



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
FEIRA DE SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA**

CLEBER MIRANDA GONÇALVES

**USO DE LEVEDURA SELECIONADA EM ESCALA
PILOTO PARA A PRODUÇÃO DE CACHAÇA DE
ALAMBIQUE**

Feira de Santana, BA

2015

CLEBER MIRANDA GONÇALVES

**USO DE LEVEDURA SELECIONADA EM ESCALA
PILOTO PARA A PRODUÇÃO DE CACHAÇA DE
ALAMBIQUE**

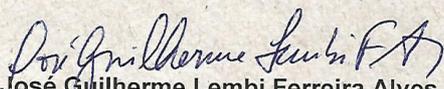
Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador (a): Prof. Dr. Ana Paula Trovatti Uetanabaro.

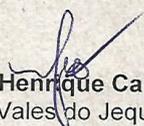
Feira de Santana, BA

2015

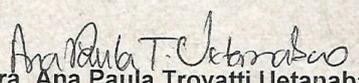
BANCA EXAMINADORA


Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves
(Universidade Federal de Lavras)


Dra. Edilma Pinto Coutinho
(Universidade Federal da Paraíba)


Dr. Marcus Henrique Canuto
(Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri)


Dr. Giovani Brandão Mafra de Carvalho
(Universidade Estadual de Feira de Santana)


Dra. Ana Paula Trovatti Uetanabaro
(Universidade Estadual de Santa Cruz)
Orientadora e Presidente da Banca

**Feira de Santana – BA
2015**

Aos meus pais José e Zildete, pelo amor, educação, confiança e dedicação, Dedico.

E a minha avó materna Dolores e ao meu avô paterno Josias (*in memoriam*), pela serenidade transmitida, valiosos conselhos e exemplo de fé, coragem e força, Ofereço.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida, pela existência, pelo amor incondicional, por tudo o que tens feito em minha vida e pela força e confiança para percorrer os caminhos da vida, permitindo-me alcançar mais esta vitória.

Gostaria de expressar também a minha gratidão às pessoas e instituições que contribuíram e me ajudaram para a concretização deste trabalho, em especial:

À professora Doutora Ana Paula Trovatti pela orientação, apoio, acolhimento, confiança, amizade e exemplo de pessoa e de profissional;

Ao professor Eduardo Gross, pela amizade, acolhimento e disponibilidade de ajuda a qualquer momento;

À minha singela irmã Jacqueline pelo apoio e carinho em todos os momentos;

À minha querida e amada esposa Susane Paranhos pelo amor, apoio, carinho e cuidado prestados de coração durante todas as atividades acadêmicas da tese;

Ao meu querido e amado filho Davi pela inspiração e fonte iluminada de amor e energias para a finalização da tese;

Aos meus grandes amigos Henrique Sereno e Samuel Carvalho, pelo apoio, incentivo e ajudas importantes em todos os momentos da tese;

À Dalila de Souza e à amiga Ana Carolina Bezerra pela valiosa e importantes ajudas prestadas na parte molecular da tese;

A todos os estagiários, professores e funcionários da Agroindústria da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), em especial a Antônio Fábio, Cláudio, Polyane e Márcio, pela ajuda, incentivo, amizade e troca de experiências;

Aos estagiários da Agroindústria da UESC, Walber Duarte e Henrique Meggi, pela ajuda e apoio dado nos procedimentos experimentais da tese;

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – PPGBiotec – UEFS/FIOCRUZ e a Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), pela minha formação acadêmica;

Ao Instituto Federal de Sergipe, Campus São Cristóvão, pelo afastamento concedido para terminar o curso de Doutorado;

A todos os professores e técnicos da área de alimentos do Instituto Federal de Sergipe, Campus São Cristóvão, em especial ao Prof. Marco Arlinco, ao Prof. Herivelton, ao Prof. Alfredo Cabral, à Profa. Telma, à Profa Lani Walcélia, ao Prof. Anselmo Pinheiro e à Profa. Juliana Serio, pela ajuda, apoio e incentivo prestados durante as atividades acadêmicas do Doutorado;

Ao Sr. Luis Fernando Galetti e a Cosme, da Cachaça Rio do Engenho, pela ajuda, pelo compartilhamento de ideias e apoio durante as atividades experimentais da tese;

A todos os produtores de Cachaça de Alambique visitados no estado da Bahia pela valiosa participação, informações, gentilezas e contribuição para o desenvolvimento do projeto de pesquisa;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos oferecida durante o curso de Doutorado;

A todos, minha gratidão.

"Os sonhos são como uma bússola, indicando os caminhos que seguiremos e as metas que queremos alcançar. São eles que nos impulsionam, nos fortalecem e nos permitem crescer."
(Augusto Cury)

RESUMO

A cachaça corresponde a uma bebida dotada de sabor e aroma característico, sendo constituída principalmente de álcool e água e de outros componentes, formados em pequenas quantidades durante o processo de fermentação, destilação e envelhecimento, os quais recebem a denominação de produtos secundários da fermentação alcoólica. As leveduras e as condições de fermentação são apontadas como fatores que influenciam no sabor das bebidas alcoólicas, pois a maioria dos compostos secundários responsáveis pela qualidade química e sensorial da bebida é formada durante a fermentação. A utilização de leveduras selecionadas para produção de cachaça apresenta vantagens tecnológicas, como permite minimizar contaminações indesejáveis, reduz o tempo de fermentação, aumenta a produtividade e melhora as características químicas e sensoriais da bebida. O presente trabalho teve como objetivos produzir cachaça em escala piloto e de alambique e avaliar a composição química das bebidas produzidas por linhagens selecionadas de *S. cerevisiae*; verificar a presença da levedura selecionada no final do processo fermentativo em escala piloto e realizar a avaliação de parâmetros fermentativos da cepa selecionada em relação a inóculos comercial e selvagem. Foram testadas 16 cepas de *Saccharomyces cerevisiae*: SC52, SC60, SC82, SC91, SC102, SC114, SC129, SC138, SC174, SC177, SC179, SC184, SC219, SC220, SC225 e SC229. Destas, apenas a cepa SC82 conseguiu prosseguir as etapas do esquema de multiplicação em escala piloto e em escala de alambique, bem como nas etapas do processo de fermentação em escala piloto e de alambique e produzir cachaça. Através da técnica de RFLPmtDNA foi possível verificar a permanência e dominância da levedura selecionada (SC82) no final do processo fermentativo feito em escala piloto. Na avaliação dos parâmetros fermentativos a *S. cerevisiae* cepa SC82 apresentou um menor tempo de fermentação (média de 14 h) e um maior rendimento (48 %), uma maior eficiência (93,94 %) e uma produtividade (2,35 g/Lh) superior ao final da terceira fermentação realizada em relação ao inóculo comercial e ao inóculo selvagem. Em relação aos resultados das análises químicas da cachaça produzida em escala piloto e da produzida em escala de alambique, apenas os teores de alcoóis superiores estavam acima do permitido pela legislação brasileira nas duas bebidas produzidas.

Palavras-chave: Fermentação alcoólica; Compostos secundários; Cromatografia gasosa; *S. cerevisiae*.

ABSTRACT

Cachaça corresponds to a beverage with characteristic flavor and aroma, constituted mainly of alcohol and water plus some other components formed in small amounts during the process of fermentation, distillation and aging, and known as the secondary products of alcoholic fermentation. The yeasts and fermentation conditions are considered to be the factors that influence the flavor of alcoholic beverages, since the majority of the secondary compounds responsible for the chemical and sensory quality of the beverage are formed during fermentation. The use of selected yeasts for the production of cane spirit has been studied, with a view to increasing productivity, gaining technological advantages and improving the sensory characteristics of the beverage. This study aimed to produce cachaça in pilot and alembic scales and evaluate the chemical composition of the beverages produced by selected strains of *S. cerevisiae*; verify the presence of the selected yeast at the end of the fermentation process on a pilot scale and carry out the evaluation of fermentation parameters of the selected strain in relation to commercial and wild inoculums. The following 16 strains of *Saccharomyces cerevisiae* were tested: SC52, SC60, SC82, SC91, SC102, SC114, SC129, SC138, SC174, SC177, SC179, SC184, SC219, SC220, SC225 and SC229. Among these, only the SC82 strain could pursue multiplication and fermentation scheme steps to produce cachaça in pilot and alembic scales. By RFLP mtDNA technique was possible to verify the permanence and dominance of selected yeast (SC82) at the end of fermentation process done in pilot scale. In the evaluation of fermentation parameters to *S. cerevisiae* strain SC82 had a shorter fermentation time (14h average) and a higher yield (48%), greater efficiency (93.94%) and a higher productivity (2.35 g/Lh) at the end of the third fermentation carried out in relation to commercial and wild inoculums. Regarding the results of the chemical analysis of cachaça produced in pilot and still scale, only the higher alcohol levels were above that allowed by Brazilian legislation in both produced beverages.

Keywords: Alcoholic fermentation; Secondary compounds; Gas chromatography; *S. cerevisiae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 — Fluxograma do processo produtivo da cachaça de alambique.....	24
Figura 2 — Procedimento de reativação das leveduras selecionadas para a produção de cachaça em escala piloto.....	40
Figura 3 — Esquema de multiplicação das leveduras selecionadas utilizadas para a produção de cachaça em escala piloto.....	42
Figura 4 — Procedimento de fermentação do caldo de cana pelas leveduras para a produção de cachaça em escala piloto.....	43
Figura 5 — Bateladas fermentativas realizadas na etapa F2 para dar continuidade ao processo de fermentação em escala piloto das cepas testadas que conseguiram zerar o teor de açúcar.....	44
Figura 6 — Alambique de cobre utilizado para a destilação da cachaça produzida em escala piloto.....	45
Figura 7 — Procedimento da multiplicação em laboratório da levedura utilizada para a produção de cachaça em escala de alambique.....	48
Figura 8 — Esquema de propagação para o aumento do volume dos inóculos testados.....	55
Figura 9 — Perfis de restrição do DNA mitocondrial dos isolados de leveduras (L1 a L13) e da linhagem selecionada <i>S. cerevisiae</i> SC82 utilizada como inóculo iniciador. M: marcador de peso molecular.....	88
Figura 10 — Fermentações em dornas de aço inox mostrando o teor de açúcar zerado da etapa P10 da levedura selecionada SC82 (A) e do inóculo comercial (B).....	91
Figura 11 — Fermentação do inóculo selvagem após 24h de inoculação na etapa P10.....	91
Figura 12 — Fermentação do inóculo selvagem após 48h do término da etapa P10.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Teores máximos (em mg / 100 mL de álcool anidro) permitidos pela legislação brasileira das moléculas voláteis na cachaça.....	34
Tabela 2 — Teores máximos de contaminantes orgânicos na cachaça permitidos pela legislação brasileira.....	35
Tabela 3 — Teores máximos de contaminantes inorgânicos na cachaça permitidos pela legislação brasileira.....	35
Tabela 4 — Tipo de determinação e a técnica utilizada para as análises químicas das cachaças produzidas em escala piloto e de alambique.....	49
Tabela 5 — Teor de açúcar (Brix) do mosto obtido pelas leveduras testadas no final da etapa P4 da multiplicação em escala piloto.....	61
Tabela 6 — Teor de açúcar (Brix) do mosto obtido pelas leveduras testadas no final da etapa F1 da fermentação em escala piloto.....	63
Tabela 7 — Teor de açúcar (Brix) do mosto obtido pelas leveduras testadas na etapa F2 da fermentação em escala piloto.....	66
Tabela 8 — Tempo para zerar o teor de açúcar (Brix) das fermentações (F2 a F12) realizadas pela cepa SC82 em escala piloto para a produção de cachaça.....	68
Tabela 9 — Características do aroma (A+: agradável; A-: não agradável) do mosto obtido pelas cepas testadas nas etapas da fermentação (F1 e F2) para a produção de cachaça em escala piloto.....	69
Tabela 10 — Teor de açúcar (Brix) alcançado pela levedura <i>S. cerevisiae</i> SC82 nas etapas P5 a P8 da multiplicação para produção de cachaça em escala de alambique.....	71
Tabela 11 — Resultados da análise química (moléculas voláteis, contaminantes orgânicos e inorgânicos) da CPEP e da CPEA pela cepa SC82.....	72
Tabela 12 — Tempos de fermentação da levedura selecionada SC82 e do inóculo comercial durante três bateladas de fermentações realizadas utilizando-se caldo de cana a 15ºBrix, aquecido a 30ºC e sem suplementação.....	93
Tabela 13 — Açúcares totais consumidos, produção de etanol, rendimento, eficiência e produtividade nas três bateladas fermentativas para a cepa SC82 e para o inóculo comercial.....	94

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS	16
1.1.1 Objetivo geral.....	16
1.1.2 Objetivos específicos.....	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA CACHAÇA DE ALAMBIQUE	17
2.2 TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DA CACHAÇA DE ALAMBIQUE	19
2.3 UTILIZAÇÃO DE LEVEDURAS SELECIONADAS	24
2.4 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS SECUNDÁRIOS DURANTE A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	27
2.5 PADRÃO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DA CACHAÇA.....	33
2.6 ANÁLISE MOLECULAR DE LEVEDURA SELECIONADA.....	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 LEVEDURAS UTILIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE CACHAÇA EM ESCALA PILOTO.....	39
3.2 PREPARO DO INÓCULO DAS LEVEDURAS SELECIONADAS PARA A PRODUÇÃO DE CACHAÇA EM ESCALA PILOTO.....	39
3.3 PROCESSO DE MULTIPLICAÇÃO DAS LEVEDURAS SELECIONADAS PARA A PRODUÇÃO DE CACHAÇA EM ESCALA PILOTO.....	41
3.4 PROCESSO DE FERMENTAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE CACHAÇA EM ESCALA PILOTO	42
3.5 PROCESSO DE DESTILAÇÃO EM ESCALA PILOTO	45
3.6 PRODUÇÃO DE CACHAÇA EM ESCALA DE ALAMBIQUE COM LEVEDURA SELECIONADA.....	45
3.7 ANÁLISES QUÍMICAS DAS CACHAÇAS PRODUZIDAS.....	48
3.8 VERIFICAÇÃO MOLECULAR DA OCORRÊNCIA DA LEVEDURA SELECIONADA NA FERMENTAÇÃO EM ESCALA PILOTO	50
3.8.1 Isolamento, purificação e preservação das leveduras da última batelada fermentativa feita em escala piloto.....	51

3.8.2	Análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial (Mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLPmtDNA).....	51
3.8.2.1	Extração do DNA	51
3.8.2.2	Digestão enzimática do DNA mitocondrial	52
3.9	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS DOS INÓCULOS SELECIONADO, COMERCIAL E SELVAGEM.....	53
3.9.1	Parâmetros fermentativos	55
3.9.1.1	Coleta das amostras da fermentação	55
3.9.1.2	Procedimentos analíticos das amostras por CLAE	56
3.9.1.3	Cálculo do Rendimento da Fermentação.....	57
3.9.1.4	Cálculo da Eficiência da Fermentação.....	57
3.9.1.5	Cálculo da Produtividade da Fermentação	58
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	59
4.1	PRODUÇÃO DE CACHAÇA COM LEVEDURA SELECIONADA.....	59
4.1.1	Produção de cachaça em escala piloto.....	61
4.1.2	Produção de cachaça em escala de alambique.....	70
4.2	ANÁLISE QUÍMICA DA CACHAÇA DE ALAMBIQUE PRODUZIDA EM ESCALA PILOTO E DE ALAMBIQUE	72
4.3	OCORRÊNCIA MOLECULAR DA LEVEDURA SELECIONADA NA ÚLTIMA BATELADA FERMENTATIVA EM ESCALA PILOTO.....	87
4.4	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS DOS INÓCULOS (SELECIONADO, COMERCIAL E SELVAGEM)	89
4.4.1	Avaliação da multiplicação e da fermentação dos inóculos testados.....	89
4.4.2	Cálculos dos parâmetros fermentativos	93
4.5	CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS SOBRE A PRODUÇÃO DE CACHAÇA UTILIZANDO LEVEDURA SELECIONADA.....	97
5	CONCLUSÕES	100
	REFERÊNCIAS.....	101
	ANEXOS	115

1 INTRODUÇÃO

Um dos produtos que mais caracteriza a cultura brasileira, a cachaça começou a ser fabricada no Brasil no século XVI, juntamente com a produção açucareira, sendo a primeira bebida destilada do país (LEÃO, 2004). Conforme a definição legal, a cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 % a 48 % em volume a 20°C e com características sensoriais peculiares (BRASIL, 2009a).

A cachaça de alambique é produzida exclusivamente do caldo de cana-de-açúcar nos chamados engenhos, e destilada em alambiques, que é, na verdade, a estrutura de cobre onde é feita a destilação. Basicamente, a produção da cachaça de alambique consiste em multiplicar o inóculo, extrair o caldo da cana-de-açúcar na operação de moagem, convertê-lo em vinho pelo processo de fermentação e transformar o vinho em cachaça por meio da destilação (Maia, 2002).

No processo de produção da cachaça de alambique, em geral, a fermentação do caldo de cana é espontânea, onde os micro-organismos presentes no caldo de cana e nos equipamentos e utensílios das áreas de produção são os responsáveis pelo processo.

A cachaça é constituída principalmente de álcool e água e de outros componentes, formados em pequenas quantidades durante o processo de fermentação, destilação e envelhecimento, os quais recebem a denominação de produtos secundários. Estes compostos pertencem às seguintes classes: ácidos orgânicos, aldeídos, ésteres, alcoóis superiores, furfural, dentre outros (CARDOSO, 2013b).

Diante disso, a cachaça deve seguir os padrões de identidade e qualidade estabelecidos pela Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2005a). Esta legislação, além de diferenciar cachaça de aguardente, estabelece os teores máximos (em mg / 100 mL de álcool anidro) permitidos dos componentes voláteis (ácido acético, acetato de etila, acetaldeído, furfural, hidroximetilfurfural e alcoóis superiores), bem como o máximo de contaminantes orgânicos (álcool metílico, carbamato de etila, acroleína, álcool sec-butílico e álcool n-butílico) e de contaminantes inorgânicos (cobre, chumbo e arsênio). Os padrões estabelecidos com os seus respectivos

limites têm a finalidade de moderar a influência de cada um desses componentes na proteção à saúde pública e no padrão de qualidade da bebida, não significando, portanto, que a bebida que ali se enquadre possa ser considerada um produto de qualidade sensorial superior (MIRANDA et al., 2007).

As leveduras e as condições de fermentação são apontadas como alguns dos fatores que influenciam no sabor das bebidas alcoólicas, pois a maioria dos compostos secundários responsáveis pela qualidade química e sensorial da bebida é formada durante a fermentação (OLIVEIRA et al., 2005; DATO et al. 2005; GOMES, 2006).

A diversidade de micro-organismos envolvidos no processo de fermentação espontânea para a produção da cachaça de alambique pode ocasionar oscilações na qualidade e com isso acarretar a falta de padronização na qualidade da bebida produzida ao longo da safra. O uso de levedura selecionada como inóculo inicial na etapa de fermentação da bebida, apresenta inúmeras vantagens, como permite minimizar as contaminações indesejáveis, reduz o tempo de fermentação, aumenta o rendimento alcoólico e o produto final será uniforme e de melhor qualidade.

Assim, a utilização de linhagens selecionadas de *S. cerevisiae* como iniciadoras do processo de fermentação possibilitará a indicação de leveduras apropriadas ao processo de produção de cachaça com características químicas desejáveis à bebida e com potencial para serem utilizadas em escala de alambique. Além de permitir a manutenção e padronização da qualidade da bebida produzida, bem como possibilitar o desenvolvimento biotecnológico do processo produtivo da bebida e, conseqüentemente, agregar valor à cachaça de alambique e proporcionar um maior incremento financeiro ao produtor.

O presente trabalho dá continuidade ao projeto de pesquisa intitulado “Boas Práticas de Fabricação, seleção de leveduras e uso de fermento selecionado para a produção de cachaça artesanal na Bahia”, aprovado no Edital de Apoio à Tecnologias Sociais e Ambientais da FAPESB/2009, Termo de Outorga n. TSC0001/2009, e que com este novo enfoque trará benefícios diretos ao setor produtivo da cachaça de alambique no estado da Bahia.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Produzir e avaliar a composição química de cachaças produzidas por linhagens selecionadas de *S. cerevisiae*, isoladas de alambiques no estado da Bahia.

1.1.2 Objetivos específicos

I – Produzir cachaça em escala piloto e de alambique, utilizando-se cepas de leveduras previamente selecionadas pelo nosso grupo de pesquisa (Microorganismo e Biotecnologia/UESC; Diversidade e Biotecnologia de Microrganismos/UEFS, cadastrados no CNPQ) para a fermentação do mosto do caldo de cana-de-açúcar.

II – Avaliar os compostos químicos das cachaças produzidas pela linhagem de levedura selecionada, conforme os padrões de identidade e qualidade estabelecidos pela Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005, do MAPA.

III – Confirmar a presença, permanência e dominância da levedura selecionada no final do processo de fermentação em escala piloto.

IV – Apontar leveduras que produzam cachaças com boas características químicas para a produção de cachaça de alambique.

V – Avaliar o rendimento, a eficiência e a produtividade de três bateladas fermentativas realizadas pelos inóculos selecionado, comercial e selvagem.

VI – Gerar novos conhecimentos e tecnologias para a melhoria da produção da cachaça de alambique.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA CACHAÇA DE ALAMBIQUE

A cachaça de alambique corresponde a um produto que é produzido em menor volume em relação à aguardente industrial, sendo obtida em alambiques de cobre a partir da destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar, sem adição de açúcar, corante ou qualquer outro ingrediente (OLIVEIRA, 2004).

A cachaça produzida nos alambiques utiliza cana despalhada e cortada manualmente, moída, geralmente, inteira em um ou dois conjuntos de moenda, sendo o caldo puro resultante colocado a fermentar em dornas, fermentação essa conseguida na maioria das vezes, através do fermento natural que acompanha a cana vinda da lavoura. O vinho (mosto fermentado) é finalmente destilado em alambiques de cobre resultando no destilado, a cachaça (MARTINO, 1998).

De acordo com Cardoso (2013a), no processo onde a produção é em alambique, as cachaças são processadas, na maioria das vezes, de forma mais artesanal, geralmente operada por pequenos produtores, de base familiar e com recursos mais modestos, com processo de fermentação espontânea e destiladas em alambiques de cobre.

A cachaça produzida em alambiques de cobre tem grande procura pelo sabor mais suave que propicia, visto que o cobre favorece a qualidade da bebida, atuando como catalisador de importantes reações que ocorrem durante a destilação (LIMA et al., 2006).

A produção de cachaça em alambiques consiste em um processo que busca preservar a qualidade sensorial do produto final e, por isso, a cachaça de alambique é considerada um produto de maior qualidade sensorial pelos apreciadores da bebida, quando comparada com a aguardente industrial (SEBRAE, 2001). Segundo Cardoso (2013b), a cachaça é muito apreciada por seu sabor e aroma característicos, que são decorrentes dos processos de fermentação, destilação e envelhecimento em tonéis de madeira, tornando-se necessário consolidar esses fatores para que haja aumento do consumo dessa bebida.

Na produção de cachaça de alambique, feita em pequena escala, o processo de destilação é realizado em alambiques de cobre, onde ocorre à separação do destilado em três diferentes frações através do processo denominado “corte”. A

primeira fração a ser recolhida é chamada de “cabeça”, cuja separação remove o excesso de compostos mais voláteis e/ou mais solúveis em etanol do que em água. A segunda fração é o “coração”, parte nobre do destilado, a qual é utilizada para fins comerciais. A última fração, a “cauda”, contém o excesso de compostos menos voláteis que o etanol e mais solúveis em água do que em etanol, como o ácido acético e o hidroximetilfurfural (SERAFIM et al., 2012).

O Governo Federal, através do Decreto n. 6.871, de 04 de junho de 2009, considera a cachaça uma bebida genuinamente brasileira desencadeando, com isso, um processo de valorização da bebida com o objetivo de estimular o aumento de produção e a melhoria de qualidade visando à ampliação do mercado externo. Conforme a legislação, a cachaça corresponde a uma bebida típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 % a 48 % e com características sensoriais peculiares (BRASIL, 2009a).

