizadas para as análises microbiológicas, inoculando-se 1 mL de cada diluição em plaquinhas de petrifilm 3M. C.A (Aerobic Count Plates), preparadas com meio para contagem global de bactérias (AOAC, 2000; AFNOR). Na Figura 7 está apresentado o esquema de diluições seriadas das amostras do caldo de cana. As amostras foram colocadas em estufa a 35,5°C e as contagens foram realizadas após 48 horas de incubação utilizando-se um contador de colônia. As placas de petrifilm após período de incubação estão ilustradas na Figura 8.

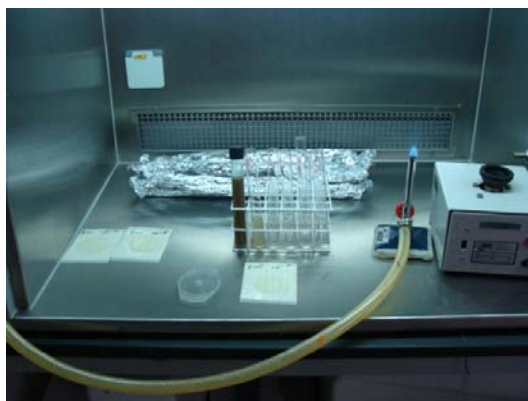


FIGURA 7- Ilustração da diluição seriada das amostras de caldo de cana.

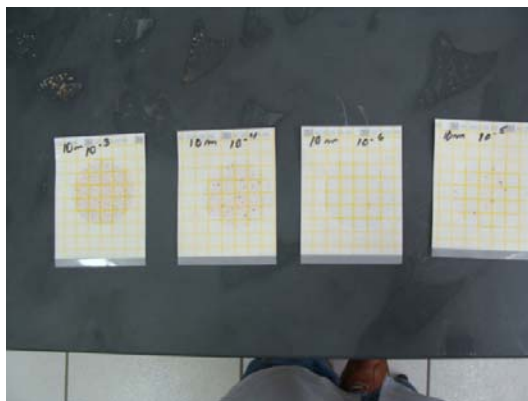


FIGURA 8-Ilustração das placas de petrifilm após período de incubação.

3.6 FERMENTAÇÃO

O fermento utilizado no experimento foi de qualidade específica para produção de cachaça. Foram alimentadas cinco dornas com caldo de cana radiado por três ciclos fermentativos, sendo denominado neste trabalho de CCR e cinco dornas com caldo de cana não radiado por três ciclos fermentativos, sendo denominado de CSR. As dornas foram alimentadas nas mesmas condições de brix. O CCR após o processo de fermentação deu origem ao vinho radiado VCR e o CSR deu origem ao vinho não radiado VSR. As dornas de fermentação do caldo de cana estão ilustradas na figura 9.



FIGURA 9- Ilustração das dornas de fermentação do caldo de cana.

3.7 AMOSTRAS DO PRODUTO FINAL PARA ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS

Foram coletadas amostras diretamente nas dornas do VCR e do VSR em frascos de 500 mL, após terem-se esgotado todos os açúcares pelas leveduras e cessado o processo de fermentação. As amostras foram enviadas para o Laboratório da Usina Itaquara de Açúcar e Álcool para realização das análises de teor alcoólico, acidez e pH.

O teor alcoólico do vinho foi obtido destilando-se 25mL da amostra em microdestilador (Tecnal[®], mod. TE 012). O destilado foi recolhido em um balão volumétrico de 25mL para determinar sua densidade relativa em um densímetro digital (ANTON PAAR[®], mod. DMA 4500), com conversão em grau alcoólico (v.v⁻¹) e leitura direta. A acidez total do vinho foi realizada segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Determinou-se o pH do vinho utilizando-se um pHmetro digital, eletrônico (pHtec, Analion[®] mod. PM 608), pré-calibrado sendo feitas leituras diretas no aparelho.