A cachaça representa um produto de importância econômica crescente, de grande aceitação no mercado nacional e internacional (PEREIRA et al., 2003). Esta bebida alcoólica foi elevada ao posto de bebida nobre, símbolo nacional, e terceiro destilado mais consumido no mundo, atrás apenas da vodca e do soju (bebida asiática à base de sorgo) (GARBIN, BOGUSZ JUNIOR e MONTANO, 2005).

Segundo dados do Instituto Brasileiro da Cachaça (IBRAC) o Brasil possui uma capacidade instalada de produção de cachaça de aproximadamente 1,2 bilhões de litros, tendo mais de 40 mil produtores e cerca de quatro mil marcas de cachaças (IBRAC, 2013). Em termos de consumo, a cachaça ocupa a segunda posição da bebida alcoólica mais apreciada pelos brasileiros, perdendo somente para a cerveja (SALES, 2013; LIMA et al., 2009).

Apesar da tradição e importância econômica da cachaça, a cadeia produtiva da bebida no país não é tecnologicamente homogênea, necessitando de uma busca no desenvolvimento de tecnologias para aprimorar e controlar a qualidade e a padronização da bebida, para que seja aceita no mercado externo, assim como aumentar sua aceitação no mercado interno (MIRANDA et al., 2007; MIRANDA, 2005).

Diante das novas perspectivas de mercado, os produtores de cachaça estão procurando adotar medidas e maneiras que visem à fixação de melhores práticas no seu processamento, ou seja, uma revisão e aprimoramento das suas técnicas de produção, visando à valorização do produto (OLIVEIRA et al., 2005). A necessidade

de um produto competitivo e que atenda às novas exigências do mercado tem atraído investimentos para o setor de cachaça, buscando estimular a qualidade e a elitização do consumo (DANTAS et al., 2007).

2.2 TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DA CACHAÇA DE ALAMBIQUE

A qualidade na produção da cachaça de alambique começa na escolha da variedade de cana-de-açúcar, visto que, é uma tecnologia importante no processamento da bebida. Corresponde a um fator capaz de proporcionar aumentos significativos na produtividade agrícola e industrial, sem aumento de custos de produção (RODRIGUES FILHO e OLIVEIRA, 1999).

A variedade de cana-de-açúcar é a base que sustenta todas as demais tecnologias de produção e processamento da matéria-prima, por isso, sua escolha deve ser preferencialmente orientada por especialista da área, haja vista as inúmeras particularidades relativas ao manejo delas (SILVEIRA, BARBOSA e OLIVEIRA, 2002).

De acordo com Sales (2013), as características desejáveis das variedades de cana destinada à produção de cachaça são: alta produtividade em colmo e sacarose, rápido desenvolvimento inicial, bom fechamento das entrelinhas, boa brotação, colmos com diâmetro médio e uniforme, despalha espontânea ou fácil, resistência a tombamento e teor de fibra baixo.

Uma vez escolhida à variedade adequada de cana-de-açúcar e realizada a colheita da cana, o processo de produção da cachaça de alambique segue para a obtenção do caldo da cana-de-açúcar pelo esmagamento da cana nas moendas, que permite dividir o colmo da cana em duas frações: o caldo e o bagaço (rico em fibras). Após a moagem, ocorre a filtração e a decantação do caldo da cana, com o objetivo de retirar as impurezas presentes na cana (terra, pedras, folhas e capim) e o bagacilho, decorrente do esmagamento da cana pelas moendas, visto que tais impurezas afetam de forma significativa o processo de fermentação (RODRIGUES FILHO e OLIVEIRA, 1999).

Antes de se proceder à fermentação, faz-se necessário o ajuste do teor de açúcar do caldo (Brix), de forma a atingir o ponto ideal de fermentação, entre 15º e 16º Brix, através da adição de água potável ao caldo. O caldo muito rico em açúcar,

acima de 16 %, está sujeito a uma fermentação com atraso ou incompleta. O fermento encarregado de transformar o açúcar do caldo em álcool possui certo grau de tolerância em relação ao álcool. Como a quantidade de álcool produzida durante a fermentação depende da quantidade de açúcar da garapa, quando este for elevado, o teor de álcool no caldo fermentado aumenta, impedindo que as leveduras continuem a fermentação, mesmo havendo, ainda, açúcar para ser transformado em álcool etílico (OLIVEIRA et al., 2005).

Para que ocorra a fermentação, torna-se necessário introduzir no caldo de cana ajustado, uma quantidade de fermento também conhecida como inóculo, formando assim o mosto. O inóculo, também chamado de pé de cuba, corresponde um volume de suspensão de micro-organismos de concentração adequada capaz de garantir a fermentação de um dado volume de mosto (CARVALHO e SATO, 2001).

O processo de fermentação ocorre graças à ação de enzimas provenientes de certos microrganismos, tais como as leveduras, que transformam os açúcares presentes no mosto em etanol, gás carbônico, glicerina e outros produtos formados em quantidades menos relevantes, tais como ácidos carboxílicos, metanol, ésteres, aldeídos e álcoois superiores (PEREIRA et al., 2003).

A fermentação alcoólica pode ser considerada como a oxidação anaeróbica, parcial, da glicose, por ação de leveduras, com a produção final de álcool etílico e gás carbônico (anidrido carbônico ou CO_2), além de outros produtos secundários. É um processo de grande importância, através do qual é obtido todo o álcool industrial, e todas as bebidas alcoólicas, destiladas e não destiladas e, como produto secundário, o gás carbônico (LOPEZ, 2003).

O fermento pode ser preparado de diversas maneiras, conforme a experiência de cada produtor. Existem os fermentos naturais ou "caipiras", os selecionados e os prensados. Em quaisquer dos tipos, a base de fermentação são os microrganismos chamados leveduras, que transformam o açúcar em álcool. Dentre as leveduras, a *Saccharomyces cerevisiae* é a que mais se destaca pela capacidade de produção e tolerância à concentração de etanol (RODRIGUES FILHO e OLIVEIRA, 1999).

Na produção da cachaça de alambique o mais comum é a utilização do pé de cuba natural (caipira), onde cada produtor possui sua receita e seu método. Utiliza-se fubá fino, médio ou grosso. Usualmente, acrescentam-se caldo de limão e farelo de arroz. A fermentação dita "caipira", utilizada pelos produtores de cachaça de alambique, consiste em introduzir no caldo da cana agente nutriente (vitaminas e

sais minerais), como fubá, farelo de trigo, arroz, soja ou milho. O agente fermentativo (leveduras) é a microbiota natural existente, que acompanha a cana-de-açúcar desde a lavoura. Já o fermento prensado é um produto comercial contendo células da levedura *S. cerevisiae*, preparado para servir aos propósitos da panificação, em cujo processo também ocorre a fermentação alcoólica (PIRES, 2001). Por sua vez, o preparo de um pé de cuba com leveduras selecionadas consiste na propagação do inóculo a partir de uma cultura pura de laboratório, linhagens selecionadas de *S. cerevisiae*, promovendo sua multiplicação sucessiva em caldo de cana com teores crescentes de Brix, sendo este tipo de preparo de fermento o mais exigente em termos de instalação industrial e de controles (CARDOSO, 2006).

Segundo Santos (2013) o uso de cepas selecionadas de *S. cerevisiae* na produção de cachaça tem contribuído para o aumento da produtividade e melhorado a qualidade da bebida em muitos alambiques, bem como cepas selecionadas possuem maior tolerância ao etanol e a temperaturas mais elevadas, assim como resistência a altas concentrações de açúcar e também a capacidade de flocular, o que torna mais dinâmico o processo de separação do mosto e das cepas ao fim da fermentação.

A fermentação inicia-se logo após o caldo da cana-de-açúcar entrar em contato com o fermento. Consiste de três fases: fermentação inicial ou pré-fermentação; fermentação principal ou tumultuosa; fermentação final, lenta ou pós-fermentação. Na fermentação inicial, o mosto apresenta uma quantidade de oxigênio necessário para a multiplicação inicial das leveduras, nesta fase, na qual se observa somente o crescimento no número de células do micro-organismo, pequena elevação da temperatura e pequeno desprendimento de CO₂. A fermentação principal é iniciada quando o oxigênio do mosto termina, caracterizando-se pela diminuição da multiplicação celular das leveduras, que passam a produzir enzimas que atuam sobre os açúcares transformando-os em álcool e gás carbônico. Com o desprendimento de gás carbônico haverá formação de bolhas no mosto e também se observa um aroma característico, semelhante ao de maçã madura. A temperatura eleva-se rapidamente, ocorrerá uma queda do Brix, enquanto o teor de álcool e a acidez aumentam. Nesta fase, o mosto agita-se como em ebulição. Já na fermentação final, a formação de bolhas começa a diminuir e a temperatura cai vagarosamente, porém ainda com pequeno desprendimento de gás carbônico. Esta fase termina quando ocorre uma paralisação total do desprendimento de gás

carbônico (desaparecimento das bolhas) e o retorno da temperatura ambiente, com a estabilização do valor de Brix (teor de açúcar zerado) (CARDOSO, 2006; RODRIGUES FILHO e OLIVEIRA, 1999).

Terminado o processo de fermentação, ocorrerá a destilação do vinho (mosto fermentado), que consiste em separar e selecionar os produtos de acordo com as temperaturas de ebulição ou de mudança de fase do componente, para obtenção da bebida destilada, a cachaça. Durante este processo deve-se separar o destilado em frações para melhorar a qualidade da bebida. Esta separação é denominada de “corte”. A primeira fração, denominada de “cabeça”, contém a porção mais significativa de produtos secundários indesejáveis, como metanol, aldeídos e alcoóis superiores. A segunda fração é o “coração” e corresponde à cachaça. O corte do “coração” é realizado dependendo da graduação alcoólica que se deseja para a cachaça. A terceira e última fração, denomina-se “calda ou água fraca”, contém ácidos voláteis e parte dos alcoóis superiores (MIRANDA, 2005; RODRIGUES FILHO e OLIVEIRA, 1999).

Logo após a destilação, ou seja, na cachaça nova, as substâncias químicas que conferem o aroma e o sabor do produto de boa qualidade sensorial ainda não estão em equilíbrio satisfatório, não estando pronta para consumo. Nesta fase ela tem um gosto agressivo, amargo e seu buquê é irregular. Há necessidade de um período, variável de dois a três meses, de descanso para completar a sua qualidade sensorial. Antes de ser colocado no mercado, o produto deve ser armazenado em recipientes apropriados (de aço inoxidável ou madeira) em local fresco e bem protegido, evitando temperaturas altas (CARDOSO, 2006; DIAS, MAIA e NELSON, 1998).

No Brasil, o processo de envelhecimento de bebidas destiladas, constitui-se de uma etapa optativa, não sendo realizada de forma sistemática devido ao tempo requerido pelo processo e aos custos introduzidos pelo armazenamento da bebida em grandes tonéis por alguns anos (MIRANDA, 2005).

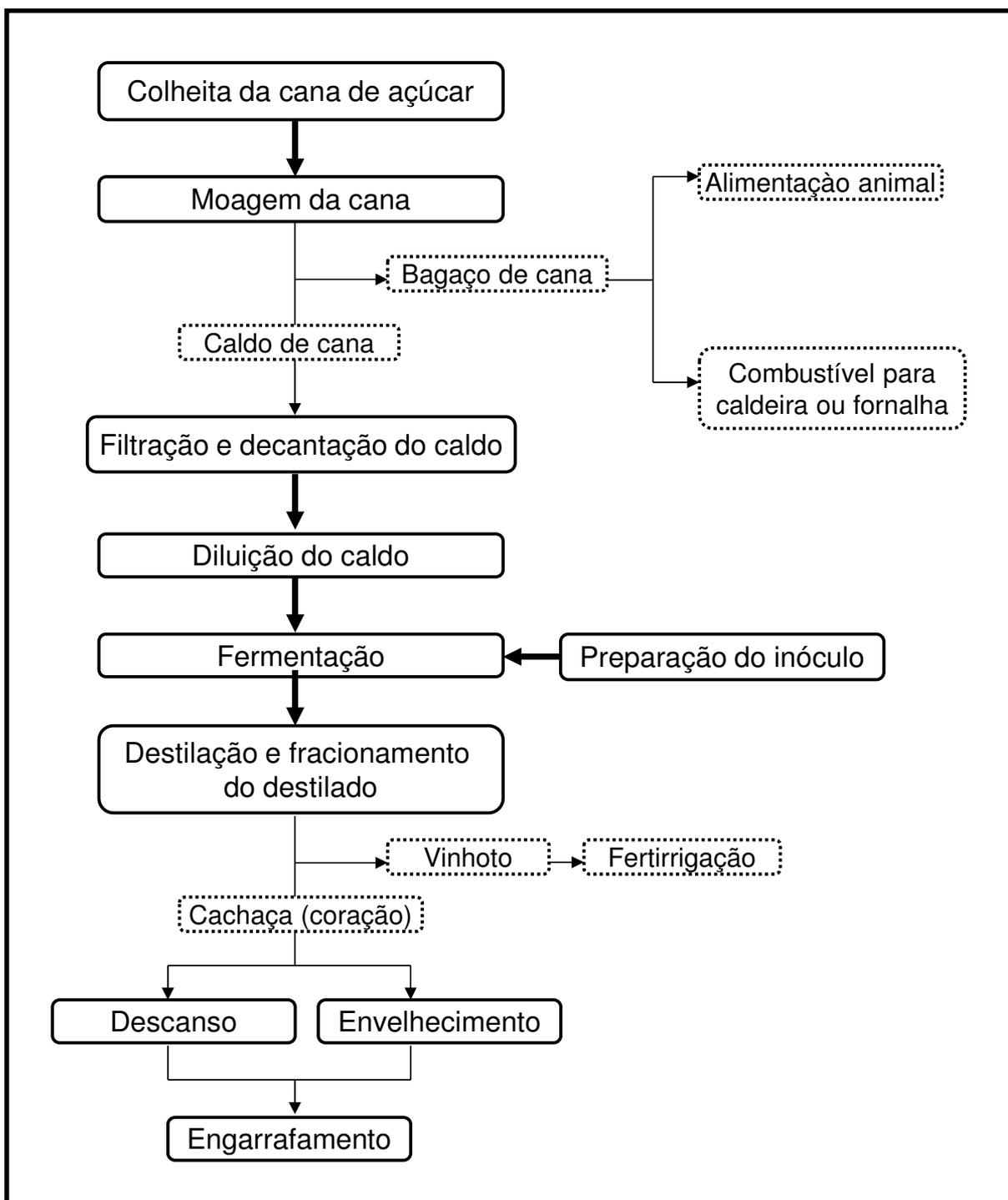
Por meio do envelhecimento em barris e/ou tonéis de madeira, podem-se corrigir eventuais defeitos da fermentação e da destilação, melhorando assim o paladar das bebidas destiladas (MORI et al., 2003). Dessa forma, o envelhecimento se torna fundamental para que a cachaça adquira as características desejadas pelos seus consumidores, pois ao longo deste período a bebida adquire os atributos necessários de cor, aroma e sabor típicos dos destilados de alta qualidade, gerando

os congêneres que agregam valores sensoriais e, conseqüentemente, econômicos aos destilados (AQUINO et al., 2006).

Durante o envelhecimento ocorrem inúmeras transformações, incluindo as reações entre os compostos secundários provenientes da destilação (alcoóis, hidrocarbonetos carbonilados superiores etc.) a extração direta de componentes da madeira (extrativos), a decomposição de algumas macromoléculas da madeira (lignina, celulose e hemicelulose) e sua incorporação à bebida e ainda as reações de compostos da madeira com os componentes originais do destilado (LIMA, MAIA e OLIVEIRA, 2005; MORI et al., 2003; LEÃO, 2006).

A Figura 1 mostra as etapas do processo de produção da cachaça de alambique descrito acima.

Figura 1 — Fluxograma do processo produtivo da cachaça de alambique.



Fonte: Elaborado pelo autor.

2.3 UTILIZAÇÃO DE LEVEDURAS SELECIONADAS

Vários fatores interferem na qualidade das bebidas alcoólicas destiladas como, a qualidade da matéria-prima, o tipo e o método de condução do processo

fermentativo, as práticas tecnológicas, as operações unitárias envolvidas no processamento, a destilação e o envelhecimento (ALCARDE, MONTEIRO e BELLUCO, 2012). No entanto, considerando que a maioria dos compostos responsáveis pelo aroma e sabor é formada durante a fermentação, as leveduras e as condições de fermentação são apontadas como os fatores que mais influenciam as características sensoriais da cachaça (PEREIRA, 2007).

A qualidade da bebida está fortemente relacionada com a ecologia dos tipos microbianos e suas populações durante os processos de fermentação e maturação, sendo determinantes tanto do rendimento em etanol como da formação e proporções relativas dos compostos secundários (PATARO et al., 2002). A diversidade de micro-organismos envolvidos no processo de fermentação espontânea para a produção da cachaça de alambique pode ocasionar oscilações na qualidade e com isso acarretar a falta de padronização na qualidade da bebida produzida ao longo da safra (BARBOSA, 2013). O uso de cultura pura como inóculo inicial na etapa de fermentação da bebida, apresenta inúmeras vantagens, como permite minimizar as contaminações indesejáveis, reduz o tempo de fermentação, aumenta o rendimento alcoólico e o produto final será uniforme e de melhor qualidade (CARDOSO, 2006).

Segundo Pereira (2007) com o progresso da tecnologia de fermentação alcoólica e da taxonomia das leveduras, foi possível verificar que a linhagem predominante é a que possui características mais adequadas de adaptação as diferentes condições do processo, tais como teor de açúcar do mosto, temperatura do mosto, acidez do vinho e teor de etanol no vinho. Alterando-se as condições do processo, será estabelecido um novo equilíbrio entre as linhagens de leveduras, podendo surgir outra linhagem dominante, assim, a inoculação de uma linhagem selecionada de uma determinada destilaria não garante sua permanência em outras destilarias (PEREIRA, 2007).

A padronização da qualidade da cachaça de alambique tem sido um problema para a profissionalização do setor. Cada safra é única e até dentro de uma mesma safra são frequentes as variações de sabor e/ou composição. A falta de controle da microbiota responsável pela fermentação é um dos fatores que levam às variações sensoriais entre as safras (STROPPIA et al., 2009). A seleção de linhagens iniciadoras que apresentam tolerância às variações ocorridas durante o processo fermentativo é uma alternativa para garantir uma alta produtividade e a manutenção

da qualidade do produto (STROPPA et. al, 2009; PATARO et al., 2002). As culturas iniciadoras dominam o processo, porque são adicionadas em altas concentrações, prevalecendo sobre a microbiota selvagem.

De acordo com Alcarde, Monteiro e Belluco (2012), a ocorrência de diferentes espécies e linhagens de leveduras selvagens, isto é, aquelas trazidas do campo com a própria cana, no processo fermentativo para produção de cachaça de alambique, podem interferir negativamente na qualidade do produto final. A utilização deste tipo de inóculo proporciona fermentações totalmente aleatórias, pois depende da quantidade e da qualidade dos microrganismos presentes no caldo.

A utilização de leveduras selecionadas na produção de cachaça de alambique acelera o início do processo fermentativo, diminui o risco de contaminação microbiológica, reduz a concentração de açúcares residuais, aumenta a produtividade do processo e melhora a padronização da fermentação, contribuindo para a qualidade da bebida (ALCARDE, MONTEIRO e BELLUCO, 2012). Além dessas vantagens, as linhagens selecionadas possuem maior tolerância às condições de estresse encontradas durante a fermentação, tais como: maior tolerância a elevadas concentrações de sacarose, altas temperaturas e concentrações elevadas de etanol, somada à sua capacidade de floculação (BARBOSA, 2013).

Assim, a utilização de linhagens selecionadas como iniciadoras do processo de fermentação e que preservem ao máximo as características químicas e sensoriais da bebida, irão permitir a manutenção e padronização da qualidade da bebida produzida, bem como possibilitar o desenvolvimento biotecnológico do processo produtivo da bebida e, conseqüentemente, agregar valor à cachaça de alambique e proporcionar um maior incremento financeiro ao produtor (CARDOSO, 2006).

A escolha do tipo de linhagem pode influenciar a eficiência e a qualidade do processo fermentativo, bem como a qualidade química e sensorial da bebida alcoólica produzida (SOARES, SILVA e SCHWAN, 2011). O uso de cepas selecionadas de *S. cerevisiae* na produção de cachaça tem contribuído para o aumento da produtividade e melhorado a qualidade da bebida em muitos alambiques (SOUSA, 2005). Barbosa (2013) comenta que o uso de leveduras selecionadas, notadamente da espécie *S. cerevisiae*, isoladas das próprias unidades de produção da bebida, é uma alternativa na tentativa de controlar eficientemente o

processo fermentativo da cachaça. Santos (2013) relata também que o uso de leveduras localmente selecionadas seja mais eficaz, já que estão mais bem adaptadas às condições ambientais da região e podem garantir o controle adequado da fermentação alcoólica e preservar os efeitos positivos das leveduras autóctones.

A levedura a ser utilizada no processo de fermentação deverá ter características específicas bem definidas, como alta velocidade de fermentação, osmotolerância, tolerância a etanol, habilidade para produzir altas concentrações de etanol, alta viabilidade celular para reciclagens repetidas, resistência a altas temperaturas e capacidade de produção de compostos aromáticos (ALENCAR et al., 2009).

Segundo Vicente (2007), o estabelecimento de parâmetros que levem à escolha de cepas que se adaptem às condições de produção e que contribuam para manter e melhorar a qualidade da cachaça é um tema ainda pouco explorado e merecedor de muitos estudos.

2.4 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS SECUNDÁRIOS DURANTE A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação espontânea da cachaça de alambique tem a característica de ser conduzida por uma diversidade de leveduras, com predominância de linhagens de *S. cerevisiae*. Durante a fermentação alcoólica, ocorre o desdobramento dos açúcares do caldo de cana com formação de dois produtos principais: álcool etílico e dióxido de carbono. Além desses, há, normalmente a formação de pequenas quantidades de outros componentes, os quais recebem a denominação de produtos secundários ou congêneres, tais como ácidos carboxílicos, metanol, ésteres, aldeídos e álcoois superiores, que podem influenciar positivamente ou negativamente a qualidade da bebida (LIMA et al., 2009; BOGUSZ JUNIOR et al., 2006; MASSON, 2005).

Os componentes químicos secundários são compostos orgânicos voláteis que conferem características sensoriais peculiares à cachaça, como o aroma e o sabor, onde a quantidade e a natureza química desses componentes dependem da matéria-prima, da fermentação, da destilação e do envelhecimento (MONTEIRO, 2010).

De acordo com Siebalde et al (2002), citado por Zacaroni et al. (2011), devido à complexidade da composição química da cachaça esta é dividida em fração orgânica e inorgânica. A primeira é constituída basicamente de alcoóis, aldeídos, ésteres, ácidos carboxílicos, cetonas, carbamato de etila e compostos sulfurados. Dependendo do teor e dos compostos presentes, a bebida pode ser classificada como desejável ou não, em relação à aceitação sensorial, ou em tóxica e não tóxica, em relação à saúde. A fração inorgânica é constituída principalmente por íons metálicos, tais como alumínio, cádmio, cálcio, chumbo, cobalto, cobre, cromo, ferro.

Os componentes secundários formados durante o processo de fermentação do mosto mudam de caráter químico e proporção durante a destilação, havendo uma posterior maturação do produto. Contudo, alguns compostos são indesejáveis à bebida devido, principalmente, as suas propriedades tóxicas que depreciam a qualidade do produto final (ZACARONI et al., 2011).

Segundo Dantas et al. (2007), uma boa Cachaça não deve possuir em sua composição teores não permitidos de substâncias que possam ser nocivas ao consumidor mesmo quando estas não prejudiquem as propriedades sensoriais da bebida (cor, aroma, sabor). Assim, a cachaça deve ser submetida a controles de qualidade físico-química e sensorial.

Durante o processo fermentativo ocorre a formação de vários ácidos, sendo o ácido acético, expresso em acidez volátil, o principal componente da fração ácida da cachaça (FRANÇA, SÁ E FIORINI, 2011). De acordo com França, Sá e Fiorini (2011), a acidez representa compostos solúveis em água e com elevado ponto de ebulição e que estão presente nas primeiras frações do destilado, na metade final do coração e na totalidade da fração da calda.

Uma cachaça com uma acidez elevada promove um sabor indesejável e agressivo prejudicando a qualidade da bebida. Essa alta acidez pode ser causada por fatores relacionados à contaminação do mosto por bactérias acéticas, que podem ocorrer desde a obtenção da matéria-prima, durante a estocagem da cana e após a moagem, e mesmo após a fermentação, quando a destilação do vinho não é realizada logo após o final do processo fermentativo (MOSER, 2012).

Durante a fermentação alcoólica, uma parte do etanol reage com o ácido acético formando o acetato de etila, da mesma forma outros alcoóis reagem com o ácido acético resultando em outros ésteres, os quais favorecem o aroma da bebida e cada éster tem um aroma peculiar (BORTOLETTO, 2013). Os ésteres constituem a

maior classe de compostos aromáticos nas bebidas alcoólicas e sua origem está no metabolismo secundário intracelular das leveduras durante a fermentação alcoólica (NASCIMENTO, 2007; CARDOSO, 2006; MIRANDA, 2005).

O principal éster encontrado na cachaça é o acetato de etila, que em baixas concentrações incorpora um aroma agradável de frutas à bebida, porém, em grandes quantidades confere à cachaça um sabor indesejável e enjoativo (MOSER, 2012).

Aldeídos com até oito átomos de carbono tem aromas penetrantes e enjoativos considerados indesejáveis em bebidas destiladas. Já os aldeídos com mais de dez átomos de carbono apresentam um aroma agradável (MIRANDA, 2005). O principal aldeído formado na fermentação alcoólica é o acetaldeído. São formados principalmente durante a fermentação, bem como pela oxidação do álcool etílico (MOSER, 2012).

Já os aldeídos como o furfural e o hidroximetilfurfural também podem aparecer na cachaça, mas sua presença não está associada ao processo de fermentação (BOSQUEIRO, 2010). Sua ocorrência está associada às condições de colheita, como a queima prévia da folhagem, da destilação quando ainda existem açúcares residuais e/ou resíduos de bagacilhos de cana e do envelhecimento por meio da ação de ácidos sobre pentoses e seus polímeros (hemiceluloses), que podem estar presentes nos recipientes de madeira utilizados no armazenamento da bebida (VIEIRA, 2011; ZACARONI et al., 2011).

Segundo Masson (2005), na queima do palhiço da cana-de-açúcar, a exsudação do açúcar torna-se um excelente aderente ao colmo de resíduos da combustão, de partículas sólidas de solo, minerais e outros. Ao ser processada a cana, esses resíduos são transferidos para o caldo e, em suspensão, vão para as dornas e posteriormente para o alambique, cuja matéria orgânica é transformada em furfural, chegando ao produto final.

Fernandes (2013) comenta que a presença de açúcares residuais, bem como o bagacilho no mosto, poderá formar compostos indesejáveis, catalisados pelo aumento da temperatura e pelo pH ácido do vinho, desidratando os açúcares e hidrolisando celulose, hemicelulose e pectina, como também outros polissacarídeos do bagacilho, seguido da desidratação dos monômeros de pentoses e hexoses, originando furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente.

A formação de furfural e de hidroximetilfurfural é evitada pela transferência do vinho limpo para a destilação, isento de açúcares residuais, e de bagacilhos, bem fermentado, bem filtrado, que reduz a formação de furfural e de hidroximetilfurfural no alambique e seu arraste para a bebida (VIEIRA, 2011; BOSQUEIRO, 2010).

De acordo com Bosqueiro (2010), os alcoóis superiores são aqueles que possuem mais de dois átomos de carbono, são formados durante o processo de fermentação, provenientes das reações de degradação de aminoácidos. Os alcoóis superiores, com até cinco átomos de carbono, apresentam odores característicos (buquê), tradicionalmente associados com bebidas destiladas. Além disso, o aroma modifica-se substancialmente e os alcoóis tornam-se oleosos e alguns lembram fortemente o aroma de flores. Esse excesso é chamado de óleo fúsel, que em teor elevado desvaloriza a cachaça e prejudica a qualidade da bebida. A formação de alcoóis superiores depende da cepa de levedura empregada e da ocorrência de micro-organismos contaminantes (CARDOSO, 2006; MIRANDA, 2005). Os principais álcoois superiores encontrados na cachaça são o álcool isoamílico (3 metil butanol-1), amílico (2 metil butanol-1), n-propílico (propanol-1) e isobutílico (2 metil propanol-1).

O metanol, álcool com um carbono apenas, é totalmente indesejável na bebida, devido a sua alta toxidez. Ele origina-se da degradação da pectina, um polissacarídeo presente na cana-de-açúcar, durante o processo de fermentação (ZACARONI et al., 2011). A molécula de pectina corresponde a um polímero formado pela associação de centenas de moléculas de ácido galacturônico, que possuem fragmentos de moléculas de metanol, as quais são liberadas durante a fermentação, através das reações de hidrólise ácida ou enzimática (BOSQUEIRO 2010; MONTEIRO, 2010).

A ocorrência de metanol no mosto pode estar associada à queima da cana no momento da colheita e a degradação de substâncias pécicas, especialmente quando o caldo de cana é acrescido de bagaços ou suco de frutas (CARDOSO, 2006). De acordo com Bortoletto (2013), na cachaça o metanol é formado pela degradação de bagacilhos da cana-de-açúcar, fibra que contém pectina, quando inicialmente não é separado do caldo por filtração. O referido autor ressalta também que normalmente o teor de álcool metílico em destilados de cana-de-açúcar é baixo devido ao conteúdo de pectina na cana ser baixo quando comparado ao de outras matérias-primas empregadas para a produção de bebidas destiladas.

Cardoso (2006) comenta também que em alambiques mal higienizados, pode ocorrer o acúmulo de bagacilho sobre as paredes da panela e da coluna do alambique e com o tempo, a degradação desse material pode acarretar a geração de metanol e sua transferência para a bebida. Dependendo da quantidade ingerida, o metanol pode causar intoxicação que se configura inicialmente por dor de cabeça, náusea, cegueira e até a morte (CARUSO, NAGATO e ALABURDA, 2010). O metanol possui ponto de ebulição inferior ao do etanol, e por isso se encontra com maior volume na fração cabeça do destilado (MONTEIRO, 2010).

O emprego de cobre na fabricação de alambiques corresponde a um aspecto que favorece a qualidade da cachaça de alambique, uma vez que o cobre atua como catalisador durante a destilação, eliminando odores desagradáveis, como os sulfetos (ABUJAMRA, 2009). A contaminação de cobre na cachaça de alambique ocorre devido à falta de higienização do alambique, principalmente durante as paradas longas da destilação e do término da produção, visto que, como o alambique, que normalmente é de cobre, entra em contato com o ar úmido, o qual oxida o cobre e forma-se então uma camada esverdeada de nome azinhavre, composta por carbonato básico de cobre, na superfície do metal (GONÇALVES, FIGUEIREDO e UETANABARO, 2012). Este carbonato é solubilizado pelos vapores ácidos produzidos durante a destilação, e por arraste, conduz à contaminação da bebida por íons de cobre. Por isso recomenda-se encher o alambique e as serpentinas com água para evitar a oxidação do cobre e contaminação da bebida pelo metal (MOSER, 2012; MONTEIRO, 2010).

De acordo com Gonçalves, Figueiredo e Uetanabaro (2012), o alambique deve ser obrigatoriamente limpo depois de toda alambicada para evitar que incrustações formadas nas paredes do alambique, possam produzir substâncias que prejudiquem a qualidade sensorial da cachaça, bem como impedir a ação catalítica do cobre, e, com isso, ocasionar problemas no *flavor* da bebida. Os autores comentam também que ao final da safra de produção da cachaça, o alambique deve ser totalmente desmontado e limpo com água potável acidificada. Assim que o alambique estiver limpo e seco, procede-se a sua montagem, enchendo-o a seguir, tanto o alambique quanto a serpentina, com água potável para evitar a oxidação do cobre e conseqüentemente a presença do azinhavre. Os autores destacam ainda que quando do início da nova safra, o alambique que ficou cheio de água na entressafra será esvaziado. Em seguida, deverá ser lavado com água potável

acidificada. Após este procedimento, encher o alambique com água potável até o limite de trabalho e realizar uma destilação com esta água. Assim serão eliminados os resíduos de cobre e dos materiais utilizados na limpeza.

Um outro contaminante encontrado em baixas concentrações em bebidas alcoólicas e alimentos fermentados é o carbamato de etila, também denominado de uretana ou etiluretana. O carbamato de etila é um éster etílico do ácido carbâmico que apresenta ponto de ebulição de 185°C e é muito solúvel em água e álcool (MOSER, 2012). O mecanismo de formação do carbamato de etila em bebidas alcoólicas ainda não está bem elucidado (ZACARONI et al., 2011; BOSQUEIRO, 2010; ABUJAMRA, 2009). Em bebidas destiladas o carbamato de etila pode ser formado pela reação entre o etanol e seus precursores nitrogenados, como a uréia, o fosfato de carbamila e o cianeto, sendo este último considerado um precursor de carbamato de etila durante e após o processo de destilação (ABUJAMRA, 2009). Além disso, os aminoácidos também são possíveis precursores do carbamato de etila, como no caso da arginina, cuja degradação pelas leveduras produz ornitina e uréia, sendo a ureia o principal precursor para a formação do carbamato de etila (PINHEIRO, 2010). A uréia pode ser produzida durante o processo fermentativo, devido ao metabolismo das leveduras ou ser adicionada, através da suplementação, à dorna de fermentação (PINHEIRO, 2010).

De acordo com Caruso, Nagato e Alaburda (2010), o carbamato de etila pode ser formado durante todas as etapas de produção das bebidas, pela reação do etanol com alguns compostos nitrogenados, como ureia, carbamil fosfatos, n-carbamil aminoácidos, cianetos, entre outros. Estes compostos são provenientes do próprio meio e como um resultado da atividade microbiológica durante a fermentação alcoólica.

O íon cianeto (CN^-) também é um precursor importante na formação de carbamato de etila em bebidas destiladas (MOSER, 2012; BOSQUEIRO, 2010; LELIS, 2006). Este íon é formado pela ação enzimática e clivagem térmica de glicosídeos cianogênicos (OLIVEIRA, 2012). A cana-de-açúcar, matéria-prima para a produção da cachaça, apresenta glicosídeos cianogênicos. Estes glicosídeos são degradados enzimaticamente, gerando açúcar e cianoidrina, que se decompõe a íons CN^- . Os íons cianetos na presença de cobre se oxidam a íons cianatos e estes reagem com o etanol para formar o carbamato de etila (MOSER, 2012; OLIVEIRA, 2012).

2.5 PADRÃO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DA CACHAÇA

O aperfeiçoamento tecnológico e o controle de qualidade do processo de produção da cachaça de alambique só são possíveis mediante o conhecimento da composição química e da qualidade sensorial da bebida (ALCARDE, SOUZA e BELLUCO, 2010). Devido ao elevado consumo de cachaça, controlar a qualidade desta bebida é uma questão de saúde pública, portanto, a presença de contaminantes deve ser avaliada (CARUSO, NAGATO e ALABURDA, 2010).

De acordo com Serafim et al. (2011), com o aumento da demanda por bebidas com elevado padrão de qualidade, a adoção de técnicas produtivas mais eficientes é o desafio a ser superado pelos produtores de cachaça, os quais devem dentre as etapas de produção da bebida, dar uma maior importância à fermentação do mosto e a posterior destilação do vinho para a obtenção de uma bebida com qualidades químicas e sensoriais superiores.

Com relação à legislação, vale destacar que a Portaria n. 276 de 24 de setembro de 2009, do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), aprova a revisão dos Requisitos de Avaliação da Conformidade para Cachaça, atendendo aos requisitos da Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005, do MAPA, bem como visando o aumento das exportações da bebida.

A partir da Instrução Normativa n. 13, de 29 de junho de 2005, do MAPA, foram fixados os padrões de identidade e qualidade da Cachaça. De acordo com esta instrução Normativa, a Cachaça é a denominação típica e exclusiva da Aguardente de Cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 % a 48 % em volume a 20°C, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g / L (seis gramas por litro), expressos em sacarose (BRASIL, 2005a).

Os padrões de identidade e qualidade, estabelecidos pela legislação, com seus respectivos limites têm a finalidade de padronizar a cachaça e proteger a saúde do consumidor. Essa padronização é essencial para que a bebida atenda aos padrões internacionais de qualidade e seja aceita pelo mercado externo, proporcionando condições de abertura e manutenção do mercado de exportação, além de proporcionar aceitação, no mercado interno, pelas classes de maior poder

aquisitivo, as quais exigem bebidas com maior controle de qualidade (SOUZA et al., 2009).

Fernandes (2013) relata que com o avanço tecnológico e a exigência do mercado consumidor, tanto nacional como internacional, o controle de qualidade em relação aos componentes químicos presentes na cachaça apresenta significativa importância. Segundo Cardoso (2013a), um importante instrumento de controle da qualidade da cachaça e de identificação de oportunidades de melhoria da qualidade química e sensorial é a análise química, onde para que se possa modificar as características e/ou controlar a qualidade de um produto é necessário que se conheça a composição química do produto final.

Conforme a legislação (BRASIL, 2005a), a cachaça deve apresentar os seguintes padrões de qualidade: o teor alcoólico deve ser de 38 % a 48 % v/v em álcool. O Coeficiente de Congêneres que é a soma de: acidez volátil (expressa em ácido acético), aldeídos (expressos em acetaldeído), ésteres totais (expressos em acetato de etila), álcoois superiores (expressos pela soma do álcool n-propílico, álcool isobutílico e álcoois isoamílicos) e furfural + hidroximetilfurfural não poderá ser inferior a 200 mg / 100 mL e não poderá ser superior a 650 mg / 100 mL de álcool anidro. Os teores máximos permitidos pela legislação das moléculas voláteis estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 — Teores máximos (em mg / 100 mL de álcool anidro) permitidos pela legislação brasileira das moléculas voláteis na cachaça.

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

Fonte: BRASIL (2005a).

Além disso, o máximo de contaminantes orgânicos e de contaminantes inorgânicos está apresentado na Tabela 2 e na Tabela 3 respectivamente.

Tabela 2 — Teores máximos de contaminantes orgânicos na cachaça permitidos pela legislação brasileira.

Álcool metílico (mg / 100 mL de álcool anidro)	20
Carbamato de etila (µg / L)	210
Acroleína (2-propenal) (mg / 100 mL de álcool anidro)	5
Álcool sec-butílico (2-butanol) (mg / 100 mL de álcool anidro)	10
Álcool n-butílico (1-butanol) (mg / 100 mL de álcool anidro)	3

Fonte: BRASIL (2014); BRASIL (2005a).

Tabela 3 — Teores máximos de contaminantes inorgânicos na cachaça permitidos pela legislação brasileira.

Cobre (Cu) (mg / L)	5
Chumbo (Pb) (µg / L)	200
Arsênio (As) (µg / L)	100

Fonte: BRASIL (2005a).

Fernandes (2013) comenta que a análise química da cachaça é realizada mais usualmente empregando técnicas cromatográficas, onde essas técnicas objetivam relacionar a qualidade do produto com a presença ou ausência de certas substâncias, verificando se a bebida atende aos padrões nacionais e internacionais. Além disso, tais técnicas podem ainda ser utilizadas como ferramenta balizadora para percepção de semelhanças ou diferenças que possam ser traduzidos por indicadores químicos e sensoriais que possivelmente indiquem a origem geográfica da cachaça.

Os padrões de qualidade estabelecidos para a cachaça têm a finalidade de moderar a influência de cada componente secundário nas características sensoriais da bebida (FRANÇA, SÁ e FIORINI, 2011). Segundo Miranda (2005), os padrões de identidade e qualidade e seus respectivos limites, estabelecidos para a cachaça, têm a finalidade de melhorar a influência de cada um dos componentes químicos na proteção da saúde pública e na qualidade da bebida, não significando, entretanto, que a cachaça que ali se enquadre possa ser considerada um produto de qualidade sensorial superior.

Cabe ressaltar sobre as Boas Práticas de Fabricação (BPF), que representam normas de procedimentos para atingir um determinado padrão de identidade e qualidade para produtos, processos e serviços (GONÇALVES, 2009), a importância

dos produtores de cachaça de alambique em buscar sempre o aprimoramento do processo produtivo da bebida, visando à melhoria e o aperfeiçoamento da qualidade na produção, os quais podem ser alcançados através da implantação e da manutenção das BPF. Para isso a Resolução nº 275, de 21 de outubro de 2002, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que dispõe sobre o “Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos”; a Portaria nº 368, de 04 de setembro de 1997, do MAPA que “Aprova o Regulamento Técnico sobre as condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores / Industrializadores de Alimentos”; e a Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997, da ANVISA que “Aprova o Regulamento Técnico sobre "Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos”, são importantes legislações que servem de parâmetros para melhoria das condições higiênico-sanitárias da produção e controle do processo de fabricação.

2.6 ANÁLISE MOLECULAR DE LEVEDURA SELECIONADA

O processo fermentativo para a produção de cachaça é realizado pela ação de leveduras, principalmente a *Saccharomyces cerevisiae*, que são responsáveis pelo desdobramento dos açúcares presentes no mosto, convertendo-os em etanol e gás carbônico (CARDOSO, 2006). De acordo Bernardi (2007), a melhoria da qualidade da cachaça e o aumento na eficiência do processo produtivo passam, necessariamente, pela seleção de uma ou mais leveduras apropriadas ao processo.

A identificação e a caracterização das leveduras apresentam grande importância para processos fermentativos de produção de cachaça, uma vez que durante a fermentação do caldo de cana-de-açúcar, a diversidade de leveduras presentes nas dornas durante a etapa fermentativa é um dos principais problemas para a manutenção e padronização da qualidade da cachaça (BARBOSA, 2013).

Devido a sucessão de espécies de leveduras presentes durante o processo de fermentação do caldo de cana para a produção de cachaça, existe a necessidade

de técnicas moleculares que acompanhem a presença de leveduras *S. cerevisiae* iniciadoras da fermentação para garantir agilidade, diminuir as contaminações, aumentar o rendimento, com vistas a melhorar a qualidade e a padronização da cachaça produzida (VICENTE, 2007).

As técnicas de identificação e classificação de leveduras mais empregadas são aquelas baseadas em características morfológicas e fisiológicas, denominadas técnicas tradicionais, as quais podem, algumas vezes, levar a uma classificação incorreta de espécies deste gênero, como a instabilidade na morfologia das colônias das linhagens de uma mesma espécie, os poucos resultados que se obtêm a partir da fisiologia para classificação e a possibilidade de mutação de um único gene alterando as características fisiológicas da linhagem. Por isso as técnicas de biologia molecular têm sido usadas como alternativa às técnicas tradicionais de identificação e caracterização de leveduras, visto que estas técnicas oferecem vantagens, como a identidade de linhagens por suas características genéticas e não por seu perfil fisiológico (BERNARDI, 2007).

Avanços na biologia molecular têm levado ao desenvolvimento de novas técnicas para caracterização, identificação e classificação de micro-organismos (RAMOS, 2009). As técnicas moleculares que têm sido aplicadas para a identificação de leveduras incluem eletroforese em gel de campo pulsado (Pulsed Field Gel electrophoresis - PFGE), análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial (Mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism -RFLPmtDNA), reação de polimerase em cadeia (Polymerase Chain Reaction -PCR), polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (Randomly Amplified polymorphic DNA - RAPD) e amplificação de sequências simples entre repetições de DNA (Inter Simple Sequence Repaeats - ISSR) (PATARO et al.,2000; GOMES et al., 2009; BADOTTI et al., 2009; SILVA, 2009; RAMOS, 2009).

De acordo com Ramos (2009), os métodos moleculares permitem uma distinção mais precisa entre as linhagens de *S. cerevisiae*, uma vez que a sistemática de leveduras baseada em critérios morfológicos, fisiológicos e bioquímicos provou ser inadequado para diferenciar cepas da mesma espécie. Por esta razão, técnicas moleculares que possibilitem a distinção da cepa da levedura inoculada das restantes da microbiota natural presentes no processo fermentativo têm sido utilizadas.

A análise de polimorfismo mediante a restrição do DNA mitocondrial tem sido amplamente utilizada como método para caracterização de linhagens de origem de processos fermentativos como do vinho, cerveja e cachaça (VEZINHET et al., 1990; ARAUJO et al., 2007; BADOTTI, 2009). O RFLPmtDNA é detectado através da capacidade das enzimas de restrição que clivam o DNA em posições específicas, gerando um número limitado de comparáveis fragmentos com diversos comprimentos (SILVA, 2009). Vicente (2007) relata que o polimorfismo do DNA-mitocondrial corresponde a uma técnica que tem obtido sucesso na diferenciação tanto de gênero quanto da espécie de *S. cerevisiae*, sendo um método simples e rápido que utilizando a digestão do DNA mitocondrial por enzimas de restrição, associado ao alto polimorfismo genético, tem sido usada para estudar a autenticidade de cepas comerciais de leveduras.

De acordo com Badotti et al. (2010) a análise do perfil de restrição do DNA mitocondrial (mtDNA-RFLP) tem sido apontada como uma técnica eficiente para caracterizar e diferenciar linhagens industriais de *S. cerevisiae*, onde tem-se mostrado útil para diferenciar linhagens isoladas de um mesmo mosto e para monitorar a persistência e prevalência de linhagens específicas durante todo o processo fermentativo, além de ser uma técnica rápida, fácil e de relativo baixo custo. Guerola (2006) comenta que esta técnica permite a análise de um maior número de cepas em menostempo e a considera ideal para ser utilizada na indústria por sua rapidez, segurança, economia e por não requerer material sofisticado, nem mão de obra especializada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LEVEDURAS UTILIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE CACHAÇA EM ESCALA PILOTO

As leveduras utilizadas no presente projeto para a produção da cachaça de alambique são provenientes de projetos de pesquisa anteriores (OLIVEIRA, 2009; SILVA, 2009; PINHEIRO, 2012) do nosso grupo de pesquisa (Micro-organismo e Biotecnologia/UESC; Diversidade e Biotecnologia de Microrganismos/UEFS, cadastrados no CNPQ).

Estas leveduras já se encontram identificadas bioquimicamente e molecularmente com *Saccharomyces cerevisiae* por Silva (2009), além de diferenciadas intra-especificamente quanto a tolerância ao etanol, osmotolerância, a termotolerância, a produção de H₂S, a capacidade de floculação e a fermentação em batelada por Pinheiro (2012).