3.8 DESTILAÇÃO DO VINHO FERMENTADO

O vinho fermentado foi destilado em um alambique do tipo misto, construído em aço inox e cobre, com serpentina interna feita de cobre, e aquecimento por meio de vapor provido de uma caldeira. O aparelho destilador está ilustrado na Figura 10.

O VCR e o VSR foram destilados originando a cachaça submetida à radiação ultravioleta (CHCR) e a cachaça não submetida à radiação ultravioleta (CHSR). A destilação da cachaça foi realizada extraíndo-se toda a quantidade de álcool presente no vinho (bica corrida) fazendo-se apenas o corte de calda. Amostras de CHCR e CHSR foram coletadas para efetuar as análises físicas e químicas, as quais estão representadas na Tabela 4. As análises das amostras foram realizadas no Laboratório da Universidade Federal de Lavras (UFLA) de acordo com os métodos oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), segundo a Instrução normativa nº 13, de 29 de junho de 2005 (BRASIL, 2005).



FIGURA 10 - Ilustração do aparelho destilador (alambique).

3.9 MÉTODOS ESTATÍSTICOS EMPREGADOS

3.9.1 Caldo de Cana-de-açúcar

Com o intuito de modelar os dados obtidos referentes às análises microbiológicas do caldo de cana submetido à radiação UV (CCR) e do caldo de cana não submetido à radiação UV (CSR); e das análises químicas do vinho com radiação (VCR) e do vinho sem radiação (VSR), foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado. O modelo estatístico para o delineamento inteiramente casualizado é dado por:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}$$

em que:

y_{ij} é o valor observado na parcela experimental que recebeu o i -ésimo tratamento na j -ésima repetição ($j = 1, 2, 3, 4, 5$);

μ Representa uma constante geral associada e esta variável aleatória

α_i é o efeito do tratamento i ($i = 1, 2$);

e_{ij} é o erro experimental associado a observação y_{ij} , suposto ter distribuição normal com média zero e variância comum.

Os resultados obtidos no experimento foram submetidos à análise de variância (ANOVA), para verificar se houve diferenças no número de microrganismos do CCR e do

CSR e para verificar se houve diferenças nas análises químicas entre VCR e o VSR. A análise estatística do experimento foi realizada pelo *software* estatístico SISVAR, versão 5.1. (FERREIRA, 2007).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES DO CALDO DE CANA A SER SUBMETIDO À RADIAÇÃO UV

Na Tabela 1 estão apresentados os valores médios da porcentagem de impurezas, do pH e brix do caldo de cana (caldo misto) antes de ser submetido à radiação UV. Foi verificado um valor médio de brix de 14,3, sendo feita a embebição com água no segundo terno durante o processo de moagem. Segundo Marques, Marques & Junior, (2001), o caldo misto que se forma durante o processo de moagem constitui-se de uma solução impura e diluída de sacarose e apresenta partículas em suspensão que vêm na matéria prima oriunda do campo, substâncias coloridas que são os pigmentos de plantas (antocianinas, ácidos polifenólicos e clorofila), e de substâncias dissolvidas, destacando-se a xilana, arabana e a dextrana decorrentes da ação microbiana causada por bactérias do gênero *Leuconostoc*.

TABELA 1. Médias da porcentagem de impurezas, do pH e brix do caldo de cana antes de ser submetido à radiação ultravioleta.

Parâmetros analisados	Médias
Porcentagem de impurezas	0,6
Ph	5,5
Brix	14,3

Para avaliar a eficiência do tratamento, o caldo de cana foi exposto aos raios UV através da cuba de tratamento em um sistema de fluxo contínuo. O tempo gasto entre a entrada e a saída da cuba foi de 132 segundos, sendo este tempo considerado para todas as repetições.

A sobrevivência de microrganismos está relacionada à dose aplicada e o tempo de exposição aos raios UV. Quanto maior o tempo de exposição maior será a lesão ocasionada em um numero maior de microrganismos e menor será a fração de sobrevivência desses microrganismos. Segundo Lehninger (1984), quando os microrganismos são expostos à radiação UV, têm o seu material genético danificado pela ação dos raios, ocorrendo o rompimento das ligações nas pontes de hidrogênio, formando os dímeros de pirimidina, inativando o microrganismo.

O caldo misto avaliado apresentou impurezas em sua constituição. Quanto maior for a quantidade de impurezas sólidas e de sólidos dissolvidos, maior é a reflexão dos raios ultravioletas no caldo. Pires (2002) avaliou a desinfecção de esgotos com radiação ultravioleta e verificou a influência do efluente e da fotorreativação com a utilização de quatro vazões diferentes. A qualidade do efluente foi de grande importância, pois as amostras que apresentaram menor quantidade de sólidos suspensos totais resultaram em menores frações de sobrevivência de coliformes totais e fecais se comparado aos lodos, que apresentaram maior quantidade de sólidos suspensos totais, logo maior fração de sobrevivência de coliformes.

O sistema de fluxo contínuo de caldo, que em seu trajeto gerou turbulência, influenciando na dose aplicada aos microrganismos, a qualidade do caldo testado e a dose aplicada são fatores que podem em partes ser responsáveis pelos resultados obtidos no experimento.

Deve-se levar em consideração que os microrganismos possuem um sistema de reparo de DNA que permite reparar a lesão ocasionada pela ação da radiação UV. Quando esta radiação é subletal a reparação do DNA é feita através da ação de enzimas especiais que restabelecem o sequenciamento genético do microrganismo, evitando que o sequenciamento errôneo seja passado para as próximas gerações.

Os resultados experimentais obtidos pela análise de variância permitem concluir que não houve diferenças significativas, ($P = 0,6463$) nas análises microbiológicas do caldo de cana radiado nos tempos 0; 53; 79; 106 e 132. Na Tabela 2 estão apresentadas as médias das análises microbiológicas do caldo de cana radiado de acordo com os tempos estudados. O teste de Scott-Knott foi utilizado para demonstrar que as médias não diferiram entre si no nível nominal de 5% de significância.

TABELA 2. Número médio de microrganismos, em UFC/mL, no caldo de cana radiado de acordo com os tempos estudados.

Tempos (segundos)	¹ Médias (UFC/mL)
0	$1,7 \times 10^6$ a
53	$1,7 \times 10^6$ a
79	$1,6 \times 10^6$ a
106	$1,5 \times 10^6$ a
132	$1,5 \times 10^6$ a

¹ – Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, considerando o valor nominal de 5% de significância.

4.2 ANÁLISES DO VINHO VSR E VCR

Em se tratando das análises físicas e químicas do vinho proveniente do caldo de cana antes e após ser submetido à radiação UV, não foram observadas diferenças significativas entre o VSR e o VCR com relação à acidez, porcentagem de álcool e pH ($P > 0,05$), através do teste F da análise de variância. Na Tabela 3 estão apresentadas as médias dos dados analíticos.

Com relação à acidez, o VSR e o VCR apresentaram valores de 6,3g/L e 6,0 g/L, respectivamente. Valores médios de acidez foram encontrados por Malta (2006), de 3,9 g de ácido acético/L durante o processo de propagação do fermento, o que está de acordo com os valores encontrados neste trabalho. De acordo com Pereira (2007), o ácido acético é formado por bactérias que utilizam o etanol em seu metabolismo, produzindo ácidos, aumentando assim a acidez.

Análises de teor alcoólico apresentaram um valor médio de 8,1% para o VSR e 8,5% para o VCR. Estes resultados estão de acordo com Braga (2006) que encontrou valores mínimos de 7,8 % e máximos de 10,0%. Observando que o brix médio de alimentação das dornas foi de 14,6. Segundo Schwan & Castro (2001), o processo fermentativo consiste basicamente no desdobramento do açúcar (sacarose) em álcool.