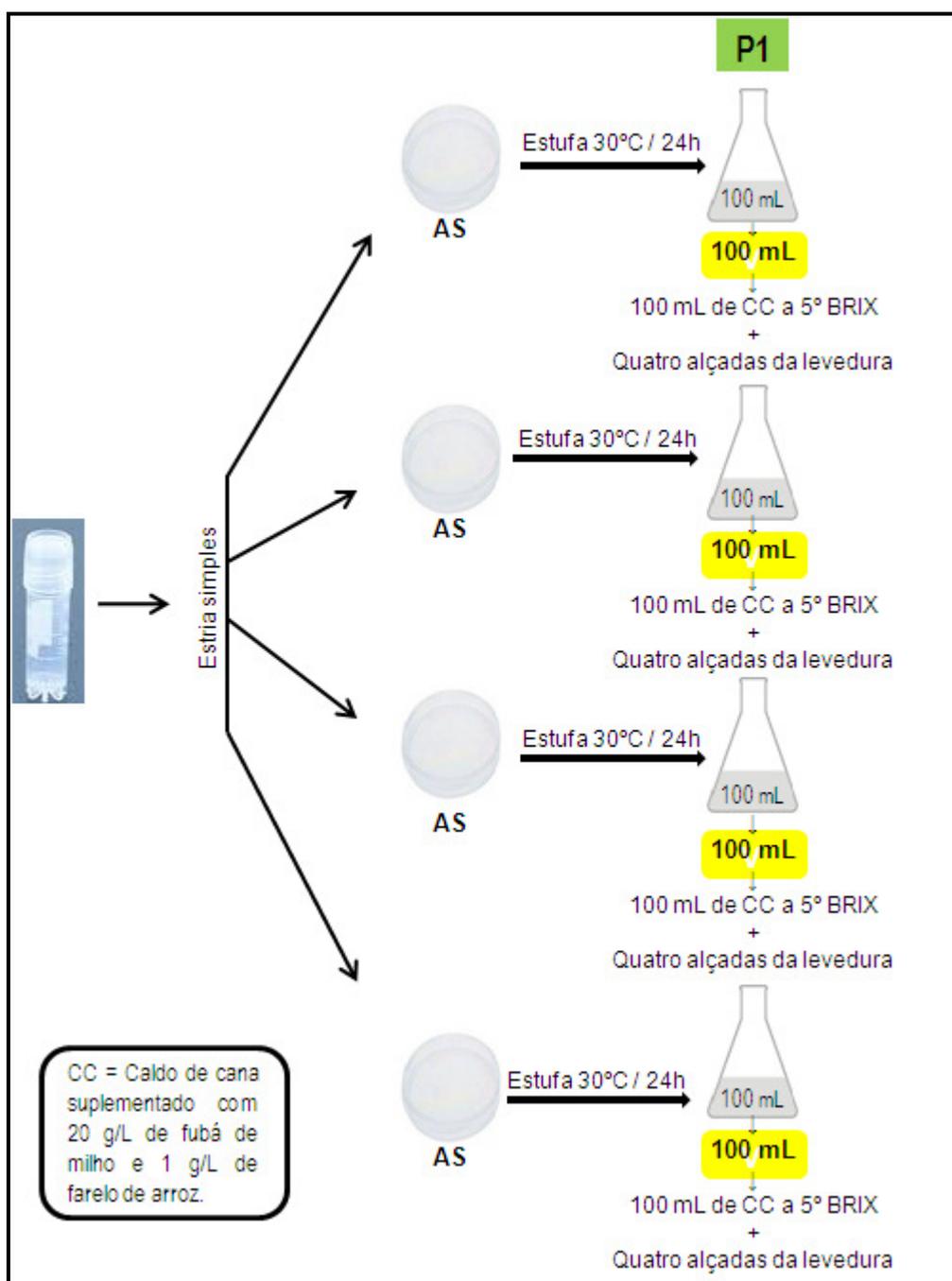
As leveduras utilizadas nesta pesquisa foram isoladas de fermentações em fábricas de cachaça de alambique, localizadas no estado da Bahia. Estas leveduras estão preservadas por criopreservação, em meio GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1% e de fosfato de sódio 0,2%) a 28°C, sob rotação (200 rpm), e após o período de 24 horas foram acrescido de 15% glicerol. Este material encontra-se congelado e mantido a -80°C no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

3.2 PREPARO DO INÓCULO DAS LEVEDURAS SELECIONADAS PARA A PRODUÇÃO DE CACHAÇA EM ESCALA PILOTO

As leveduras para a produção de cachaça foram reativadas através de estrias simples em quatro placas de Petri com ágar Sabouraud dextrose (g/L: 10 g de peptona, 40 g de dextrose, 15 g de ágar).e em seguida foram incubadas a 30°C durante 24 h. Após 24 h de crescimento foram transferidas quatro alçadas carregadas das culturas puras para quatro Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de caldo de cana estéril (121°C/15 min) a 5º Brix, suplementado com 2,0 g de fubá

de milho e 0,1 g de farelo de arroz, formando assim a primeira etapa da multiplicação (P1), conforme demonstrado na Figura 2.

Figura 2 — Procedimento de reativação das leveduras selecionadas para a produção de cachaça em escala piloto.



Cada erlenmeyer da etapa P1 recebeu quatro alçadas carregadas da cultura pura previamente crescida em placas de Petri de ágar Sabouraud dextrose.

A suplementação do caldo de cana utilizado para a multiplicação das leveduras e para a fermentação foi feita utilizando 20 g/L de fubá de milho e 1,0 g/L de farelo de arroz.

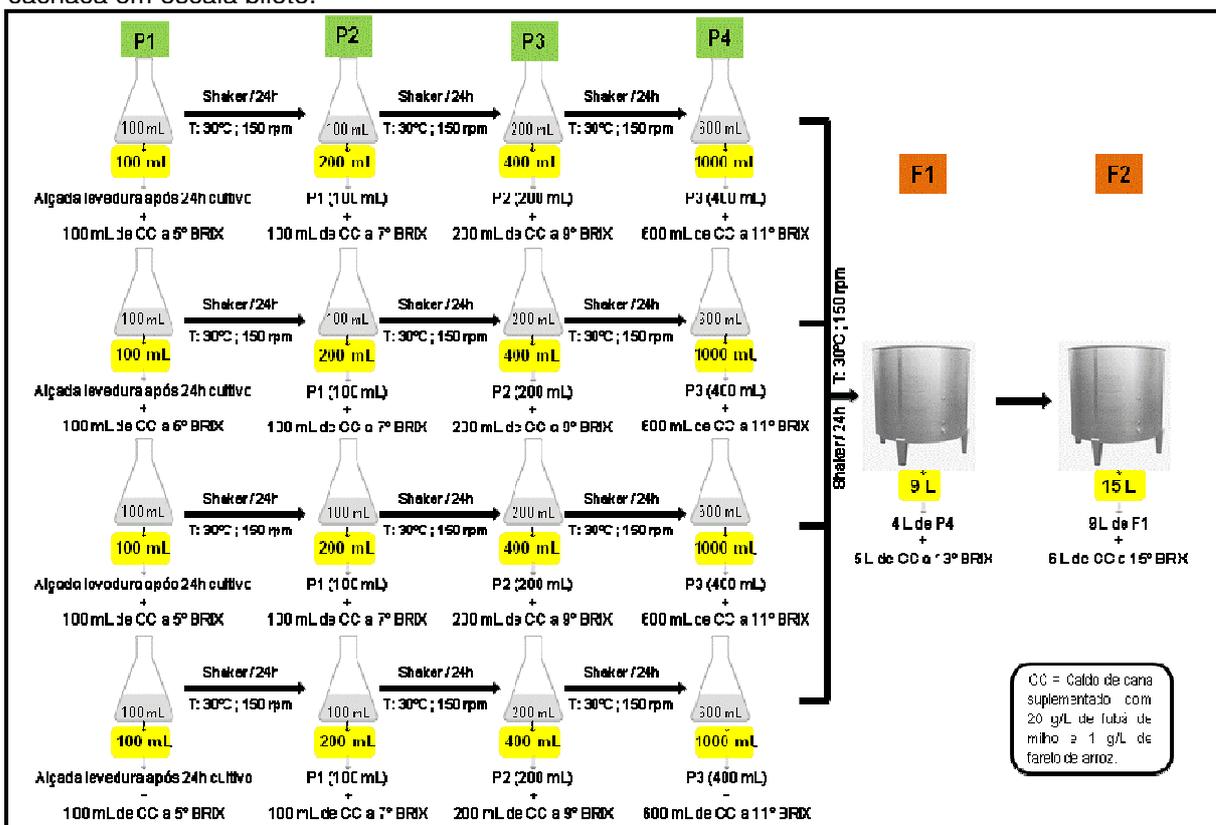
O procedimento de reativação, bem como de multiplicação das leveduras selecionadas, de fermentação e de destilação para a produção de cachaça em escala piloto foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Agroindústria da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Bahia.

3.3 PROCESSO DE MULTIPLICAÇÃO DAS LEVEDURAS SELECIONADAS PARA A PRODUÇÃO DE CACHAÇA EM ESCALA PILOTO

Após a inoculação das culturas puras em caldo de cana estéril a 5º Brix, etapa P1, as leveduras foram incubadas em agitador tipo *shaker* a 150 rpm, temperatura de 30°C, durante 24 h. Passadas às 24 h de crescimento da etapa P1 transferiu-se, assepticamente, os 100 mL, dos frascos de erlenmeyer de 250 mL para quatro erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de caldo de cana estéril a 7º Brix, suplementado com 2,0 g de fubá de milho e 0,1 g de farelo de arroz, que foi chamado de etapa P2. Foram repetidas as condições de incubação, temperatura e agitação da etapa P1, por 24h. Depois de 24h, transferiu-se, assepticamente, os 200 mL da etapa P2 para quatro erlenmeyer de 1000 mL contendo 200 mL de caldo de cana estéril a 9º Brix, suplementado com 4,0 g de fubá de milho e 0,2 g de farelo de arroz (etapa P3). As condições de incubação, temperatura e agitação foram as mesmas da etapa P1. Por fim, após 24 h de multiplicação da etapa P3 transferiu-se, assepticamente, o conteúdo, 400 mL, dos frascos de erlenmeyer de 1000 mL para quatro erlenmeyer de 2000 mL contendo 600 mL de caldo de cana estéril a 11º Brix, suplementado com 12 g de fubá de milho e 0,6 g de farelo de arroz, etapa P4, utilizando as mesmas condições citadas anteriormente.

Para um melhor entendimento da propagação das leveduras, na Figura 3 estão esquematizadas todas as quatro etapas (P1, P2, P3 e P4) de multiplicação das leveduras utilizadas para a produção de cachaça em escala piloto.

Figura 3 — Esquema de multiplicação das leveduras selecionadas utilizadas para a produção de cachaca em escala piloto.



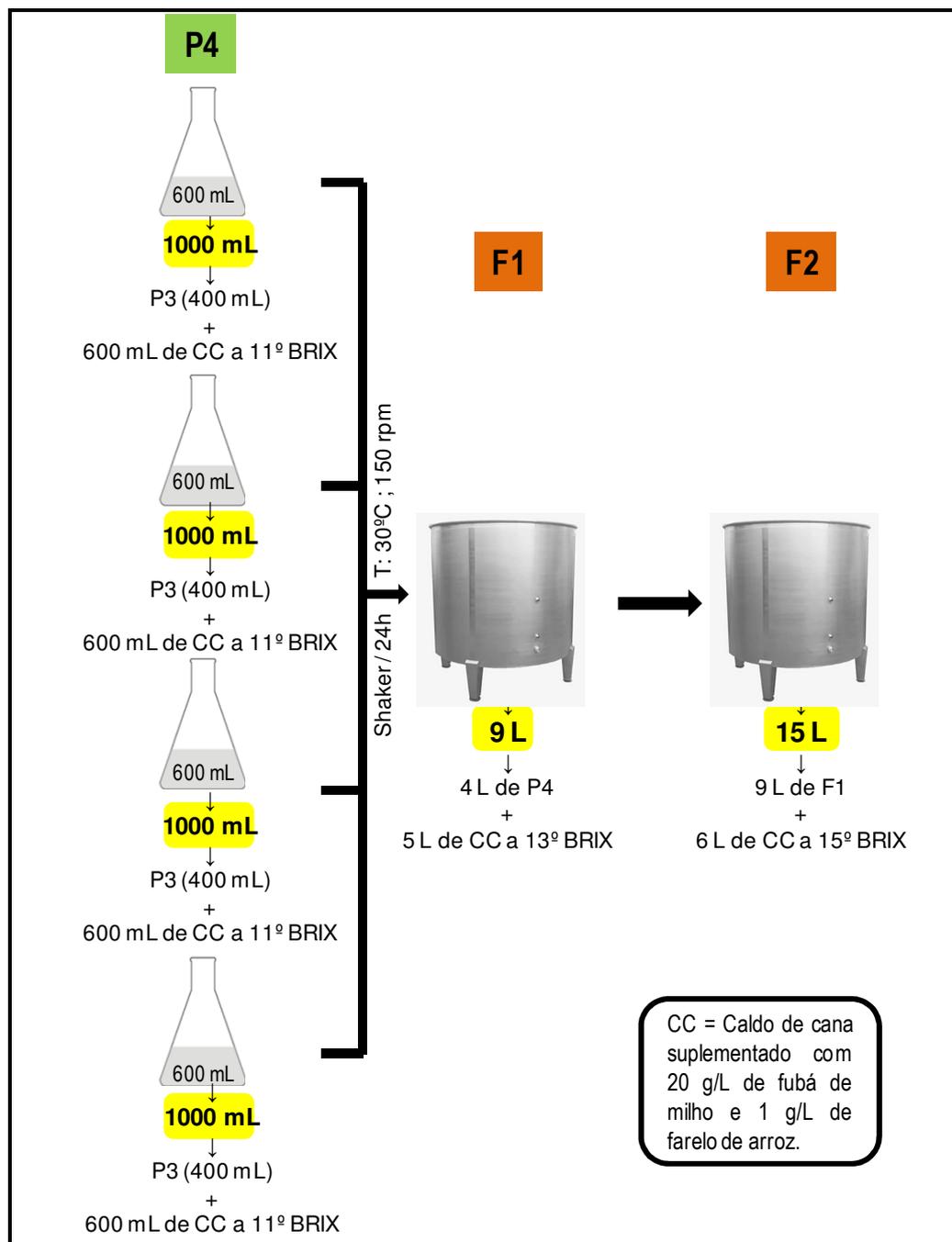
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4 PROCESSO DE FERMENTAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE CACHAÇA EM ESCALA PILOTO

Para o início da fermentação do caldo de cana em escala piloto, após as 24 h de multiplicação da etapa P4, o volume total final de 4 L, foi transferido para uma dorna de fermentação de aço inoxidável com capacidade de 30 L e depois foram adicionados 5 L de caldo de cana a 13° Brix, pasteurizado (70°C/15s, seguido de resfriamento a 30°C) e suplementado com 100 g de fubá de milho e 5,0 g de farelo de arroz. Esta primeira etapa da fermentação foi chamada de F1.

Após a mistura dos inóculos com o caldo de cana, a concentração inicial de açúcar foi medida, e deixou-se na etapa F1 por 24 h. Em seguida foram adicionados mais 6 L de caldo de cana a 15° Brix, pré-aquecido a 30°C previamente suplementado com 120 g de fubá de milho e 6 g de farelo de arroz, etapa F2 da fermentação, permanecendo nessa etapa até a concentração de açúcar zerar, conforme ilustrado na Figura 4.

Figura 4 — Procedimento de fermentação do caldo de cana pelas leveduras para a produção de cachaça em escala piloto.



Fonte: Elaborado pelo autor.

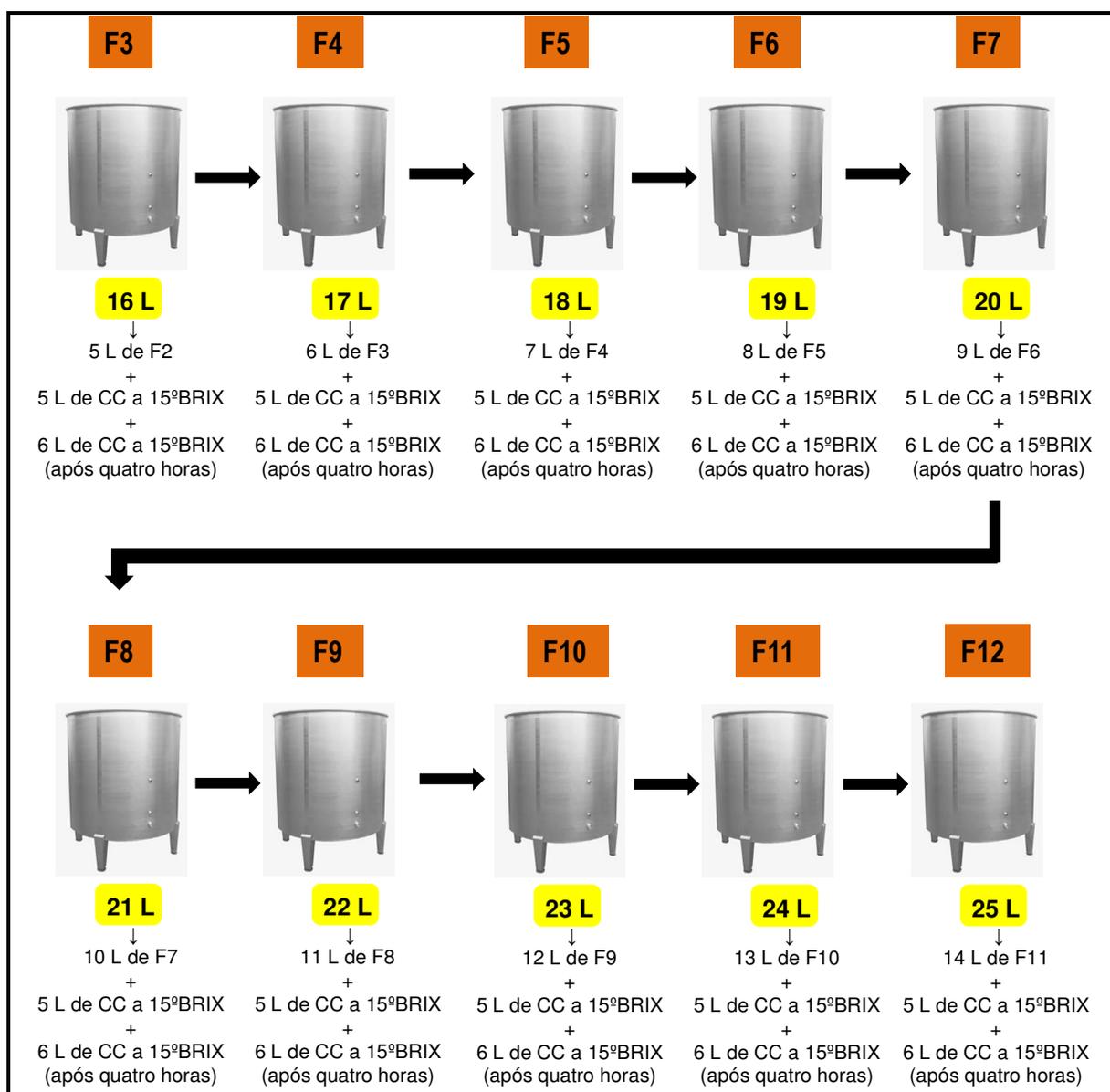
Zerado o teor de açúcar da etapa F2, o vinho foi encaminhado para a destilação em alambique de cobre.

Dando prosseguimento ao processo de fermentação foram adicionados na etapa F2 das leveduras testadas que conseguiram zerar o teor de açúcar, novas adições de 11 L de caldo de cana (CC) a 15° Brix, previamente aquecido a 30°C e

sem suplementação, sendo assim repetidos da etapa F3 até a F12 da fermentação (Figura 5).

Nessas novas adições de caldo de cana na etapa F2, adotou-se o procedimento de se adicionar primeiro 5 L de caldo de cana a 15º Brix e após 4 h foi adicionado o restante do caldo, 6 L, onde deixou-se fermentar até a concentração de açúcar zerar.

Figura 5 — Bateladas fermentativas realizadas na etapa F2 para dar continuidade ao processo de fermentação em escala piloto das cepas testadas que conseguiram zerar o teor de açúcar.



CC = Caldo de cana. Fonte: Elaborado pelo autor.

A concentração de açúcar durante o processo de fermentação foi medida com auxílio do sacarímetro.

3.5 PROCESSO DE DESTILAÇÃO EM ESCALA PILOTO

Uma vez zerado a concentração de açúcar das etapas de fermentação em escala piloto realizadas no laboratório, 10 L do vinho foram transferidos para o alambique de cobre com capacidade útil de 10 L para realizar o processo de destilação (Figura 6).

Figura 6 — Alambique de cobre utilizado para a destilação da cachaça produzida em escala piloto.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na destilação do vinho foi realizado o fracionamento da cachaça, onde adotou-se como referência o padrão de 5% do total destilado para a fração da “cabeça”, 80% do total destilado para a fração do “coração” e 15% do total destilado para a fração da “cauda”, conforme descrito por Cardoso (2006) e Rodrigues Filho e Oliveira (1999). A graduação alcoólica de 40% a 42% v/v de álcool etílico desejada para a cachaça, fração do coração, foi medida com auxílio do alcoômetro.

3.6 PRODUÇÃO DE CACHAÇA EM ESCALA DE ALAMBIQUE COM LEVEDURA SELECIONADA

Apenas as cepas de leveduras selecionadas que apresentaram os melhores resultados nas etapas de multiplicação das leveduras e de fermentação do caldo de cana em escala piloto passaram para a produção de cachaça em escala de alambique. Somente os melhores resultados seriam testados por uma questão de desempenho, possibilidade de uma maior resistência e predomínio durante a

multiplicação e a fermentação em uma escala de produção maior, bem como pensando na agilidade, no rendimento e na eficiência do processo produtivo da cachaça em escala de alambique.

Para a produção de cachaça em escala de alambique com as leveduras selecionadas, primeiramente foi feita a multiplicação das leveduras no Laboratório de Microbiologia da Agroindústria da UESC para a obtenção de um volume grande de inóculo, acima de 20 L, volume necessário para iniciar a propagação e produção da cachaça com levedura selecionada na fábrica de cachaça de alambique, parceira deste projeto, localizada no município de Ilhéus, Bahia. Esta fábrica possui dornas de fermentação com capacidade útil de 1.000 L e um volume de inóculo de 240 L.

O produtor de cachaça de alambique que gentilmente cedeu as instalações para a realização do procedimento experimental com as leveduras selecionadas tem uma capacidade instalada de produção diária de 1.000 L / dia, produzindo mais de 30 mil litros de cachaça por ano, destilados em alambique de cobre e envelhecidos em tonéis de madeira.

Na fábrica de cachaça de alambique, as etapas de multiplicação, de fermentação e de destilação foram realizadas seguindo os procedimentos rotineiramente utilizados para a produção de cachaça. Ao responsável técnico foram passadas as orientações técnicas sobre a importância da manutenção e do aprimoramento das condições higiênico-sanitárias na produção para o sucesso na multiplicação da levedura, bom desempenho do processo fermentativo e para a garantia da qualidade da bebida produzida (GONÇALVES, ROSA e UETANABARO, 2009).

A multiplicação das leveduras em laboratório seguiram inicialmente os mesmos procedimentos adotados nas etapas P1, P2, P3 e P4 de propagação para a produção de cachaça em escala piloto. A única diferença foi que em cada etapa da propagação foram utilizados 20 Erlenmeyers ao invés de quatro, para que no final da etapa P4 fosse obtido um volume inicial de inóculo de 20 L (caldo fermentado mais levedura).

A reativação das leveduras também seguiu os procedimentos experimentais iniciais adotados no preparo do inóculo para a produção de cachaça em escala piloto, diferindo apenas no fato de que as leveduras foram reativadas através de estrias simples em 20 placas de Petri com ágar sabouraud dextrose para a formação da primeira etapa da multiplicação (P1).

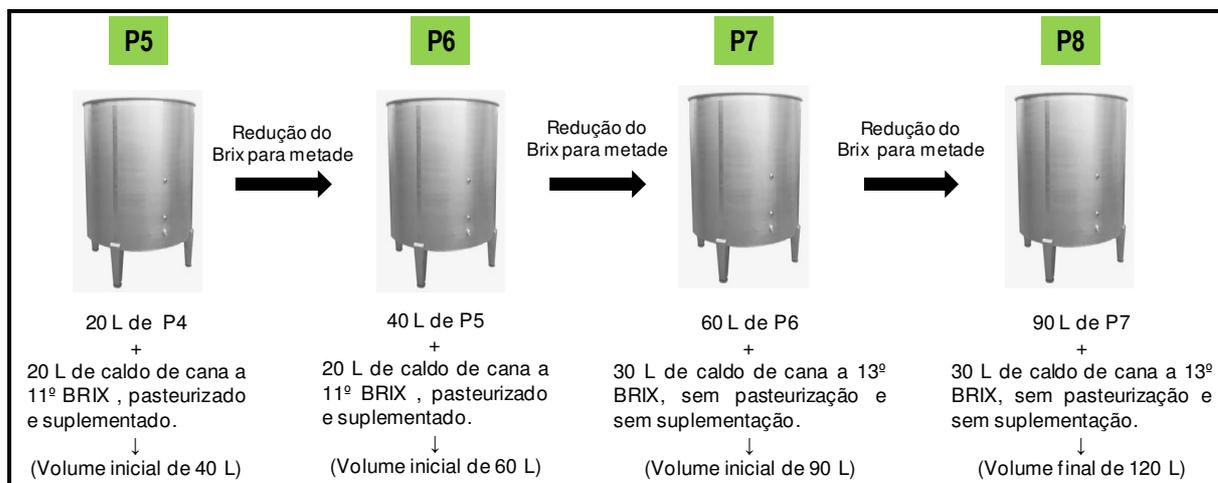
Visando aumentar o volume inicial de inóculo obtido na Etapa P4, para que fossem suficientes para iniciar a multiplicação e a fermentação na fábrica de cachaça, após as 24 h de multiplicação das leveduras na etapa P4, os 20 erlenmeyer de 2 L foram retirados da incubadora shaker e o conteúdo total, 20 L, foram transferidos para uma dorna de fermentação de aço inoxidável com capacidade de 150 L, seguido da adição de 20 L de caldo de cana a 11º Brix, pasteurizado e suplementado com 400 g de fubá de milho e 20 g de farelo de arroz, etapa P5.

A pasteurização do caldo de cana seguiu os mesmos procedimentos realizados na multiplicação da levedura em escala piloto, descritos anteriormente.

Após a mistura do inóculo com o caldo de cana, mediu-se a concentração de açúcar com auxílio de um sacarímetro, acompanhando o decaimento do teor de açúcar da mistura cair pela metade nessa etapa. Em seguida foram adicionados mais 20 L de caldo de cana a 11º Brix, pasteurizado e suplementado com 400 g de fubá de milho e 20 g de farelo de arroz, etapa P6. Quando o Brix estava na metade foram adicionados na etapa P6, 30 L de caldo de cana a 13º Brix, sem pasteurização e sem suplementação, apenas aquecido a 32ºC, formando assim a etapa P7.

Por fim, depois do Brix cair novamente para a metade foram adicionados na etapa P7 mais 30 L de caldo de cana a 13º Brix, sem pasteurização e sem suplementação, apenas aquecido a 32ºC, formando desta forma a etapa P8 com um volume final de 120 L de mosto contendo o inóculo, conforme demonstrado na Figura 7.

Figura 7 — Procedimento da multiplicação em laboratório da levedura utilizada para a produção de cachaça em escala de alambique.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após o Brix da etapa P8 atingir a metade, os 120 L de mosto da etapa P8 foram transferidos assepticamente da dorna de fermentação para sete garrafões vazios de água mineral de 20 L previamente higienizados com solução de hipoclorito de sódio a 200 ppm por 30 min. Estes foram transportados à temperatura ambiente em veículo tipo caminhoneta da UESC até a fábrica do produtor de cachaça de alambique para prosseguir o processo de multiplicação da levedura, realizar a fermentação do caldo e a destilação do vinho na fábrica de cachaça parceira.

Uma vez terminado todo o processo de produção da cachaça de alambique utilizando a cepa testada na fábrica de cachaça, foram recolhidos um total de 10 L do destilado para que fosse feita a análise química da bebida produzida.

3.7 ANÁLISES QUÍMICAS DAS CACHAÇAS PRODUZIDAS

As cachaças produzidas, fração coração, foram analisadas quimicamente, onde foram realizadas as seguintes análises químicas: Acidez volátil (expressa em ácido acético); Ésteres totais (expresso em acetato de etila); Aldeídos totais (expressos em acetaldeído); Furfural e hidroximetilfurfural; Alcoóis superiores (expressos pela soma do álcool n-propílico, álcool isobutílico e alcoóis isoamílicos); Álcool metílico; Carbamato de etila; Acroleína; Álcool sec-butílico; Álcool n-butílico; Cobre; Chumbo e Arsênio, conforme preconiza a Instrução Normativa n. 13 de 29 de

junho de 2005 do MAPA, que dispõe sobre o Regulamento Técnico para a fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para a Aguardente de Cana e Cachaça.

As análises químicas das cachaças produzidas pelas leveduras selecionadas foram realizadas no Laboratório de Análises de Agrotóxicos e Bebidas Alcoólicas (LABTOX), da Associação Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP), cujo citado laboratório está credenciado ao MAPA para realizar análises físico-químicas de bebidas e vinagres em amostras oriundas do controle oficial. Foram enviadas 500 mL das amostras de cachaça ao LABTOX do ITEP para a realização das análises químicas.

Por se tratar de laboratório credenciado, acreditado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), as análises realizadas no ITEP para os parâmetros químicos citados seguem metodologias oficiais descritas no Manual de Análises de Bebidas e Vinagres, do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2005b).

Na Tabela 4, esquematizada logo abaixo, estão descritos o tipo de determinação e a técnica que foram utilizados pelo LABTOX para as análises químicas das cachaças produzidas.

Tabela 4 — Tipo de determinação e a técnica utilizada para as análises químicas das cachaças produzidas em escala piloto e de alambique.

TIPO DE DETERMINAÇÃO	TÉCNICA UTILIZADA
Acidez volátil	Titulometria
Acetaldeído, acetado de etila, metanol e alcoóis superiores	Cromatografia Gasosa com detector de ionização de chama.
Carbamato de Etila	Cromatografia Gasosa acoplado a espectrômetro de massas.
Aldeídos totais	Cromatografia Gasosa com detector de ionização de chama.
Furfural	Cromatografia Gasosa com detector de ionização de chama.
Álcool metílico	Cromatografia Gasosa com detector de ionização de chama.
Acroleína	Cromatografia Gasosa com detector de ionização de chama.
Álcool sec-butílico	Cromatografia Gasosa com detector de ionização de chama.
Álcool n-butílico	Cromatografia Gasosa com detector de ionização de chama.
Arsênio	Espectrometria de absorção atômica com Forno de Grafite
Cobre	Espectrometria de absorção atômica com Forno de Grafite
Chumbo	Espectrometria de absorção atômica com Forno de Grafite

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.8 VERIFICAÇÃO MOLECULAR DA OCORRÊNCIA DA LEVEDURA SELECIONADA NA FERMENTAÇÃO EM ESCALA PILOTO

Visando verificar a ocorrência da levedura no processo de fermentação em escala piloto realizado em laboratório foram coletadas amostras das etapas das fermentações para uma posterior análise molecular. Assim, foram realizados os seguintes procedimentos para a coleta das amostras durante a fermentação do caldo: antes do caldo de cana ser adicionado na dorna que continha o inóculo da etapa F1 da fermentação, foi coletado, com auxílio de um tubo falcon estéril (como em todas as demais etapas descritas a seguir), 40 mL do caldo de cana puro, obtendo assim a amostra C1 da molecular. Após a adição do caldo de cana no inóculo da etapa F1 foi coletado 40 mL da mistura, obtendo a amostra C1M1 da molecular da etapa F1 da fermentação.

Depois da adição de caldo de cana na fermentação da etapa F2 foi coletado 40 mL da mistura, obtendo a amostra M2I da molecular da etapa F2 da fermentação. Quando o brix inicial da etapa F2 caiu pela metade foi coletado novamente 40 mL do mosto, obtendo a amostra M2M da molecular da etapa F2. Zerado o teor de Brix da etapa F2 e depois que o vinho foi retirado foi coletado do inóculo, obtendo a amostra M2F da molecular da etapa F2.

Na continuidade do processo de fermentação, com novas adições de caldo de cana, a coleta das amostras da molecular seguiu o procedimento de se coletar o início (I) (após adição do caldo de cana), o meio (M) (brix na metade) e o fim (F) da fermentação (após a retirada do vinho), conforme relatado anteriormente e realizado na etapa F2. Todas as amostras da molecular, imediatamente depois de serem coletadas, foram guardadas no ultrafreezer a -80 °C do Laboratório de Microbiologia da Agroindústria da UESC para depois ser feita a análise molecular das amostras selecionadas.

Para verificar a presença da levedura estudada na fermentação em escala piloto realizada em laboratório foi utilizada a análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial (Mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLPmtDNA), descrita a seguir.

3.8.1 Isolamento, purificação e preservação das leveduras da última batelada fermentativa feita em escala piloto

Para o isolamento das leveduras da amostra da verificação molecular coletada no tempo final da fermentação da última batelada fermentativa realizada em escala piloto no laboratório foram feitas diluições decimais seriadas, 10^{-1} a 10^{-8} , em tubos de ensaio contendo 9,0 mL de água peptonada 0,1%, sendo retirada uma alíquota de 0,1 mL das diluições 10^{-4} até 10^{-6} para o plaqueamento em três placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose. Depois as placas foram incubadas na estufa a 30°C, sendo a contagem e a coleta dos morfotipos predominantes feita 36 h após a inoculação.

Transcorrido o período de inoculação, foram selecionadas 13 colônias dos morfotipos predominantes da amostra da molecular coletada no término da última batelada (F12F) da fermentação feita em escala piloto. Em seguida as leveduras foram purificadas utilizando o meio ágar sabouraud dextrose.

Para a criopreservação dos isolados, as culturas puras foram inoculadas em meio GYMP a 28°C, sob rotação (200 rpm), e após o período de 24 h foram acrescidas de 15% glicerol e mantidas em ultrafreezer a - 86°C, conforme Kirsop e Kurtzman (1988).

3.8.2 Análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial (Mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLPmtDNA)

3.8.2.1 Extração do DNA

A análise de restrição do DNA mitocondrial foi realizada conforme descrito por Querol e colaboradores (1992). Para a observação da pureza do material congelado, os isolados de leveduras das fermentações acompanhadas foram reativados através de estrias simples no meio de cultura ágar Sabouraud (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, peptona 1% e ágar 2%) e incubadas na estufa a 30°C por 24 h. Depois as células foram crescidas em 5mL de meio YPD (extrato de levedura 1%;

peptona 2% e glicose 1%) por 18 h e então centrifugadas a 3000 rpm por 15 min e suspensas em água ultrapura estéril. E, em seguida, centrifugada sob as mesmas condições citadas acima. O sedimento foi homogeneizado em 0,5 mL de uma solução da enzima lítica de *Rhizoctonia solani* (SIGMA), contendo 25 mg.mL⁻¹ de enzima em sorbitol 1M e EDTA 0,1M (pH 7,5).

A suspensão foi transferida para tubos de 1,5mL e incubadas a 45°C por 2 h com agitação a cada 30 min. Os esferoplastos obtidos foram centrifugados a 8000 rpm por 10 min a temperatura ambiente e suspensos em 0,5mL de solução de Tris HCl 50×10^{-3} mol.L⁻¹ e EDTA 20×10^{-3} mol.L⁻¹ (pH 7,4). Foram adicionados 13µL de SDS 10% e incubado à 65°C por 5 min. Após isso, 0,2mL de acetato de potássio 5M foram adicionados e os tubos foram mantidos em banho de gelo por 10 min. Novamente foram centrifugados a 14000 rpm durante 15 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubos novos e o DNA foi precipitado com o mesmo volume de isopropanol. A seguir, os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 10 min e centrifugados a 12000 rpm por 10 min. O DNA foi lavado com etanol 70% e, depois de seco, solubilizado em 20 µL de água ultra pura estéril e congelado até o uso.

3.8.2.2 Digestão enzimática do DNA mitocondrial

Para digestão enzimática do DNA mitocondrial foi utilizada a endonuclease *Hinf* I por ser a mais eficiente na diferenciação entre linhagens de *S. cerevisiae* (Querol et al., 1994). O DNA, 10 µL, foi adicionado a um mix contendo 1 µL enzima de restrição *Hinf* I (INVITROGEN) na concentração de 10 U µL⁻¹, 2 µL de tampão da enzima de restrição (INVITROGEN), 1 µL de inibidor de ribonuclease (INVITROGEN) a 20 mg.mL⁻¹ e 6 µL de água ultra pura estéril. Após a incubação por seis horas a 37°C, os fragmentos gerados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X (Tris-borato 40×10^{-3} mol.L⁻¹, EDTA 1×10^{-3} mol.L⁻¹, pH 8,2). O marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (INVITROGEN) foi utilizado com padrão de peso molecular. Após tratamento com brometo de etídio durante 30 min, os perfis de restrição do mtDNA gerados foram visualizados em transluminador e fotografados.

3.9 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS DOS INÓCULOS SELECIONADO, COMERCIAL E SELVAGEM

O processo de comparação das fermentações consistiu em realizar o esquema de multiplicação e de fermentação da levedura selecionada em escala piloto proposto nesta tese utilizando a levedura SC82, o inóculo comercial e o inóculo selvagem e com isso verificar o desempenho fermentativo dos referidos inóculos.

Assim, para a avaliação dos parâmetros fermentativos (rendimento, eficiência e produtividade) foram utilizados três inóculos: a linhagem selecionada de *Saccharomyces cerevisiae* SC82; o inóculo comercial, contendo células liofilizadas da levedura *S. cerevisiae*; e o inóculo selvagem que corresponde a microbiota do caldo de cana utilizado para a fermentação dos citados inóculos.

Para iniciar a comparação fermentativa foi realizada a reativação dos inóculos a serem testados, onde a levedura SC82 seguiu o mesmo procedimento adotado neste trabalho para o preparo do inóculo, conforme apresentado na Figura 2. Para o inóculo comercial foram transferidos assepticamente 10 g do conteúdo do sachê para 100 mL de caldo Sabouraud dextrose estéril e, em seguida, incubado a 30°C, 150 rpm, durante 24 h.

Após 24h de crescimento foi transferido uma alçada da cultura pura para uma placa de Petri estéril com ágar Sabouraud dextrose e depois foi incubado a 30 °C por 24 h. Após as 24 h de incubação foi transferida, através de estrias simples, uma alçada carregada da cultura pura para quatro placas de Petri com ágar Sabouraud dextrose e em seguida foram incubadas na estufa a 30°C por 24 h, conforme realizado neste trabalho para o preparo do inóculo selecionado e apresentado na Figura 2.

Já para o inóculo selvagem não foi necessária a reativação uma vez que as células de leveduras do citado inóculo correspondem a microbiota presente no caldo de cana. Assim, partiu-se para a primeira etapa da multiplicação (P1) em escala piloto, conforme apresentado na Figura 3, com a diferença de se utilizar em cada etapa de multiplicação, P1 até P4, caldo de cana não estéril aquecido a 30°C, bem como sem necessidade de inoculação de cultura pura em cada etapa da multiplicação.

A etapa de preparo do inóculo para a levedura SC82 e para o inóculo comercial foram realizadas de modo que as duas leveduras iniciassem a etapa P1 de multiplicação em escala piloto no mesmo dia e horário que iniciou-se a etapa P1 do inóculo selvagem, para que os três inóculos comessacem ao mesmo tempo as etapas P1 até P4 de multiplicação em escala piloto.

As etapas P1 até P4 de multiplicação da cepa SC82 e do inóculo comercial seguiram os mesmos procedimentos discriminados na Figura 3 para a multiplicação da levedura selecionada para a produção de cachaça em escala piloto.

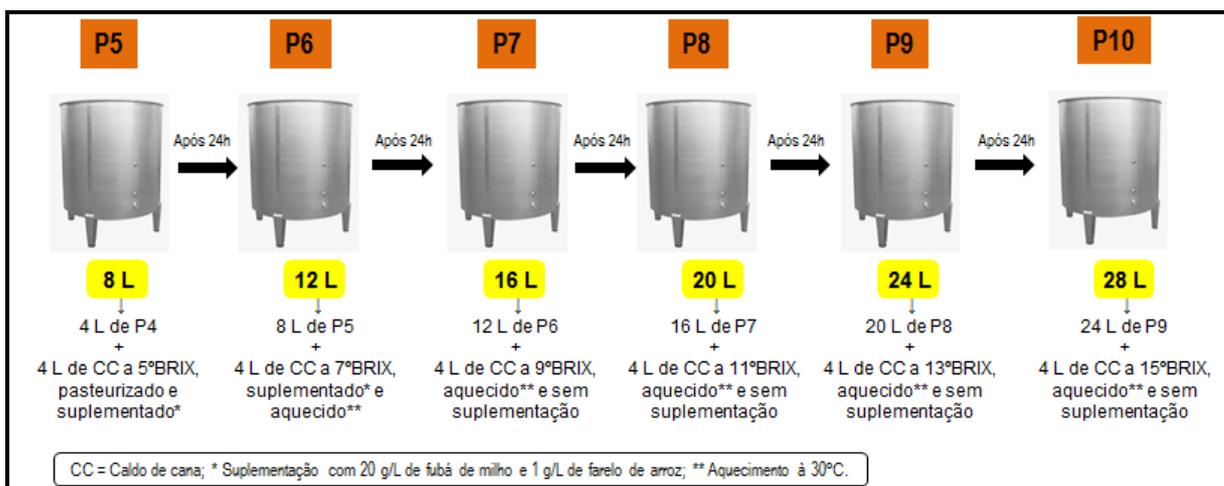
Após as 24 h de multiplicação da etapa P4, os quatro Erlenmeyer de capacidade de 2 L contendo 1 L de cada inóculo (selecionado, comercial e selvagem) foram retirados da incubadora tipo *shaker* e o conteúdo total 4 L de cada inóculo, foram transferidos para três dornas de fermentação de aço inoxidável com capacidade de 30 L.

Visando aumentar o volume de inóculo para facilitar o acompanhamento do processo fermentativo dos três inóculos testados foi feito um prolongamento da etapa de multiplicação em laboratório, incluindo-se as etapas P5 até P10, onde adotou-se o seguinte procedimento de multiplicação para os três inóculos testados: foram adicionados 4 L de caldo de cana a 5ºBrix, pasteurizado e suplementado com 80 g de fubá de milho e 4 g de farelo de arroz na etapa P4, formando assim a etapa P5. A pasteurização do caldo de cana foi realizada aquecendo-o até 70°C/15s e depois o resfriando até 30°C.

Após a mistura da etapa P4 com a etapa P5, mediu-se o Brix, e deixou-se na etapa P5 por 24 h. Em seguida foram adicionados à dorna mais 4 L de caldo de cana a 7ºBrix, pré-aquecido a 30°C (como em todas as demais etapas descritas a seguir) e suplementado com 80 g de fubá de milho e 4 g de farelo de arroz, etapa P6. Após 24 h foram acrescentados à dorna de fermentação mais 4 L de caldo de cana a 9ºBrix e sem suplementação, etapa P7.

Novamente, após as 24 h na etapa P7, foram adicionados à dorna mais 4 L de caldo de cana a 11ºBrix e sem suplementação, etapa P8. Transcorrido as 24 h de multiplicação da etapa P8, foram adicionados à dorna mais 4 L de caldo de cana a 13ºBrix e sem suplementação, etapa P9. Por fim, após as 24 h de multiplicação da etapa P9, foram adicionados mais 4 L de caldo de cana a 15ºBrix e sem suplementação, etapa P10, permanecendo nessa etapa até a concentração de açúcar zerar, conforme esquema apresentado na Figura 8.

Figura 8 — Esquema de propagação para o aumento do volume dos inóculos testados.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Zerado o teor de açúcar da etapa P10 dos três inóculos, foram retirados 20 L de vinho de cada dorna dos inóculos testados e em seguida foram feitas adições de 5 L de caldo de cana a 15°Brix e sem suplementação nas dornas de fermentação dos respectivos inóculos para dar início a avaliação dos parâmetros fermentativos de cada inóculo.

Para cada inóculo foram feitas três bateladas consecutivas de 5 L de caldo de cana a 15°Brix e sem suplementação na dorna de cada inóculo para a avaliação dos parâmetros fermentativos.

3.9.1 Parâmetros fermentativos

Na avaliação dos parâmetros fermentativos de cada inóculo testado foram determinados o rendimento, a eficiência e a produtividade do processo fermentativo, que são descritos a seguir.

3.9.1.1 Coleta das amostras da fermentação

Para a realização da avaliação dos parâmetros fermentativos foram coletados, a cada duas horas, com auxílio de uma pipeta volumétrica automática de 10 mL, da dorna de cada levedura, 1,5 mL do mosto e depois transferidos para três tubos de 2,0 mL estéreis. Em seguida esses tubos foram centrifugados a 13000 rpm

por três minutos e o sobrenadante transferido para tubos novos estéreis de 2,0 mL e depois armazenados a -86°C para posterior avaliação dos parâmetros fermentativos.

As coletas a cada duas horas para cada inóculo foram realizadas até o teor de Brix da fermentação, medido com auxílio de um sacarímetro, zerar. Foram utilizados três tubos de 2,0 mL estéreis, com 1,5 mL cada de mosto, para cada inóculo por tempo necessário da fermentação. O tempo inicial ou tempo zero (T0) foi considerado o momento que se acrescentou o caldo de cana na dorna de fermentação.

A análise dos açúcares totais consumidos e do etanol produzido das amostras da fermentação dos inóculos testados foi realizada no Laboratório de Biotecnologia de Micro-organismos da Universidade Estadual da Bahia (UNEB), campus Senhor do Bomfim, Bahia, Brasil. Foi utilizada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a quantificação dos açúcares totais consumidos e do etanol produzido nas amostras da fermentação dos inóculos testados.

3.9.1.2 Procedimentos analíticos das amostras por CLAE

Para a quantificação dos compostos (açúcares totais e etanol) da fermentação por CLAE, as amostras foram diluídas 20 vezes em água ultrapura e filtradas em membranas de difluoreto de polivinilideno, com poro de $0,45\ \mu\text{m}$ e diâmetro de 13 mm (Millex HV, Millipore). Curvas padrão foram construídas para os açúcares (sacarose, glicose, frutose) e para o álcool (etanol), diluídos em água ultrapura (*Direct Q3UV*, Millipore, Massachusetts, USA).

O equipamento utilizado foi *Ultimate 3000* (Dionex, Alemanha), equipado com detector de índice de refração para detecção de açúcares e do álcool (Sodhex RI-101, Showa Denko, Japão). Para o álcool utilizou-se a coluna de troca iônica *Rezex ROA Organic Acids*, $300 \times 7,8\ \text{mm}$ (Phenomenex, Torrance, CA, USA), mantida a 60°C , ácido sulfúrico $0,005\ \text{mol.L}^{-1}$ como fase móvel em um fluxo de $0,6\ \text{mL.min}^{-1}$. Os açúcares foram separados empregando-se a coluna *HPX-87C*, $300 \times 7,8\ \text{mm}$ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), mantida a 80°C , água ultrapura como fase móvel em um fluxo de $0,6\ \text{mL.min}^{-1}$.

Os cromatogramas foram integrados pelo software *Chromeleon Server monitor* (Dionex); a identificação realizada por comparação dos tempos de retenção e a quantificação de acordo com a curva padrão para cada analito.

3.9.1.3 Cálculo do Rendimento da Fermentação

O rendimento (R) ao final da fermentação foi determinado utilizando-se os valores do etanol produzido (g.L^{-1}) em relação aos açúcares consumidos (g.L^{-1}). O etanol produzido foi obtido da diferença da concentração final de etanol (C_f) (g.L^{-1}) pela concentração inicial de etanol (C_i) (g.L^{-1}). Já os açúcares consumidos foram calculados da diferença da concentração inicial (C_0) de açúcares (g.L^{-1}) pela concentração final (C_f) de açúcares (g.L^{-1}), conforme descrito na Equação 1.

$$R(\%) = \left(\frac{\text{Etanol produzido (g.L}^{-1}\text{)}}{\text{Açúcares consumidos (g.L}^{-1}\text{)}} \right) \times 100$$

(1)

3.9.1.4 Cálculo da Eficiência da Fermentação

A eficiência (E) da fermentação foi determinada pela relação entre o etanol produzido (g.L^{-1}) e o etanol teórico (g.L^{-1}), conforme apresentado na Equação 2.

$$E(\%) = \left(\frac{\text{Etanol produzido (g.L}^{-1}\text{)}}{\text{Etanol teórico (g.L}^{-1}\text{)}} \right) \times 100$$

(2)

O etanol teórico foi calculado a partir dos açúcares consumidos x 0,5111, conforme descrito por Bortolini, Santanna e Torres (2001).