TABELA 3. Médias dos parâmetros analisados para o vinho resultante do caldo de cana antes e após ser submetido à radiação ultravioleta.

Parâmetros analisados	Médias		P-valor
	VSR	VCR	
Acidez (g/l)	6,3	6,0	38,83
Álcool (%)	8,1	8,5	39,83
Ph	3,6	3,5	80,38

O pH do vinho reflete a quantidade de ácidos produzidos durante o processo fermentativo. Segundo Lima, Basso & Amorim (2001), a fermentação se desenvolve em uma faixa ampla de pH, sendo adequado entre 4 e 5, porém, o pH final do processo fermentativo se encontra entre 3,5 e 4,0. Os valores de pH apresentados pelas fermentações dos VSR e do VCR estão próximos a estes valores e coincidem com os resultados obtidos por Pereira (2003), que obteve valores de pH entre 3 e 5 no final da fermentação.

4.3 ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS DA CACHAÇA

O vinho fermentado com caldo de cana sem radiação, VSR, e o vinho fermentado com caldo de cana radiado, VCR, foi destilado, produzindo a cachaça sem a radiação, CHSR e a cachaça com radiação CHCR. Os resultados das análises de cachaça estão apresentados na Tabela 4 e as discussões referentes aos resultados foram feitas a seguir.

O grau alcoólico real nas amostras de CHSR e CHCR apresentaram valores próximos à faixa mínima permitida, estando de acordo com os estabelecidos pela legislação vigente (BRASIL, 2009).

Com relação à acidez volátil, dentre os produtos secundários da fermentação alcoólica, o ácido acético tem se destacado, sendo expresso em acidez volátil (LIMA, 1964; NYKAMEN & NYKAMEN, 1983). A acidez volátil se desenvolve durante o processo fermentativo por bactérias acéticas, e outros tipos de bactérias têm sua procedência da cana-de-açúcar ou se desenvolvem no próprio processo fermentativo. A acidez volátil apresentada nas amostras de CHSR e CHCR foi de 21,4 e 33,77 mg/100mL de álcool anidro, respectivamente.

Os alcoóis superiores são aqueles que possuem em sua fórmula mais de dois átomos de carbono, que se formam durante o processo fermentativo proveniente, em grande parte, das transformações dos aminoácidos, podendo ser influenciados para sua formação por baixo pH e altas temperaturas. As amostras de CHSR e CHCR apresentaram altos valores de alcoóis superiores, 290,13 e 330,17 mg/100mL de álcool anidro, respectivamente. Este resultado pode ser justificado pelos baixos valores de pH obtidos para os vinhos. Tais valores estão próximos aos valores máximos permitidos pela legislação vigente e acima daqueles encontrados por Pereira *et al.* (2003). Os autores encontraram um valor médio de alcoóis superiores de 225,35mg/100mL nas amostras de cachaça.

Os resultados das análises de furfural das amostras de CHSR e CHCR apresentaram 0,68 e 0,25mg/100 mL, respectivamente, estando estes valores dentro da faixa estabelecida oficialmente. A análise de aldeído em aldeído acético para a CHSR apresentou valor de 34,89mg/100mL, estando este valor acima do valor estabelecido pela legislação vigente. A amostra da CHCR apresentou valor de 22,62mg/100mL, estando próximo ao valor máximo estabelecido. Estes resultados justificam-se pelo fato de que o aldeído é um produto que se volatiliza no início da destilação e, durante o processo de destilação, não foi efetuado o corte de cabeça. Os valores de aldeído acético encontrados por Cantão (2006) apresentaram em média 13,42 mg /100mL de álcool anidro