3.9.1.5 Cálculo da Produtividade da Fermentação

O cálculo da produtividade (P) [g.(Lh)⁻¹] em relação ao etanol produzido ao final do tempo de fermentação foi calculada pela Equação 3.

$$P[\text{g} \cdot (\text{Lh})^{-1}] = \left(\frac{\text{Etanol produzido (g.L}^{-1}\text{)}}{\text{Tempo total de fermentação(h)}} \right) \quad (3)$$

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizada a estatística descritiva através de uso de tabelas e figuras para a apresentação, organização e análise dos dados obtidos nesta pesquisa para a comprovação dos objetivos abordados nesse estudo e discussão dos resultados. A comparação dos dados foi feita por meio da Análise Estatística Univariada (ANOVA) e do teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, para determinar diferença significativa entre as amostras

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 PRODUÇÃO DE CACHAÇA COM LEVEDURA SELECIONADA

Para a produção de cachaça em escala piloto utilizando leveduras selecionadas foram testadas 16 cepas de *Saccharomyces cerevisiae*: SC52, SC60, SC82, SC91, SC102, SC114, SC129, SC138, SC174, SC177, SC179, SC184, SC219, SC220, SC225 e SC229 (Anexo 1). Destas, apenas a cepa SC82 conseguiu prosseguir as etapas P1 a P4 do esquema de multiplicação em escala piloto (Figura 3) e em escala de alambique (Figura 6), bem como nas etapas do processo de fermentação em escala piloto (Figuras 4 e 5) e em escala de alambique para a produção de cachaça de alambique.

A cepa SC82 após sete dias da reativação, que se refere ao tempo esperado nesta pesquisa envolvendo o tempo de reativação, um dia, as etapas de multiplicação, quatro dias, e de fermentação e de produção de cachaça, dois dias, foi a única cepa que conseguiu avançar todos os estágios das etapas propostas no processo de multiplicação e de fermentação em escala piloto estabelecidas nesta pesquisa e produzir cachaça.

Já as outras cepas testadas passaram dos sete dias de processos esperados para a produção de cachaça e não conseguiram terminar a fermentação do caldo de cana. Mendes et al. (2013) relatam que os processos tradicionais de propagação de leveduras requerem entre 8 e 15 dias, chegando a 30 dias em alguns casos. Verificou-se que após 48 h de iniciado a etapa F2 da fermentação, essas cepas apresentaram uma fermentação lenta, com pouca movimentação e com diminuição da temperatura, cerca de 25 °C, e com isso o processo foi interrompido e a(s) cepa(s) descartada(s) já que tecnologicamente, uma velocidade de fermentação lenta não é de interesse pelos produtores de cachaça.

Os sete dias referidos nesta pesquisa para se obter cachaça em escala piloto no laboratório a partir de levedura selecionada foi estabelecido com base na sequência das etapas planejadas para o esquema de multiplicação e de fermentação do caldo de cana para a produção de cachaça de alambique em escala piloto. Este prazo também foi estabelecido neste trabalho como um parâmetro de indicação de boas leveduras iniciadores do processo fermentativo. Além deste prazo

de sete dias para a produção de cachaça em escala piloto foram observadas a capacidade da levedura conduzir a fermentação de forma adequada, com aroma agradável e um tempo para fermentar menor ou igual a 24h.

O fato de apenas uma levedura, dentre as 16 leveduras testadas, ter apresentado características aqui consideradas importantes para a produção da cachaça para ser utilizada como cultura iniciadora do processo fermentativo para a produção de cachaça de alambique, pode ser devido ao fato de que como a metodologia utilizada nesta pesquisa para a multiplicação das leveduras e consequente fermentação do caldo de cana em escala piloto, partiu do princípio de buscar desenvolver um método próximo ao conduzido pelos produtores de cachaça durante o processamento da bebida, isso pode ter influenciado no desempenho dos isolados que não obtiveram bons resultados, em virtude de apresentarem uma possível dificuldade de adaptação e competição com a microbiota presente no caldo de cana natural que foi adicionado nas etapas fermentativas.

A partir do momento que o inóculo deixou de ser conduzido nas condições assépticas e controladas de laboratório em termos de agitação e temperatura, a partir da etapa P4 da multiplicação e era encaminhado para a sala de processamento para iniciar a etapa de fermentação (F1), foram utilizadas técnicas e procedimentos de forma mais simplificada e acessível para que eles pudessem ser reproduzidos de maneira fácil pelos produtores de cachaça, principalmente os pequenos e os médios. Assim, foram adotados os seguintes procedimentos: na etapa F1 da fermentação mesmo o caldo de cana adicionado na dorna ainda não estar com o Brix ideal para a fermentação, que varia de 15 a 16ºBrix (CARDOSO, 2006), dependendo da escolha do produtor, bem como além de ainda estar na fase de multiplicação, a levedura era colocada em condições de fermentação, não sendo feita a aeração do mosto.

Outros procedimentos adotados foram a pasteurização do primeiro caldo de cana adicionado na dorna e a adição de volumes iguais de inóculo e de caldo de cana. Estas condições foram adotadas visando facilitar a adaptação da levedura e favorecer o rápido desenvolvimento e a capacidade de fermentar da cepa testada.

A pasteurização do caldo corresponde a um procedimento que facilmente pode ser realizado pelos produtores, já que basta apenas aquecer o caldo até 70ºC/15s, utilizando simples utensílios e equipamentos, como tachos e fogão, e depois resfriar a 32ºC para assim ser adicionado na dorna que contém o inóculo.

O objetivo destes procedimentos foi selecionar levedura(s) que tivesse(m) a capacidade de se adaptar de forma mais rápida a um novo meio não asséptico e não controlado em termos de temperatura e agitação simulando condições reais de alambique. Além disso, foi avaliada sua capacidade de multiplicação e de fermentação para a obtenção de altas produtividades pelos produtores.

O intuito foi selecionar leveduras capazes de resistir a condições de “estress” que seriam expostas em escala de alambique, encontradas em muitos estabelecimentos produtores de cachaça, como ausência de aeração na fase de multiplicação, falta de controle de temperatura na fermentação e na propagação da levedura, condições higiênico-sanitárias na produção regulares e a grande diversidade de micro-organismos encontrado na microbiota inicial do caldo de cana.

4.1.1 Produção de cachaça em escala piloto

Na produção de cachaça de alambique em escala piloto, a cepa SC82 apresentou sempre aroma agradável e tempo de fermentação menor que 24 h. Assim foi possível destilar o vinho obtido para obter a cachaça, permitindo assim que novas adições de caldo de cana fossem feitas para dar início a uma nova fermentação sequencial.

No final da etapa P4 da multiplicação a cepa SC82 apresentou um valor de 4ºBrix, enquanto que as outras cepas testadas apresentaram um valor entre 8º - 9ºBrix (Tabela 5). Este resultado demonstrou um bom desempenho inicial na etapa de multiplicação da cepa SC82 quando comparada com as demais testadas.

Tabela 5 — Teor de açúcar (ºBrix) do mosto obtido pelas leveduras testadas no final da Etapa P4 da multiplicação em escala piloto.

LEVEDURAS TESTADAS	ºBrix do mosto ao final da etapa P4
SC52	9
SC60	9
SC82	4
SC91	9
SC102	9
SC114	9
SC129	9
SC138	9
SC174	8
SC177	9

SC179	9
SC184	8,5
SC219	9
SC220	9
SC225	9
SC229	9

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tal fato já indicou grande relevância, visto que as etapas P1 a P4 da multiplicação eram realizadas de forma asséptica, de temperatura (28°C) e agitação (150 rpm), e com isso esperava-se que as leveduras ao final da etapa P4 apresentassem um crescimento parecido e satisfatório, obtendo-se um valor de Brix muito próximo entre elas. Entretanto, isso não foi observado (Tabela 5), e apenas a cepa SC82 conseguiu chegar no final da etapa P4 da multiplicação com um teor de açúcar de 4ºBrix. Já as outras cepas apresentaram valores entre 8 e 9ºBrix.

Cardoso (2006) comenta que a concentração adequada de nutrientes do mosto é de suma importância, pois se presentes em quantidades insuficientes ou exageradas, podem refletir de forma negativa sobre o processo fermentativo afetando o rendimento alcoólico e a velocidade e a multiplicação celular da levedura. Além disso, Mendes et al. (2013) comentam que a utilização de equipamentos específicos que permitam otimizar a propagação das leveduras corresponde a uma forma de maximizar a etapa de multiplicação do inóculo, na qual a eficiência da aeração é fator primordial para a predominância do metabolismo respiratório, que permite aumentar a reprodução das células. Entretanto, cabe lembrar que aeração não é uma prática comumente utilizada pelos produtores de cachaça de alambique.

Outro fator importante para a seleção da levedura que também foi considerado como indicação de um bom andamento da fase de multiplicação pelas leveduras testadas foi o Brix teórico final da etapa P4 da multiplicação.

O Brix teórico final da etapa P4 refere-se à mistura das etapas P1 até P4, sem inoculação da cepa, sem agitação e sem fermentação, apenas ocorrendo um aumento do volume de caldo de cana a um determinado ºBrix programado para cada etapa, onde no final da etapa P4, depois das misturas das etapas P1 até P4, o Brix teórico final da etapa P4, sem fermentação do caldo, encontrado seria de 9,6ºBrix. Diante disto era esperado que com a inoculação das cepas nas etapas da multiplicação e elas realizando o crescimento de forma satisfatória, com consumo de açúcar e oxigênio para o aumento da biomassa celular (CARDOSO, 2006), a

concentração de açúcar do mosto no final da etapa P4 da multiplicação deveria ser bem abaixo de 9,6ºBrix.

Isso ocorreu apenas para a cepa SC82 nas etapas P1 a P4 da multiplicação, já que a citada cepa chegou ao final da etapa P4 com um valor de 4ºBrix, menos da metade do valor do Brix teórico de 9,6º, demonstrando a princípio que esta levedura realizou seu metabolismo oxidativo de forma satisfatória nas referidas etapas de multiplicação em laboratório. Por sua vez, as outras cepas testadas apresentaram no final da etapa P4 um teor de açúcar entre 8 a 9ºBrix, muito próximo ao valor teórico (9,6ºBrix), o que demonstrou um desempenho com relação ao seu metabolismo oxidativo não satisfatório.

Outra característica que reforça o bom desempenho da cepa SC82, agora na etapa da fermentação, foi o fato de que a cepa SC82 foi capaz de zerar o Brix da etapa F1 (0,5ºBrix), depois de 24 h. Já as demais cepas, mesmo após 24 h de inoculação, não conseguiram reduzir o Brix de forma tão eficiente quanto esta cepa, reduzindo em apenas 1ºBrix (Tabela 6).

Tabela 6 — Teor de açúcar (ºBrix) do mosto obtido pelas leveduras testadas no final da Etapa F1 da fermentação em escala piloto.

LEVEDURAS TESTADAS	ºBrix do mosto ao final da etapa F1
SC52	10
SC60	10
SC82	0,5
SC91	10
SC102	10
SC114	10
SC129	10
SC138	10
SC174	9
SC177	10
SC179	10
SC184	10
SC219	10
SC220	10
SC225	10
SC229	10

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na etapa F1 da fermentação após a mistura da etapa P4 da multiplicação com os 5 L de caldo de cana a 13ºBrix (Figura 4) não foi feita a aeração desse mosto para que a levedura já iniciasse o metabolismo fermentativo como acontece

nos estabelecimentos produtores de cachaça de alambique, já que os mesmos não dispõem de recursos para realizar a aeração do mosto durante o preparo do inóculo e/ou ao receber um inóculo selecionado. Acreditamos que esta estratégia contribuiu para uma seleção prévia das leveduras aptas a suportar a condição de pouca aeração na etapa de preparo do inóculo.

A aeração da etapa F1 poderia até ser feita apenas nessa etapa, o que poderia ajudar de alguma forma na adaptação e um maior estabelecimento da levedura, já que a cepa era originária de um ambiente asséptico e controlado, passaria por um período de adaptação as novas condições impostas, bem como ainda não tinha se atingido o Brix normal do caldo para a fermentação. Portanto, essa restrição seletiva da aeração nessa etapa pode ter contribuído na seleção de leveduras com potencial para serem iniciadoras em uma fermentação de caldo de cana em condições de alambique para a produção de cachaça. A SC82 mostrou-se então resistente às condições não controladas de agitação e temperatura durante a multiplicação celular, realidade de muitos produtores de cachaça de alambique no Brasil.

A pasteurização do caldo de cana foi feita apenas na etapa F1 da fermentação. Na etapa F2 e em outras etapas da fermentação, caso a levedura tivesse um bom desempenho fermentativo, o caldo foi apenas aquecido a 32°C. Essa pasteurização inicial teve o objetivo de reduzir a contaminação do caldo de cana que foi adicionado à dorna junto com inóculo inicial e com isso facilitar a adaptação da levedura, permitindo um crescimento celular mais favorável à cepa inoculada. Segundo Martins (2013), em processos fermentativos, as células de leveduras são expostas a alterações ambientais, tais como nos níveis de nutrientes, temperatura, pH, concentração de etanol, concentração de O₂, e outras mudanças, com isso a sua capacidade de desenvolver respostas rápidas são importantes para que as mesmas possam sobreviver a tais mudanças, que muitas vezes geram estresses e podem comprometer suas funções celulares normais.

Mesmo não havendo aeração na etapa F1, etapa da fermentação propriamente dita, era esperado um melhor desempenho das demais leveduras testadas, uma vez que a quantidade de inóculo (4 L) da etapa P4 adicionado na dorna de 20 L da etapa F1 correspondia a 20% da dorna (GONÇALVES, ROSA e UETANABARO, 2009) para fermentar as adições de caldo de cana.

Além disso, na etapa F1, para todas as cepas testadas, foi adicionada apenas a metade do volume (5L) que o inóculo seria capaz de fermentar, o qual saindo das condições controladas e assépticas da etapa de multiplicação (P1 a P4) e ainda recebendo metade do volume de caldo de cana pasteurizado deveria ter apresentado uma melhor resposta fermentativa após 24 h de inoculação, o que não aconteceu.

Diante disto, supomos que a não resposta fermentativa, após 24 h de inoculação na etapa F1, por parte das outras leveduras testadas deve-se ao fato de se tratar de leveduras com crescimento mais lento que necessitariam de um período de adaptação ao novo meio mais demorado, bem como de um tempo de multiplicação maior.

Uma possível alteração no esquema de multiplicação das leveduras proposto nesta pesquisa para a produção de cachaça de alambique também pode ser levado em consideração como uma forma de se obter possíveis melhores resultados por parte das leveduras que não alcançaram bons resultados fermentativos, já que a metodologia básica de propagação de leveduras para a produção de cachaça, encontrada na literatura técnica e científica, permite muitos ajustes nos teores de Brix que serão utilizados na fase de multiplicação das leveduras e nos valores dos parâmetros de agitação e temperatura a serem utilizados (CARDOSO, 2006; PEREIRA, ROSA e FARIA, 2006), assim como, nos tipos de equipamentos usados na propagação (MENDES et al., 2013).

Mendes e colaboradores (2013) comentam que a aeração corresponde a um fator importante para a predominância do metabolismo respiratório da levedura, que permite maximizar a reprodução das células e minimizar a formação de etanol e com isso aumentar a biomassa celular. Por isso, os produtores de cachaça devem procurar ao máximo buscar e implementar meios e tecnologias que permitam realizar a aeração do mosto durante a fase de preparo do inóculo que será utilizado na fermentação para a produção de cachaça.

Tão importante também quanto à aeração na fase de multiplicação da levedura para o aumento da biomassa celular, são os cuidados com relação às condições higiênico-sanitárias durante todas as etapas do processo produtivo da cachaça, desde a colheita da cana até o produto final para a manutenção e a garantia da qualidade da bebida produzida (GONÇALVES, ROSA e UETANABARO, 2009). E ainda mais se tratando da etapa da multiplicação celular e da fermentação

do caldo que já exigem todo o cuidado higiênico para a condução adequada durante todo o metabolismo oxidativo e fermentativo da levedura, visando à obtenção de uma cachaça de qualidade (CARDOSO, 2006).

A cachaça requer conhecimentos científicos e tecnológicos apurados, uma vez que, a qualidade da bebida está relacionada a suas propriedades químicas e sensoriais, que, por sua vez, dependem da qualidade da matéria-prima, do mosto e do fermento utilizados, das condições e do tempo de fermentação, do sistema de destilação, do material de fabricação dos equipamentos e dos processos de envelhecimento, padronização e de engarrafamento da bebida (CALIARI et al., 2009).

Já na etapa F2 da fermentação a cepa SC82 zerou a concentração de açúcar ao final da etapa em 18 h. Demonstrando um bom desempenho na etapa fermentativa. Por sua vez, as outras leveduras testadas não conseguiram zerar o teor de açúcar da etapa F2 após 24 h, diminuindo o teor de açúcar entre 3º a 4ºBrix nesta etapa. Mesmo após 48 h em F2, não foi verificada melhoria no desempenho fermentativo das leveduras. Houve apenas uma redução de 2º a 3ºBrix (Tabela 8). Além disso, foi observado que a fermentação estava muito lenta, com pouca formação de espuma. Pereira et al. (2006) relatam que fermentações com tempo de duração maior que 30 h podem estar contaminadas com micro-organismos indesejáveis.

Tabela 7 — Teor de açúcar (ºBrix) do mosto obtido pelas leveduras testadas na Etapa F2 da fermentação em escala piloto.

LEVEDURAS TESTADAS	ºBRIX NO FINAL DA ETAPA F2	ºBRIX APÓS 48 HORAS DO FINAL DA ETAPA F2
SC52	8	5
SC60	8	5
SC82	0	-
SC91	9	7
SC102	9	7
SC114	9	7
SC129	9	7
SC138	9	7
SC174	7	4
SC177	9	7
SC179	9	7
SC184	9	6
SC219	9	7
SC220	9	7
SC225	9	7
SC229	9	7

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em virtude do bom desempenho fermentativo da cepa SC 82, após o término da etapa F2 da fermentação, foi dada continuidade ao processo de fermentação utilizando a cepa SC82, onde foram feitas novas adições de caldo de cana na dorna de fermentação da etapa F2, com o objetivo de aumentar o volume de cachaça produzida. Assim, foram feitas dez adições (F3 até F12) de 11 L de caldo de cana a 15ºBrix sem pasteurização e sem suplementação, apenas aquecido a 32ºC, na dorna da etapa F2 da fermentação que continha o inóculo formado pela cepa SC82.

As adições de caldo de cana na dorna foram feitas seguindo o procedimento de se colocar primeiro 5 L de caldo e depois de 4 h eram adicionados mais 6 L de caldo para completar o total de 11 L que seria o volume útil de adição de caldo adicionado na dorna para a fermentação (Figura 5). O procedimento foi realizado desta forma, a fim de proporcionar as condições reais da fermentação em uma fábrica de cachaça que utiliza o processo descontínuo alimentado, também conhecido como processo por batelada alimentada ou fermentação descontínua alimentada, onde a vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo e a adição de mosto pode ser de forma contínua ou intermitente (CARVALHO e SATO, 2001).

De acordo com Carvalho e Sato (2001) o controle da vazão de alimentação, num processo descontínuo alimentado previne a inibição por substratos, melhorando a produtividade e o rendimento do processo fermentativo. Desta forma, a batelada alimentada permite manter concentração celular constante e controlar velocidade de crescimento.

Ainda com relação às fermentações posteriores realizadas pela cepa SC82 percebeu-se que em todas as dez adições de caldo de cana que correspondem a dez bateladas de fermentações realizadas, a temperatura das fermentações permaneceu em aproximadamente 35ºC. O tempo médio fermentativo necessário para “zerar” o Brix do mosto e finalizar a fermentação do caldo por esta mesma cepa foi de 16 h (Tabela 8).

Tabela 8 — Tempo para zerar o teor de açúcar (Brix) das fermentações (F2 a F12) realizadas pela cepa SC82 em escala piloto para a produção de cachaça.

ETAPA DA FERMENTAÇÃO	TEMPO (h) PARA FERMENTAR
F2	18
F3	18
F4	14
F5	14
F6	14
F7	14
F8	14
F9	16
F10	16
F11	14
F12	15
MÉDIA FERMENTATIVA (h)	16

Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma vez “zerado” a concentração de açúcar das etapas das novas fermentações realizadas (F3 a F12) foram necessárias cerca de 3 h para a decantação total das células de leveduras, para assim realizar o esgotamento do vinho para a destilação. Ao término das fermentações (F2 a F12) foram obtidos com a destilação dos vinhos um total de 11 L de cachaça de alambique produzida em escala piloto.

Bosqueiro (2010) relata que fermentações bem conduzidas podem ser identificadas pela formação de uma espuma fina e de um aroma agradável, decorrente dos compostos secundários produzidos durante o processo fermentativo. Cardoso (2006) comenta que uma fermentação adequada, geralmente apresenta um aroma agradável, enquanto que aromas desagradáveis geralmente estão associados com fermentações contaminadas. No presente trabalho, a cepa SC82 durante as etapas F1 e F2 da fermentação, bem como durante as novas etapas da fermentação com a adição de mais caldo de cana para aumentar o volume de cachaça produzida, sempre apresentou uma fermentação com aroma agradável (Tabela 9), tempo para fermentar menor que 24 h (Tabela 8) e uma temperatura média de 35°C na dorna durante a fermentação.

Tabela 9 — Características do aroma (A+: agradável; A-: não agradável) do mosto obtido pelas cepas testadas nas etapas da Fermentação (F1 e F2) para a produção de cachaça em escala piloto.

LEVEDURAS	ETAPAS DA FERMENTAÇÃO			
	FINAL DA ETAPA F1	FINAL DA ETAPA F2	APÓS 24 HORAS DO FINAL DA ETAPA F2	APÓS 48 HORAS DO FINAL DA ETAPA F2
SC52	A+	A+	A+	A+
SC60	A+	A+	A+	A+
SC82	A+	A+	NA	NA
SC91	A+	A+	A+	A+
SC102	A+	A+	A+	A+
SC114	A+	A+	A+	A+
SC129	A+	A+	A+	A+
SC138	A+	A+	A+	A+
SC174	A-	A-	A-	A-
SC177	A+	A+	A+	A+
SC179	A-	A-	A-	A-
SC184	A-	A-	A-	A-
SC219	A+	A+	A+	A+
SC220	A+	A+	A+	A+
SC225	A+	A+	A+	A+
SC229	A+	A+	A+	A+

NA = Não se aplica. Fonte: Elaborado pelo autor.

A temperatura é um dos fatores ambientais importantes que influencia as atividades metabólicas dos micro-organismos (Braga 2006). Vieira (2011) comenta que linhagens mesófilas de *S. cerevisiae* crescem em um intervalo compreendendo temperatura mínima de 10°C e máxima de 40°C, sendo a temperatura ótima entre 28° e 35°C. Já Lima et al. (2001) relatam que as leveduras crescem melhor em temperaturas próximas a ambiente, sendo a temperatura ótima para a produção de etanol na faixa de 26°-35°C. As fermentações conduzidas pela cepa SC82 apresentaram uma temperatura média de 35°C.

O bom desempenho alcançado nas etapas de multiplicação e de fermentação da cepa SC82, indica seu potencial como cultura iniciadora do processo fermentativo para a produção de cachaça de alambique. Segundo Stroppa et al. (2009), a seleção de linhagens iniciadoras visa garantir uma alta produtividade e a manutenção da qualidade da cachaça, favorecendo um início mais rápido do processo fermentativo, evitando-se os riscos de contaminação apresentados pela fermentação espontânea, com menor competição por nutrientes essenciais, maior rendimento, qualidade e padronização da bebida produzida.

Observa-se na Tabela 9 que dentre as leveduras que não obtiveram êxito na fermentação, apenas as cepas SC174, SC179 e SC184 apresentaram um aroma não agradável, parecido com “ovo podre”, durante a fermentação, bem como durante a etapa de multiplicação. Esse fato não ocorreu com a cepa SC82 que sempre apresentou um aroma agradável durante as etapas de multiplicação e de fermentação. A provável justificativa para essa característica identificada nas cepas SC174, SC179 e SC184 pode ser devido a produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S) pelas cepas testadas. Ribeiro e Horii (1999) comentam que o sulfeto de hidrogênio, ácido sulfídrico ou gás sulfídrico (H_2S), possui odor repugnante, o que, aliado ao seu baixo limite de detecção, torna a sua presença nas bebidas indesejável, tendo as causas da sua formação relacionadas com o metabolismo das leveduras.