As análises de ésteres em acetato de etila apresentaram valores de 20,36 e 24,26mg/100mL de álcool anidro para as amostras de CHSR e CHCR, respectivamente. Estes valores estão muito abaixo dos valores máximos estabelecidos pela legislação vigente. Segundo Cantão (2006), os ésteres são compostos importantes para a formação do “flavour”, sendo formados principalmente durante o processo de maturação e envelhecimento. Clemente (2001) destaca que, entre outros produtos secundários, formados na fermentação alcoólica, que passam para o destilado, os ésteres e aldeídos são compostos que dão aroma e sabor à bebida. Comparando-se os resultados obtidos para a CHSR e para a CHCR, os parâmetros aroma e sabor da bebida não se alteraram com a submissão do caldo de cana à radiação UV.

TABELA 4. Análises físicas e químicas de cachaças produzidas com caldo de cana radiado e não radiado com ultravioleta comparado a legislação vigente.

Parâmetros analisados	CHSR	CHCR	Limites	Limites
			Mínimos	Máximos
Grau alcoólico real a 20 ⁰ C (%v/v)	38,93	38,13	38,0	48,0
Acidez volátil em ácido acético (mg/100mL de álcool anidro)	21,40	33,77	-x-	150,0
Alcoóis superiores (mg/100mL de álcool anidro)	290,13	330,17	-x-	360,0
Furfural (mg/100mL de álcool anidro)	0,68	0,25	-x-	5,0
Aldeídos em aldeídos acéticos (mg/100mL de álcool anidro)	34,89	22,62	-x-	30,0
Ésteres em acetato de etila (mg/100mL de álcool anidro)	20,36	24,26	-x-	200,0
Soma dos Componentes Secundários (mg/100mL de álcool anidro)	367,46	411,07	200,0	650,0

Observando-se a soma total dos parâmetros analisados nas amostras das CHSR e CHCR verifica-se que a CHCR apresentou um maior valor em relação à CSR. Comparando-se as duas amostras com o valor estabelecido pela legislação vigente, que estabelece que a soma não possa ser inferior a 200 mg e não superior a 650mg/100mL de álcool anidro, observou-se que os resultados das análises físicas e químicas das cachaças se apresentaram dentro destes valores limítrofes.

5 CONCLUSÕES

- As características físico-químicas presentes no caldo de cana e o próprio sistema contínuo de tratamento influenciaram na ação da radiação UV sobre os microrganismos viáveis presentes na matéria-prima para produção de cachaça, ocasionando doses sub-letais. Não houve diferenças estatisticamente significativas nos números de microrganismos eliminados em função dos tempos de tratamentos com a radiação UV.
- As análises do vinho proveniente do caldo de cana, antes e após ser submetido à radiação UV, não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre o vinho sem radiação e o vinho com radiado com relação à acidez, porcentagem de álcool e pH.
- Não foram observadas diferenças na comparação da qualidade das cachaças produzidas com caldo tratado com a radiação UV e o caldo não tratado, comparando aos valores estabelecidos pela legislação vigente, verificando-se que ambas apresentaram-se dentro dos valores limítrofes.
- Mais pesquisas devem ser direcionadas para reforçar a importância da utilização da radiação UV na redução do número de microrganismos no caldo de cana, na melhor qualidade do produto final, entre outras vantagens, para estimular o seu uso em sistemas de produção de cachaça.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, P. M. **Aspectos físico-químicos de cachaças armazenadas em tonéis de carvalho**. 2004. 73 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2004.

ALCARDE, A. R.; WALDER, J. M. M.; HORII, J. Fermentation of irradiated sugarcane must. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 4, p. 677-681, 2003.

AMORIM, H. V. et. al. **Fermentação alcoólica & Ciência e tecnologia**. Piracicaba: Pancrom, 2005. 448p.

ANDRADE, L. A. B. Cultura de cana-de-açúcar. In: CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. Lavras: UFLA, 2001. cap. 1, p. 19-49

Association of. Official Agricultural Chemists - AOAC. **Method 990.12**: Official methods of analysis of AOAC International. 17. ed. Gaithersburg: AOAC International, 2000. p. 22-23.

Association Française de Normalisation (AFNOR): Certificate No.: 3M 01/1-09/89. 3M Petrifilm Total Aerobic Count. Tour Europe, 92049 Paris La Defense Cedex.

AQUARONE, E.; BARRUFALDI, R. **Emprego industrial de penicilina visando à qualidade de aguardente de caldo de cana** : Tecnol Aliment. Bebida. São Paulo: E. Blucher, 1966.

AQUARONE, E. Generalidades sobre bebidas alcoólicas. In: _____; BORZANI, W. SCHMIDELL, W; LIMA, U. A. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: E. Blucher, 2001. Cap.1, p. 1-19.

BEZERRA, C. W. B. **Caracterização química da aguardente de cana-de-açúcar: determinação de álcoois, ésteres e dos íons Li^+ , Ca^+ e Mg^{+2} , Cu^{+2} e Hg^{+2}** . 1995. 53f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 1995.

BIZELLI, L. C. ; RIBEIRO, C. A. F.; NOVAES, F. V. Dupla destilação da aguardente de cana: teores de acidez total e de cobre. **Scientia Agricola**. Piracicaba: v. 57, n. 4, p. 623-627, 2000.

BOLTON, J. R. Light compendium: ultraviolet principles and applications. **EPA-Newsletter**, n. 66, p. 9-37, 1999.

BRASIL. Decreto nº 6.871 de 4 de junho de 2009. Regulamenta a lei nº. 8.918, de 4 de junho de 1994, que dispõe a padronização, a classificação, o registro, a inspeção e a fiscalização da produção e do comércio de bebidas. Disponível em: <<http://www.jusbrasil.com.br/legislacao/231844/decreto-6871-09>>. Acesso em: 10 nov. 2009.

BRASIL. Instrução Normativa nº13, de 29 de junho de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**, Brasília, s.1, p. 3, 2005. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=12386>>. Acesso em: 10 nov. 2009.

BRAGA, V. S. **A influencia da temperatura na condução de dois processo fermentativos para produção de cachaça**. 2006. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba SP, 2006.

CANA BRASIL, **Exportação de cachaça cresce 46% em 2008**. Disponível em: <<http://www.canabrasil.com.br/content/view/351/78/>>. Acesso em: 30 ago. 2009.

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

CARDOSO, M. G. et.al. **Cachaça: Qualidade e Produção**. Lavras: UFLA, 1999.

CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana de açúcar**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 445 p.

CANTÃO, F. O. **Análises físico-químicas e avaliação da presença do cobre em aguardentes de cana por aluminossilicatos**. 2006. 62 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2006.

CLEMENTE, P. R. Análise sensorial. In: CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. Lavras: UFLA, 2001. Cap. 6. p. 175 – 183.

CENTRO DE PRODUÇÕES TÉCNICAS (CTP). **Cachaça: Produção artesanal de qualidade**. Viçosa: CTP, 1998. 78 p.

DI BERNARDO, L. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. Rio de Janeiro: ABES, 1993. v II, 503 p.

FARIA, J. B. **Determinação dos compostos responsáveis pelo defeito sensorial das aguardentes de cana (Saccharum SSP) destiladas na ausência de cobre**. 2000. 99 f. Tese (Livre docência) - Faculdade de Ciências Farmacêutica, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

FERREIRA, D. F. **Sistemas para análises de variância para dados balanceados**. SISVAR versão 5.1. Lavras: UFLA, 2007. (Software).

GRACIANO, W. P. **Delineamento das condições biológicas e físico-químicas para biodigestão da vinhaça**. 2007. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas, Naturais e Tecnológicas) - Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DA CACHAÇA (IBRAC). **Mercado externo**. Disponível em: <http://www.ibrac.net/index.php?option=com_content&view=article&id=47&Itemid=44>. Acesso em: 05 set. 2009.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos físicos e químicos para análises de alimentos**. 3. Ed. São Paulo: IMESP, 1985. v. 1, 533p.