A cepa *S. cerevisiae* SC82 por ter apresentado um bom desempenho na produção de cachaça em escala piloto foi utilizada para a produção de cachaça em escala de alambique.

4.1.2 Produção de cachaça em escala de alambique

Na produção de cachaça em escala de alambique a cepa SC82 apresentou um bom desempenho em todos os estágios previstos nas etapas de multiplicação realizadas no laboratório e de multiplicação e de fermentação feitas na fábrica de cachaça. Durante todas essas etapas a referida cepa sempre apresentou um aroma agradável e um tempo de fermentação de 24 h.

No final da etapa P4 da multiplicação no laboratório para a produção em escala de alambique a cepa SC82 apresentou um valor de 4,5ºBrix, muito próximo do valor encontrado na produção em escala piloto que foi de 4,0ºBrix, o que demonstra novamente o bom desempenho alcançado da cepa SC82 nas etapas P1 a P4 da multiplicação elaborados nesta pesquisa para produção em escala de alambique.

Saindo das condições assépticas e controladas em termos de agitação e temperatura feitas nas etapas P1 até P4 do esquema de multiplicação para a produção em escala de alambique, o volume de 20 L de inóculo obtidos na Etapa P4 foi transferido para uma dorna de fermentação de aço inoxidável com capacidade de 150 L para terminar o processo de multiplicação, P5 até P8 (Figura 6), agora sem condições controladas de temperatura e agitação com o objetivo de aumentar o

volume de inóculo que seria enviado para a fábrica de cachaça. Além disso serviu para observar o desempenho da cepa SC82 ao receber volumes maiores de caldo de cana.

Assim, observou-se que a cepa SC82 nas etapas P5 até P8 foi capaz de reduzir pela metade (4,0ºBrix) o Brix inicial (8,0ºBrix) da etapa P5 de multiplicação em 24 h, conforme mostra a Tabela 12. Na etapa P6 de multiplicação, a redução do Brix inicial (6,5ºBrix) da etapa em quase a metade (4,0ºBrix) após 18 h. Já na etapa P7 de multiplicação reduziu o Brix inicial (7,0ºBrix) da etapa em quase a metade (4,0ºBrix) após 11 h. E por fim zerou o Brix inicial (6,0ºBrix) da etapa P8 de multiplicação após 11 h (Tabela 10). Em todas as etapas (P5 a P8) de multiplicação em condições não controladas de temperatura e de agitação o mosto contendo a cepa SC82 sempre apresentou aroma agradável.

Tabela 10 — Teor de açúcar (Brix) alcançado pela levedura *S. cerevisiae* SC82 nas etapas P5 a P8 da multiplicação para produção de cachaça em escala de alambique.

Etapa da multiplicação	P5	P6	P7	P8
Brix obtido na etapa (ºBrix)	4,0	4,0	4,0	0
Brix inicial da etapa (ºBrix)	8,0	6,5	7,0	6,0
Tempo (h) para redução do Brix inicial	24	18	11	11

Fonte: Elaborado pelo autor.

Outro detalhe que reforça o bom desempenho da cepa SC82 para a produção de cachaça em escala de alambique foi o fato de que após cinco dias da chegada do inóculo na fábrica do produtor de cachaça já foi possível destilar o vinho obtido da inoculação da citada cepa na fábrica de cachaça, demonstrando um bom resultado de multiplicação da levedura e de fermentação do caldo de cana em escala de alambique, mesmo partindo inicialmente de um volume grande de mosto contendo 120 L de inóculo.

A fermentação do caldo de cana a 15ºBrix adicionado na dorna da fábrica de cachaça que continha o inóculo testado durou 24 h. Verificou-se também que o produtor de cachaça na multiplicação de seus inóculos não realiza a aeração e nem o controle da temperatura do mosto, bem como que na etapa do processo fermentativo também não faz o controle de temperatura da fermentação, o que é a realidade para a maioria dos estabelecimentos produtores de cachaça. Estas condições poderiam ser barreiras para a multiplicação da levedura e o bom

desempenho da fermentação, bem como o fato de ser um processo industrial, onde utiliza-se grandes volumes de caldo de cana para a fermentação.

Por outro lado, já indicariam se a cepa testada (SC82) teria um bom desempenho caso ela tivesse um desenvolvimento adequado como aroma agradável durante a fermentação, reduções rápidas dos teores de Brix e tempo de fermentação menor ou igual a 24h.

O que foi percebido durante a fase de multiplicação e de fermentação na fábrica de cachaça, bem como comprovado pelo resultado da análise química da cachaça produzida na fábrica de cachaça, em relação a acidez volátil, expressa em ácido acético, que foi de 20,9 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro (Tabela 11). O baixo valor da acidez indica uma fermentação conduzida de forma adequada e satisfatória, com baixos níveis de contaminação bacteriana (SANTOS, 2013) e que possivelmente pode-se presumir um predomínio da cepa testada durante a etapa de multiplicação e de fermentação na fábrica de cachaça.

4.2 ANÁLISE QUÍMICA DA CACHAÇA DE ALAMBIQUE PRODUZIDA EM ESCALA PILOTO E DE ALAMBIQUE

Os resultados das análises químicas realizadas pelo LABTOX do ITEP da cachaça produzida em escala piloto (CPEP) e da cachaça produzida em escala de alambique (CPEA) pela cepa SC82 estão apresentados na Tabela 11, conforme o relatório da análise apresentado no Anexo 2 para a CPEP e no Anexo 3 para a CPEA.

Tabela 11 — Resultados da análise química (moléculas voláteis, contaminantes orgânicos e inorgânicos) da CPEP e da CPEA pela cepa SC82.

ANÁLISES*	RESULTADOS (CEPA SC82)		Valor máximo permitido*
	CPEP	CPEA	
MOLÉCULAS VOLÁTEIS			
Acidez volátil, expressa em ácido acético, em mg/100mL de álcool anidro	9,9	20,9	150
Ésteres totais, expressos em acetato de etila, em mg/100mL de álcool anidro	25,5	20	200
Aldeídos totais, em acetaldeído, em mg/100mL de álcool anidro	13,5	6,1	30
Furfural, em mg/100mL de álcool anidro	< 0,99	< 0,84	5

Soma dos álcoois isobutílicos, isoamílicos e n-propílico, em mg/100mL de álcool anidro	391	472	360
Soma dos Componentes secundários, em mg/100mL de álcool anidro	440	519	650
Teor alcoólico real, em % v/v a 20°C	45	52	38 a 48
CONTAMINANTES ORGÂNICOS			
Álcool metílico, em mg/100mL de álcool anidro	1,9	2,6	20
Carbamato de Etila, em ug/L	< 50	< 50	210
Acroleína, em mg/100mL de álcool anidro	< 0,85	< 0,73	5
Álcool séc-butílico, em mg/100mL de álcool anidro	< 0,04	< 0,04	10
Álcool n-butílico, em mg/100mL de álcool anidro	0,4	0,4	3
CONTAMINANTES INORGÂNICOS			
Cobre, em mg/L	3,1	2,4	5
Chumbo, em µg/L	< 10	< 10	200
Arsênio, em µg/L	< 8	< 8	100

*Conforme Instrução Normativa n. 13, de 29 de junho de 2005, do MAPA. Fonte: Elaborado pelo autor.

Verifica-se na Tabela 11 que as cachaças produzidas pela cepa SC82, tanto em escala piloto (CPEP) como em escala de alambique (CPEA), apresentaram teores de contaminantes orgânicos referentes a álcool metílico, a carbamato de etila, a acroleína, ao álcool séc-butílico e ao álcool n-butílico bem abaixo dos limites estabelecidos pela legislação. Este fato também foi observado com relação aos teores de contaminantes inorgânicos como cobre, chumbo e arsênio, os quais estavam abaixo dos limites estabelecidos pela legislação brasileira para cachaça (BRASIL, 2005a).

Sobre a presença dos contaminantes orgânicos e inorgânicos na CPEP e CPEA, os resultados obtidos são comentados separadamente a seguir, em virtude da toxicidade destes compostos e riscos a saúde dos consumidores pela ingestão de bebidas contaminadas com estes compostos.

O teor de metanol encontrado na CPEP foi de $1,9 \text{ mg } 100\text{mL}^{-1}$ de álcool anidro, enquanto que na CPEA foi de $2,6 \text{ mg } 100\text{mL}^{-1}$ de álcool anidro, constatando-se que em ambas as produções os teores encontrados estão bem abaixo do limite máximo estabelecido pela legislação que é de $20 \text{ mg } 100\text{mL}^{-1}$ de álcool anidro. O metanol é um álcool indesejável na bebida devido a sua alta toxidez, e se origina da degradação da pectina, um polissacarídeo presente na cana-de-açúcar, que é formada pela associação de centenas de moléculas de ácido galacturônico, que possuem fragmentos de moléculas de metanol, as quais são liberadas durante o

processo de fermentação (CARDOSO, 2006). Sua presença pode estar ligada a uma filtração inadequada do caldo, o que possibilita a presença de bagacilhos no processo fermentativo, cuja pequena quantidade de pectina pode ser degradada (em condições ácidas) dando origem ao metanol (PEREIRA, ROSA e FARIA, 2006).

A presença de metanol é indesejada nas bebidas alcoólicas, pois pode causar sintomas tóxicos como, por exemplo, dor de cabeça, vertigem e vômitos (MOREIRA, NETTO e MARIA, 2012). Além disso, se ingerido durante longo período, mesmo em doses pequenas, pode levar o indivíduo à cegueira e até mesmo à morte, pois provoca acidose e disfunção celular. Bortello (2013) comenta que na cachaça o metanol é formado pela degradação de bagacilhos da cana-de-açúcar, fibra que contém pectina, quando inicialmente não é separado do caldo por filtração, bem como que normalmente o teor de álcool metílico em destilados de cana-de-açúcar é baixo devido ao conteúdo de pectina na cana ser baixo.

Diante disto durante o processamento da cana-de-açúcar cuidados redobrados devem ser considerados no processo de filtração e decantação do caldo de cana que acabou de ser moído, bem como na regulagem da moenda para evitar a presença de bagacilhos de cana no caldo que será enviado para a fermentação, e que podem favorecer a presença de metanol na cachaça. Por isso é muito importante que a filtração e a decantação do caldo de cana, bem como a regulagem da moenda sejam muito bem realizadas e constantemente acompanhadas para que os teores de metanol sejam sempre mantidos bem abaixo do limite estabelecido pela legislação, já que a sua presença na bebida é esperada em virtude da presença de substâncias pécnicas dissolvidas no caldo durante a moagem da cana-de-açúcar (BORTELLO, 2013).

O teor de acroleína encontrado na CPEP foi menor que $0,85 \text{ mg } 100\text{mL}^{-1}$ de álcool anidro, enquanto que na CPEA foi menor que $0,73 \text{ mg } 100\text{mL}^{-1}$ de álcool anidro. Percebe-se que são valores bem abaixo do máximo que é permitido pela legislação que é de $5 \text{ mg } 100\text{mL}^{-1}$ de álcool anidro.

A acroleína, também conhecida como 2-propenal, é uma substância carcinogênica oriunda do processo de fermentação, podendo ser formada pela desidratação do glicerol ou por contaminação bacteriana (Zacaroni et al., 2011). Segundo Oliveira (2012) a acroleína é formada pela reação do glicerol produzido pelas leveduras com o beta-hidroxipropionaldeído sintetizados por contaminantes bacterianos. Fernandes (2013) relata que a acroleína possui gosto amargo, odor

penetrante e apimentado, e pode ser formada pela desidratação do glicerol, produto da fase inicial da fermentação, na presença de ácidos, a quente, quando em contato com as superfícies metálicas da coluna de destilação.

Fernandes (2013) avaliando as variações na composição físico-química da cachaça de alambique produzida usando uma mesma levedura selecionada sob condições controladas de fermentação e de destilação a partir de cinco cultivares de cana-de-açúcar, verificou que nas 45 amostras de cachaças produzidas não foi detectada a presença de acroleína na bebida. No presente trabalho foram encontrados teores de acroleína bem abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira para cachaça em condições não controladas de temperaturas e destilação. Já Zacaroni et al. (2011) avaliando a presença de contaminantes orgânicos e inorgânicos em aguardentes de cana da região Sul de Minas Gerais, verificaram valores para os teores de acroleína de não detectado a $7,45 \text{ mg } 100\text{mL}^{-1}$ de álcool anidro.

Na literatura são encontrados poucos relatos sobre a quantificação de acroleína em cachaça, o que se configura a necessidade de mais pesquisas voltadas para o estudo deste contaminante que apresenta efeitos tóxicos a saúde das pessoas por todas as vias de administração, bem como não está bem elucidado seu comportamento químico com o envelhecimento da bebida, além da necessidade de estudos sobre seus efeitos químicos em baixas concentrações para a saúde dos consumidores de cachaça.

O carbamato de etila, substância altamente carcinogênica, é um contaminante orgânico, cuja quantificação em cachaças passou a ser exigida pela legislação brasileira a partir de junho de 2010, que estabelece a quantidade não superior a $210 \mu\text{g L}^{-1}$. O teor de carbamato de etila encontrado na CPEP e na CPEA foi menor que $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Este valor corresponde aproximadamente a 33 % do valor máximo permitido pela legislação para carbamato de etila, o que representa um teor bem abaixo do estabelecido pela lei. Quanto menor este valor melhor será a qualidade da bebida e principalmente para a saúde dos consumidores, uma vez que o carbamato de etila é uma substância reconhecidamente genotóxica e carcinógena (OLIVEIRA, 2012).

Vieira, em 2011, objetivando quantificar carbamato de etila durante a fermentação e destilação de bebida alcoólica elaborada a partir de diferentes mostos, encontrou nos destilados produzidos teores de carbamato de etila variando

de 54 a 110 $\mu\text{g L}^{-1}$. Já Masson (2009) avaliando as concentrações de carbamato de etila, acroleína e outros componentes de aguardentes de cana coletadas de produtores das regiões norte e sul Minas Gerais, verificou que das 71 amostras analisadas, 29,57% encontraram-se fora da legislação brasileira quanto ao teor de carbamato de etila, com teores variando de 22,6 a 980 $\mu\text{g L}^{-1}$.

De acordo com Masson (2009), a falta de boas práticas de produção e a utilização de equipamentos tecnologicamente defasados favorece a contaminação da bebida, principalmente por carbamato de etila e aldeídos, dificultando a comercialização no mercado externo, em decorrência das exigências dos países importadores quanto à presença e teor dessas substâncias na bebida.

Os possíveis mecanismos de formação do carbamato de etila em bebidas alcoólicas ainda não se encontram claramente estabelecidos (FERNANDES, 2013; ZACARONI et al., 2011; MASSON, 2009), por isso devem ser intensificadas pesquisas envolvendo este composto químico para serem elucidados seus mecanismos de formação e medidas de prevenção da contaminação em bebidas alcoólicas, particularmente na cachaça, com intuito de esclarecer e orientar os produtores na produção de cachaça de qualidade, além da segurança a saúde dos consumidores.

Os teores de álcool sec-butílico encontrado na CPEP e na CPEA pela cepa SC82 foram menores que 0,04 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro, enquanto que os teores de álcool n-butílico encontrado na CPEP e na CPEA foram iguais a 0,4 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro. Estes valores estão bem abaixo do máximo permitido pela legislação para cachaça, que é de 10 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro para o álcool sec-butílico e 5 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro para o álcool n-butílico.

Cardoso (2013a), investigando a correlação entre os resultados de avaliação sensorial e de composição química de amostras de cachaça nova produzidas em alambiques de Salinas (MG) constatou que das 24 amostras analisadas os teores de álcool sec-butílico variaram de não detectável a 9,52 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro, enquanto que os teores de álcool n-butílico variaram de 0,33 a 31,14 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro, com três amostras acima do limite estabelecido pela legislação.

Segundo França Junior (2008), o aumento dos teores dos alcoóis n-butílico (1-butanol) e sec-butílico (2-butanol) é relacionado a presença de bactérias, podendo comprometer a qualidade da cachaça, bem como que o 1-butanol pode ser produzido como co-produto da acetona e do etanol, pela fermentação de certos

carboidratos por bactérias anaeróbicas. Pereira (2007) comenta que a formação do álcool n-butílico nas bebidas alcoólicas está diretamente relacionado com a linhagem da levedura, os nutrientes presentes no meio, a temperatura, o pH, a presença de compostos nitrogenados e a certos aminoácidos. Cabe destacar que na literatura científica existem poucas pesquisas envolvendo a quantificação dos álcoois sec-butílico e n-butílico em bebidas alcoólicas para um maior esclarecimento sobre seus mecanismos de formação e prevenção na cachaça e seus efeitos químicos em concentrações elevadas.

Sobre os contaminantes inorgânicos encontrados nas cachaças produzidas pela cepa SC82 verificou-se que o teor de cobre encontrado na CPEP foi de 3,1 mg L⁻¹, enquanto que na CPEA foi de 2,4 mg L⁻¹. Estes valores encontrados nas duas bebidas estão abaixo do limite máximo estabelecido pela legislação que é de 5 mg L⁻¹.

Silva et al (2012), verificando a conformidade físico-química com a legislação vigente de aguardentes de cana-de-açúcar produzidas na microrregião de Itapetinga (BA), encontraram teores de cobre nas cinco amostras de cachaças analisadas com valores de 2,55 mg L⁻¹; 4,37 mg L⁻¹; 7,63 mg L⁻¹; 8,8 mg L⁻¹ e 21,45 mg L⁻¹. França, Sá e Fiorini (2011), avaliando a qualidade da cachaça produzida artesanalmente no município de Passos (MG), através da quantificação dos teores de cobre, acidez acética e graduação alcoólica, constataram que das oito amostras analisadas 75%, seis amostras, estavam com os teores de cobre fora da especificação determinada pela legislação; com um valor máximo detectado de 19,92 mg L⁻¹. Apenas 25% das amostras analisadas estavam em consonância com a legislação vigente, com valores de 4,64 mg L⁻¹ e 3,08 mg L⁻¹ de cobre. Já Miranda e colaboradores (2007) fazendo um levantamento de marcas comerciais de cachaça e aguardente quanto à conformidade com os padrões de identidade e qualidade previstos pela legislação vigente, verificaram que das 94 amostras de cachaças analisadas, 15% apresentaram teor de cobre acima do limite estabelecido, com valor máximo verificado de 12 mg L⁻¹.

Portanto, em muitas pesquisas envolvendo a quantificação de cobre são encontradas contaminações de cachaça com cobre, fato este que configura a necessidade de uma preocupação ainda maior por parte dos produtores em resolver esse problema, buscando atender as exigências legais e com isso alcançar

mercados maiores, bem como produzir uma bebida de qualidade e segura a saúde dos consumidores.

O cobre corresponde a um íon metálico importante ao corpo humano devido a sua atividade funcional, estrutural e biológica, bem como possui um papel de catalisador de algumas reações fisiológicas oxidativas importantes como a fosforilação oxidativa, inativação de radicais livres, biossíntese de colágeno, entre outros (MONTEIRO, 2010). O excesso de cobre pode ser tóxico ao organismo devido à sua afinidade com grupos S-H de muitas proteínas e enzimas, causando doenças como a epilepsia, melanoma e artrite reumatoide, bem como a perda de paladar (MOSER, 2012). Vale reforçar que a contaminação de cobre na Cachaça de Alambique ocorre na etapa da destilação da bebida, pois como corresponde ao metal de construção dos alambiques, quando o cobre se oxida forma-se uma camada esverdeada de nome azinhavre, composta por carbonato básico de cobre, na superfície do metal, e durante a destilação, essa camada é dissolvida e arrastada pelos vapores alcoólicos ácidos, contaminando a bebida (CARDOSO, 2006).

Outro detalhe é que o cobre contamina a cachaça de alambique quando não ocorre uma higienização adequada do alambique, por isso o alambique deve ser obrigatoriamente limpo depois de toda destilação, esfregando-se as paredes internas, utilizando-se água potável e uma escova ou vassoura exclusiva para esta atividade, bem como que ao final da safra de produção da cachaça, tanto o alambique quanto a serpentina devem ficar completamente cheios de água durante a entressafra e quando do início da nova safra toda a parte interna do alambique deverá ser lavada com água potável acidificada (GONÇALVES, ROSA e UETANABARO, 2009). Cardoso (2013a) comenta que o cobre é um dos metais indesejáveis na cachaça e a contaminação da bebida por íons de cobre é considerada como entrave à exportação, já que a legislação em outros países não tolera mais que 2 mg L^{-1} de cobre nos destilados alcoólicos.

A utilização de resinas de troca iônicas e/ou filtros de carvão ativado para a redução do teor de cobre em cachaças armazenadas e/ou envelhecidas, bem como em cachaças recém-destiladas devem ser realizadas com cautela, utilizando o dispositivo mais adequado para que não comprometa a qualidade química e sensorial da bebida produzida.

Lima e colaboradores (2009) avaliando o uso de carvão ativado, resina de troca iônica e compósito carvão ativado/óxido de ferro na remoção de cobre de

cachaças com excesso deste elemento em função dos outros compostos congêneres essenciais à boa qualidade da cachaça, constataram que a resina de troca iônica mostrou-se melhor para o tratamento de cachaça com excesso de cobre, por ser mais específica na troca de íons como o cobre e não adsorver tanto os compostos orgânicos, essenciais à cachaça, porém altera a proporção dos álcoois superiores à medida que a resina é utilizada, principalmente do propanol. Já o carvão ativado e o compósito carvão tratado com óxido de ferro extraíram, além do cobre, quantidades significativas de compostos indispensáveis à qualidade da cachaça, sendo necessário um bom controle da quantidade de adsorvente a ser empregado. Já Stella (2010) buscando fazer uma avaliação dos efeitos da filtração com resinas iônicas sobre a qualidade da cachaça verificou que as resinas reduziram a concentração de cobre presente como contaminante da cachaça, no entanto, percebeu também que outras características físico-químicas e sensoriais do produto são alteradas pela filtração, onde as resinas iônicas reduzem a concentração de componentes secundários, ácidos, aldeídos e ésteres, influenciando nos atributos da bebida filtrada.

Lima e colaboradores (2009) comentam que a lavagem do alambique de cobre antes da destilação da cachaça, para a remoção do azinhave formado em suas paredes, ainda é o melhor procedimento a ser seguido pelo produtor, evitando-se que maiores gastos sejam feitos para adequação de seu produto às normas de qualidade exigidas pelos órgãos reguladores.

Diante das possíveis mudanças na qualidade química e sensorial da cachaça, identificada em certas pesquisas científica, com a utilização de resinas iônicas e/ou filtros para a remoção e/ou diminuição dos teores de cobre na bebida, vale destacar que um acompanhamento em cada etapa do processo de produção da Cachaça de Alambique, preconizando sempre a higiene na produção, condições higiênico-sanitárias adequadas e aprimoradas, bem como produção voltada para a qualidade e não para a quantidade, pensando e implantando as Boas Práticas de Fabricação, com certeza configura-se a melhor maneira de se produzir com qualidade e obter um produto dentro dos padrões de qualidade nacionais e internacionais, além de seguro a saúde dos consumidores.

Ainda sobre os contaminantes inorgânicos presentes nas cachaças produzidas pela cepa SC82, verificou-se que os teores de chumbo encontrado na CPEP e na CPEA pela cepa SC82 foram menores que $10 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto que os

teores de arsênio encontrado na CPEP e na CPEA foram menores que $8 \mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 11). Estes valores estão bem abaixo do máximo permitido pela legislação para cachaça, que é de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ para o teor de chumbo e $100 \mu\text{g L}^{-1}$ para o teor de arsênio.

O chumbo e o arsênio podem estar presentes na cachaça devido a soldas nos alambiques e em outros equipamentos e utensílios; a água usada na produção da cachaça; aos encanamentos de chumbo; as tintas, as rolhas e as tampas manufaturadas com ligas contendo chumbo; e ao desgaste mecânico e corrosão de equipamentos (FERNANDES, 2013; MASSON, 2009; FRANÇA JUNIOR, 2008). Diante disso, os produtores de cachaça de alambique devem estar atentos às citadas causas das possíveis formas de contaminação da bebida por chumbo e arsênio, visto que se tratam de compostos químicos tóxicos que em concentrações elevadas podem ocasionar sérios problemas de saúde, como intoxicação aguda e crônica e câncer (MASSON, 2009), aos consumidores da bebida contaminada.