KOLLER, L. R. **Ultraviolet radiation**. Londres: John Wiley & Sons, 1952. 220p.

LEHNINGER, A. L. **Princípio de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1984. 725p

LEWIN, B. **Genes VII**. São Paulo: Artmed, 2001. 931p.

LIMA, U. A. **Estudos dos principais fatores que afetamos componentes do coeficiente não alcoólico das aguardentes da cana**. Piracicaba: ESALQ- USP, 1964. 174 p. (Memorial de concurso para Professor Catedrático da ESALQ- USP).

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. **Produção de etanol**. In: _____; AQUARONE, E.; TORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: E. Blucher, 2001. Cap.1, p. 1-43.

LIMA, U. A. Aguardente. In: _____; AQUARONE, E.; BORZANI, W. A. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: E. Blucher, 1993. cap. 5, p. 79-103.

MALTA, H. L. **Estudos de parâmetros de propagação de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*) para produção de cachaça de alambique**. 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte, 2006.

MARQUES, M. O.; MARQUES, T. A.; JUNIOR, L. T. **Tecnologia do açúcar**: produção e industrialização da cana-de-açúcar. Jaboticabal: FUNEP, 2001. 166p.

NYKAMEN, L; NYKAMEN, I. **Rum flavor of distilled beverages**: origin and development. Piggott, J. R. ed. Society of chemical industry; Ellis Harwood Limited. Chichester: uk. 1983. p. 49-63.

PATARO, C. et. al. Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique. **Informe agropecuário**, EPAMIG, Belo Horizonte, v. 23, n 217, p37- 43, 2002.

PEREIRA, A. F. **Suplementação de nitrogênio sobre a fermentação alcoólica para produção de cachaça, cerveja e vinho**. 2007. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, 2007.

PEREIRA, N. E. et.al. Compostos secundários em cachaças produzidas no estado de Minas Geras. **Ciência. agrotécnica**, Lavras, v. 27, n. 5, p.1068-1075, set./out. 2003

PIRES, M. R. **Desinfecção de esgotos com radiação ultravioleta: influencia da qualidade do efluente e da fotoreativação**. 2002. 128 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) - Faculdade de Engenharia Civil_Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

QUALLS, R. G.; JOHNSON, J. D. Modeling and efficiency of ultraviolet disinfection systems. **Water Research.**, Great Britain, v. 19, n. 8, p. 1039 -1046, 1983.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APÓIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS (SEBRAE). **Diagnóstico da cachaça de Minas Gerais**. Belo Horizonte, 2001. 259 p.

SILVEIRA, L. C. I.; BARBOSA, M. H. P.; OLIVEIRA, M. W. Manejo de variedades de cana-de-açúcar predominantes nas principais regiões produtoras de cachaça em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, EPAMIG, v. 23, n. 217, p. 25-32, 2002.

SOBOTKA, J. The efficiency of water treatment and disinfection by means of ultraviolet radiation. **Water Science Technology**, v.27, n.3, p.343-346, 1993.

SCHWAN, R. F.; CASTRO, H. A. Fermentação. In. CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. Lavras: UFLA, 2001. Cap. 3, p. 113-127.

URENHA, L. C.; PRADELLA, J. C.; RODRIGUES, M. F. A. Esterilização de equipamentos. In: SCHIMIDELL, W.; et.al. **Engenharia bioquímica**. São Paulo: E. Blucher, 2001. cap. 3, p. 21-35.

WOLFE, R. L. Ultraviolet disinfection of potable water. **Enviroment Science Technology**, v. 24, n. 6, p. 768-773, 1990.

YOKOYA, F. **Fabricação da aguardente de cana**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1995. 283 p.

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