Com relação aos teores de substâncias voláteis presentes nas cachaças produzidas pela cepa SC82, observou-se que tanto na CPEP como na CPEA apenas o teor de álcoois superiores representado pela soma dos álcoois isobutílicos, isoamílicos e n-propílico estavam acima do limite permitido pela legislação, onde a CPEP apresentou um valor de $391 \text{ mg } 100\text{mL}^{-1}$ de álcool anidro e a CPEA apresentou um valor de $472 \text{ mg } 100\text{mL}^{-1}$ de álcool anidro. A CPEP estava cerca de 8,6% acima do máximo permitido, enquanto que a CPEA estava cerca de 31,1% acima do valor máximo permitido pela legislação brasileira para o teor de álcoois superiores que é de $360 \text{ mg } 100\text{mL}^{-1}$ de álcool anidro.

Segundo Miranda (2005), do ponto de vista quantitativo, a formação de álcoois superiores depende acentuadamente da cepa empregada, assim como da ocorrência de micro-organismos contaminantes. Fernandes (2013) relata que a formação de álcoois superiores é influenciada pela composição do meio (concentração de açúcar, concentração e tipo de fonte de nitrogênio), pela oxidação dos aminoácidos durante o processo de fermentação, além da linhagem da levedura. Fernandes (2013) relata também que a quantidade de álcoois superiores é maior quando a fermentação for mais demorada, resultante da atividade de fermento mais fraco, o que não foi o caso das fermentações executadas neste trabalho, uma vez que a levedura SC82 mostrou-se com rápido crescimento e elevado poder de fermentação. Já Rodrigues Filho e Oliveira (1999) comentam que todo o cuidado

deve ser observado na adição de fubá de milho e farelo de arroz para a suplementação da nutrição da levedura durante a etapa de multiplicação, pois o excesso de fubá aumenta a produção de compostos secundários, e o excesso de farelo de arroz diminui a proporção desses compostos.

A formação de alcoóis superiores segundo Léauté (1990), citado por Bortoletto (2013) e Cardoso (2013a), também pode ser influenciada pelo processo e o tipo de equipamento utilizado durante a destilação da cachaça.

Com base nessas discussões supomos que o teor de alcoóis superiores acima do limite estabelecido pela legislação encontrado na CPEP e na CPEA produzidas pela cepa SC82 pode ser devido à suplementação do caldo de cana que foi realizada com fubá de milho e farelo de arroz na etapa de multiplicação da levedura e ainda à própria levedura selecionada utilizada no processo de produção da cachaça de alambique, bem como devido ao tipo do equipamento de pequeno porte (capacidade útil de 10 L) usado para a destilação da CPEP que não permite uma separação adequada das frações do destilado e ao controle de fatores que podem influenciar a dinâmica de evaporação dos compostos presentes no vinho como pressão, temperatura e graduação alcoólica do destilado na CPEP e na CPEA (BOSQUEIRO, 2010). Além do fato de que possíveis problemas no dimensionamento dos componentes do alambique de cobre de pequeno porte usado para a CPEP que podem interferir na destilação adequada dos componentes químicos do vinho (fermentado) (CARDOSO, 2006).

Possibilidades de elevada contaminação e utilização de fermento lento durante a produção da CPEP e da CPEA estão descartadas uma vez que a multiplicação e a fermentação do caldo de cana pela cepa SC82, tanto em escala piloto como em escala de alambique, foram conduzidas de forma adequada, com boas condições higiênico-sanitárias, dentro do tempo esperado e com um bom desempenho em todas as etapas da referida cepa.

Fato esse comprovado pela baixa acidez volátil, expressa em ácido acético, nas duas cachaças produzidas pela cepa SC82, principalmente da CPEP que foi de $9,9 \text{ mg } 100\text{mL}^{-1}$ de álcool anidro, que indicam um processo de produção realizado com baixos níveis de contaminação bacteriana.

Diante dos teores de alcoóis superiores um pouco acima do valor máximo permitido pela legislação encontrado na CPEP e na CPEA pela cepa SC82, novos estudos fazem-se necessários para elucidar a possibilidade de contribuição da

referida cepa no aumento do teor de álcool superior, bem como do efeito da suplementação do caldo de cana com fubá de milho e farelo de arroz na produção de alcoóis superiores, além de outros fatores relacionados ao tipo do equipamento e do processo de destilação que podem ter realmente contribuído para o aumento do teor de alcoóis superiores.

A soma dos componentes secundários, relatada na Tabela 11, também é chamada de Coeficiente de Congêneres, e refere-se à soma da acidez volátil (expressa em ácido acético), dos aldeídos (expressos em acetaldeído), dos ésteres totais (expressos em acetato de etila), dos álcoois superiores (expressos pela soma do álcool n-propílico, álcool isobutílico e álcoois isoamílicos) e do furfural mais hidroximetilfurfural não pode ser inferior a 200 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro e superior a 650 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro, conforme preconiza a legislação brasileira para cachaça. Assim na CPEP foi encontrado um valor para os teores de componentes secundários de 440 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro, enquanto que para a CPEA foi encontrado um valor para os teores de componentes secundários de 519 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro. Em ambos os casos, valores dentro do limite estabelecido pela legislação.

A acidez volátil, expressa em ácido acético, encontrada na CPEP foi de 9,9 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro, valor este que representa apenas 6,6 % do teor máximo permitido pela legislação. Na CPEA foi encontrado um valor de acidez volátil de 20,9 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro, que representa cerca de 13,9% do limite máximo estabelecido pela legislação.

Percebe-se que os teores de acidez volátil encontrados na CPEP e na CPEA estão bem abaixo do valor máximo permitido pela legislação brasileira que é de 150 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro, bem como que estes baixos índices de acidez volátil encontrados nas duas cachaças produzidas indicam um processo de produção controlado, com qualidade higiênico-sanitária e baixos níveis de contaminação bacteriana (MARINHO, MACEDO e SIQUEIRA, 2009; LELIS, 2006).

A acidez volátil corresponde a um parâmetro de qualidade que quando em níveis elevados promove um sabor indesejável e “agressivo” prejudicando a qualidade da bebida, sendo considerado o principal defeito sensorial de bebidas destiladas (MONTEIRO, 2010).

De acordo com Marinho, Rodrigues e Siqueira (2009), a acidez da cachaça vai depender do controle no processo de fermentação, em relação a fatores como:

linhagem da levedura predominante no fermento, pureza da fermentação, o tempo e a temperatura de fermentação e o manejo do mosto. Estes autores comentam também que a acidez volátil pode ser controlada em vários níveis na produção da cachaça, como por exemplo, na fermentação do mosto, em alambiques bem higienizados e na utilização de culturas de leveduras puras.

Cardoso (2013a) cita que a produção de ácido acético pode ser causada pela contaminação do mosto por bactérias acéticas e pelas próprias leveduras, que produzem o ácido acético, para gerar acetil-coenzima-A, utilizada na síntese de ácidos graxos, esteróis e aminoácidos. Cabe destacar que a presença de ácidos em pequena quantidade é muito importante para a qualidade da bebida, já que reagem com os alcoóis do meio aumentando a formação de ésteres, substâncias responsáveis pelo aroma de bebidas destiladas (BOSQUEIRO, 2010).

Silva e colaboradores (2009) avaliando a produção de cachaças em escala de laboratório a partir de leveduras isoladas de alambiques de diferentes regiões de Minas Gerais, obteve concentrações de acidez volátil, expressa em ácido acético, variando de 40,59 a 671,86 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro. Já Barbosa (2013) visando à caracterização molecular e bioquímica de linhagens de *S. cerevisiae* da região de Salinas (MG) verificou que as cachaças produzidas pelas 15 linhagens testadas, apresentaram valores da acidez volátil variando entre 12,87 e 32,68 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro, com teor médio de 19,73 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro. No presente estudo foram obtidos valores da acidez volátil na CPEP (9,9 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro) pela cepa SC82 abaixo dos valores obtidos nos trabalhos citados anteriormente. A CPEA apresentou valor da acidez volátil (20,9 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro) próximo da média obtida da acidez volátil na pesquisa de Barbosa (2013) e bem abaixo dos valores obtidos no trabalho de Silva e colaboradores (2009).

O baixo valor da acidez volátil encontrado na CPEP em relação à CPEA já era esperado, já que se trata de um processo mais controlado em termos de temperatura, higiene, instalações e acompanhamento da produção, além de trabalhar com menores volumes e apresentar baixos índices de contaminações no processamento. Mas, vale ressaltar que o valor da acidez volátil encontrado CPEA não deixa de ser um ótimo teor alcançado, uma vez que se trata de uma escala de produção maior, onde se trabalha com grandes volumes diários, condições de processo não muito controladas e com possibilidades de exposição a uma maior

contaminação em cada etapa do processamento, mesmo o estabelecimento apresentando boas condições higiênico-sanitárias na produção.

Sobre o teor de ésteres totais, expressos em acetato de etila, a CPEP apresentou o valor de 25,5 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro ácido, enquanto que a CPEA apresentou o valor de 20 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro ácido. Estes valores obtidos nas duas cachaças produzidas pela cepa SC82 estão dentro do limite permitido pela legislação que é de 200 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro ácido.

Os ésteres, ao lado dos álcoois superiores, correspondem aos principais compostos químicos responsáveis pelo sabor e pelo aroma de bebidas destiladas (MONTEIRO, 2010). Os ésteres são produzidos no metabolismo secundário das leveduras durante a fermentação alcoólica e durante o envelhecimento pela esterificação de ácidos graxos com o etanol (SANTOS, 2013).

O principal éster encontrado na cachaça é o acetato de etila, que em baixas concentrações incorpora um aroma agradável de frutas à bebida, porém, em altas concentrações, a bebida adquire um sabor indesejável e enjoativo (BARBOSA, 2013). Segundo Etiévant (1991), citado por Santos (2013), Moser (2012) e Monteiro (2010), o acetato de etila não contribui com o aroma de bebidas alcoólicas em concentrações abaixo de 75 mg L⁻¹ e quando em concentrações acima de 200 mg L⁻¹ confere a bebida um aroma desagradável.

Barbosa (2013) visando à caracterização molecular e bioquímica de linhagens de *S. cerevisiae* da região de Salinas (MG) verificou que as cachaças produzidas pelas 15 linhagens testadas, apresentaram em relação aos ésteres um teor médio do composto de referência (acetato de etila) de 15,5 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro, com resultados entre 5,9 e 63,9 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro. Já Silva e colaboradores (2006) comparando por meio de análises químicas e sensoriais, cachaças obtidas pela fermentação com diferentes linhagens de *S. cerevisiae* encontraram valores para ésteres em acetato de etila entre 9,7 a 32,3 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro.

Os teores de aldeídos totais, expressos em acetaldeído, encontrados nas duas cachaças produzidas pela cepa SC82 foi de 13,5 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro para a CPEP e de 6,1 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro para a CPEA. Estes valores obtidos estão dentro do limite permitido pela legislação que é de 30 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro ácido. Destaque para a CPEA que apresentou um valor bem abaixo do limite máximo estabelecido pela legislação.

Silva e colaboradores (2009) avaliando a produção de cachaças em escala de laboratório a partir de leveduras isoladas de alambiques de diferentes regiões de Minas Gerais, verificaram que aproximadamente 64% das amostras superaram o valor máximo legal de aldeídos, com valores entre 20,68 a 178,60 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro ácido. Por sua vez Silva e colaboradores (2006) comparando por meio de análises químicas e sensoriais, cachaças obtidas pela fermentação com diferentes linhagens de *S. cerevisiae* encontraram valores para acetaldeídos entre 12,9 a 23,4 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro.

Os aldeídos, principalmente o acetaldeído são compostos carbonílicos muito voláteis resultante da ação de leveduras durante estágios preliminares do processo de fermentação, tendendo a desaparecer no estágio final, desde que não ocorra aeração, bem como também são componentes químicos responsáveis pelo aroma e pelo sabor das cachaças (CARDOSO, 2013a). De modo geral ocorre aumento excessivo na formação de aldeídos quando se faz aeração do mosto durante a fermentação, por isso recomenda-se não aerar e sequer remexer o mosto durante essa etapa (FERNANDES, 2013).

De acordo com Oliveira (2012), do ponto de vista toxicológico, sabe-se que o acetaldeído é extremamente reativo e em quantidade elevada pode causar grandes danos ao sistema nervoso central. Moreira, Netto e Maria (2012) comentam que um conteúdo reduzido de aldeídos nas aguardentes é frequentemente relacionado a bebidas de qualidade superior. Em geral, aldeídos com até oito átomos de carbono, tais como acetaldeído e furfural, apresentam odores penetrantes, geralmente enjoativos, que são considerados indesejáveis para a cachaça (SOARES, SILVA e SCHWAN, 2011). Cardoso (2013a) relata que os aldeídos podem possuir desde odor penetrante, muitas vezes enjoativo e indesejável em bebidas destiladas, a aroma agradável, dependendo do composto e da sua concentração.

Durante a destilação, os aldeídos se concentram no destilado da fração cabeça. Entretanto, cabe destacar que o aumento do volume de separação do destilado da cabeça pode acarretar perda de componentes desejáveis, como ésteres (FERNANDES, 2013). No anexo 3 estão os resultados da análise química da fração cabeça da CPEP, onde o valor do teor de aldeídos totais foi de 60 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro. Por sua vez, no anexo 4 estão os resultados da análise química da fração cabeça da CPEA, onde o valor do teor de aldeídos totais foi de 41 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro. Um aumento do corte da fração cabeça, principalmente da CPEP

poderia reduzir ainda mais o valor de aldeídos totais, porém haveria uma perda de compostos secundários importantes para o aroma e para o sabor da cachaça produzida.

Ainda em relação às substâncias voláteis presentes na cachaça, verificou-se que o teor de furfural encontrado na CPEP foi menor que $0,99 \text{ mg } 100\text{mL}^{-1}$ de álcool anidro, enquanto que o teor de furfural encontrado na CPEA foi menor que $0,84 \text{ mg } 100\text{mL}^{-1}$ de álcool anidro. Estes valores estão bem abaixo do limite máximo estabelecido pela legislação brasileira para a cachaça que é de $5 \text{ mg } 100\text{mL}^{-1}$ de álcool anidro.

O furfural e o hidroximetilfurfural são aldeídos indesejáveis na bebida, pois conferem à cachaça aroma penetrante e enjoativo. A formação desses compostos pode estar relacionada com a queima da palha da cana-de-açúcar que provoca a desidratação de fração de açúcares presentes na cana, bem como pode ser devido à presença de açúcares residuais (MOSEER, 2012). Cardoso (2006) relata que na destilação períodos prolongados de aquecimento do mosto fermentado produzem principalmente o furfural, através da decomposição térmica de açúcares residuais e matéria orgânica ou bagacilhos do vinho depositados no fundo do alambique, o que pode ser evitado utilizando mosto fermentado sem excesso de matéria em suspensão.

No presente estudo, acredita-se que a presença de furfural na CPEP e na CPEA se deva pela presença de açúcares residual no vinho, visto que em ambos os processos de produção da bebida realizados na CPEP e na CPEA, a colheita da cana-de-açúcar foi feita sem queima do canavial, prática esta adotada e comum na produção da cachaça de alambique pelos produtores, bem como que foi feita a filtração do vinho (mosto fermentado) antes de ser adicionado no alambique para a destilação na CPEP. Já na CPEA o vinho antes de ser enviado para a destilação, passa por uma dorna “volante”, que é um equipamento que possui um fundo cônico que permite o descanso do vinho por certo tempo, cerca de duas horas, antes de seguir para a destilação para que matérias em suspensão sejam depositadas no fundo desta dorna.

Estudos devem ser conduzidos com relação à influência de determinadas concentrações, mesmo baixas, de contaminantes orgânicos e inorgânicos, além de alguns componentes secundários como acetaldeídos, furfural e álcoois superiores que podem estar presentes na composição químicas de cachaças, visando a um

maior esclarecimento e entendimento dos seus mecanismos de formação, influência sensorial e química na qualidade da bebida, formas de prevenção da contaminação, além é claro, principalmente, buscando a proteção à saúde dos apreciadores da bebida.

4.3 OCORRÊNCIA MOLECULAR DA LEVEDURA SELECIONADA NA ÚLTIMA BATELADA FERMENTATIVA EM ESCALA PILOTO

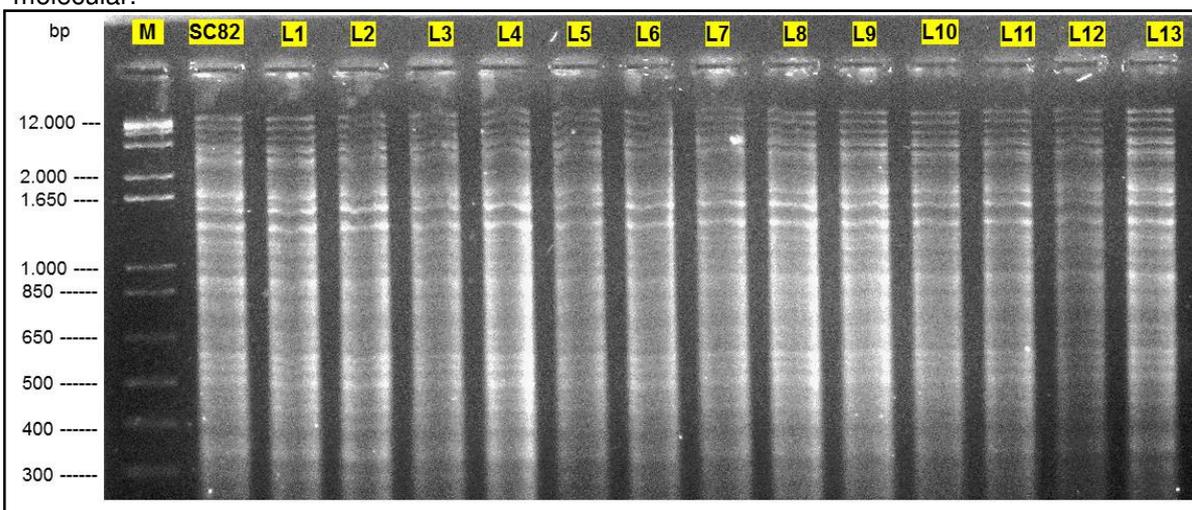
A caracterização das linhagens de *S. cerevisiae* é necessária para o controle da qualidade do produto final e do processo fermentativo, assegurando que este foi realmente conduzido pela linhagem originalmente inoculada (QUEROL et al., 1992)

No presente estudo investigou-se, através da técnica de mtDNA-RFLP, a ocorrência da linhagem *S. cerevisiae* SC82 no final da décima batelada (etapa F12) de adição de caldo de cana a 15ºBrix na etapa F2 do procedimento de fermentação utilizado nesta pesquisa para a produção de cachaça em escala piloto.

O método de mtDNA — RFLP tem sido utilizado para analisar o polimorfismo genético e monitorar a persistência ou a prevalência de linhagens durante o processo fermentativo (BADOTTI, 2009; GOMES et al., 2009). Segundo Araújo et al. (2007) o método de mtDNA — RFLP é simples, confiável, rápido e de baixo custo, e é utilizado para monitorar a prevalência de uma cepa específica de levedura durante todo o processo de fermentação.

Assim, observou-se, através da técnica de mtDNA-RFLP utilizando a endonuclease *Hinf* I, a prevalência de um perfil molecular nas amostras de leveduras isoladas (L1 a L13) ao final da fermentação da etapa F12 (F12F) (Figura 8). O tempo F12F coletado da fermentação da etapa F12 para a análise molecular se refere a amostra do fim da fermentação da etapa F12, coletada depois da retirada do vinho.

Figura 9 — Perfis de restrição do DNA mitocondrial dos isolados de leveduras (L1 a L13) e da linhagem selecionada *S. cerevisiae* SC82 utilizada como inóculo iniciador. M: marcador de peso molecular.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Comparando-se na Figura 8 os perfis moleculares das amostras L1 a L13, que referem-se aos 13 morfotipos predominantes isolados do tempo F12F, com o perfil molecular da linhagem *S. cerevisiae* SC82, adotada como controle de espécie, percebe-se uma semelhança no padrão de bandas e conseqüentemente podem representar a mesma linhagem. Portanto, isso confirma a existência de apenas uma linhagem de levedura, de perfil idêntico ao da levedura SC82 inoculada como iniciadora.

Diante disso, verifica-se a presença da cepa SC82 no final da última batelada da fermentação (F12) e o seu predomínio ao longo das fermentações que foram realizadas (F2 a F12) para a produção de cachaça em escala piloto. Araújo et al. (2007) verificando a prevalência das populações de *Saccharomyces cerevisiae* pela análise de restrição do mtDNA e outros métodos de tipagem molecular durante a fermentação espontânea para a produção da cachaça constataram que das 97 linhagens de *S. cerevisiae* isoladas do início, do meio e do final da fermentação, 52 linhagens de *S. cerevisiae* que apresentaram o mesmo perfil molecular estavam presentes em maior frequência no início, no meio e no final da fermentação.

A constatação da presença da cepa SC82 no final da etapa F12 da fermentação demonstra seu potencial para ser utilizada como inóculo iniciador na condução do processo fermentativo para a produção de cachaça. Gomes et al. (2007) testando linhagens de *S. cerevisiae* como iniciadoras para a produção de cachaça e comparando os dados obtidos com a fermentação espontânea verificaram

também pela técnica de mtDNA-RFLP que nas dornas de fermentação onde foram utilizadas leveduras selecionadas ocorreu a prevalência no processo fermentativo da cepa utilizada. No presente trabalho foi observada a presença da SC82 mesmo ao final de 10 bateladas sequenciais com caldo não estéril, ou seja, condição semelhantes às utilizadas em alambiques produtores de cachaça

Pesquisas científicas envolvendo a utilização de técnicas moleculares que identifiquem a presença de leveduras *S. cerevisiae* iniciadoras em um processo fermentativo representam um importante avanço tecnológico para os produtores de cachaça na busca da melhoria e da padronização da qualidade da bebida produzida.

A verificação da prevalência da cepa inoculada das restantes da microbiota natural presente no processo de fermentação espontânea torna-se uma importante ferramenta tecnológica para os produtores de cachaça para a confirmação da influência de inóculos iniciadores na melhoria da qualidade química e sensorial da bebida produzida, bem como dos parâmetros fermentativos (rendimento, eficiência e produtividade) alcançados por cepas de *S. cerevisiae* utilizadas como culturas iniciadoras que obtiveram bons resultados fermentativos, químicos e sensoriais.

De acordo com Silva Filho (2003) para que se possa utilizar linhagens de *S. cerevisiae* em processos fermentativos de produção industrial de etanol, características como a capacidade fermentativa e o poder de dominância na fermentação devem ser pré-requisitos básicos no processo de seleção dessas linhagens, o que pode ser observado no presente trabalho para a levedura SC82 testada.

4.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS DOS INÓCULOS (SELECIONADO, COMERCIAL E SELVAGEM)

4.4.1 Avaliação da multiplicação e da fermentação dos inóculos testados

Na comparação da levedura selecionada SC82 com os inóculos comercial e selvagem buscou-se comparar suas capacidades de fermentação, bem como seus rendimentos de etanol. Segundo Andrietta, Migliari e Andrietta (1999) o conhecimento da cinética da fermentação alcoólica é essencial para o entendimento da dinâmica de população de leveduras nas dornas de fermentação. Além disso,

procurou-se evidenciar o melhor desempenho fermentativo obtido com a utilização de leveduras selecionadas em relação a fermentação espontânea, que predomina em muitos estabelecimentos produtores de cachaça, a qual é conduzida por leveduras selvagens que acompanham a cana desde o canavial, juntamente com a microbiota dos equipamentos e utensílios utilizados no processo produtivo da bebida (Santos, 2013).

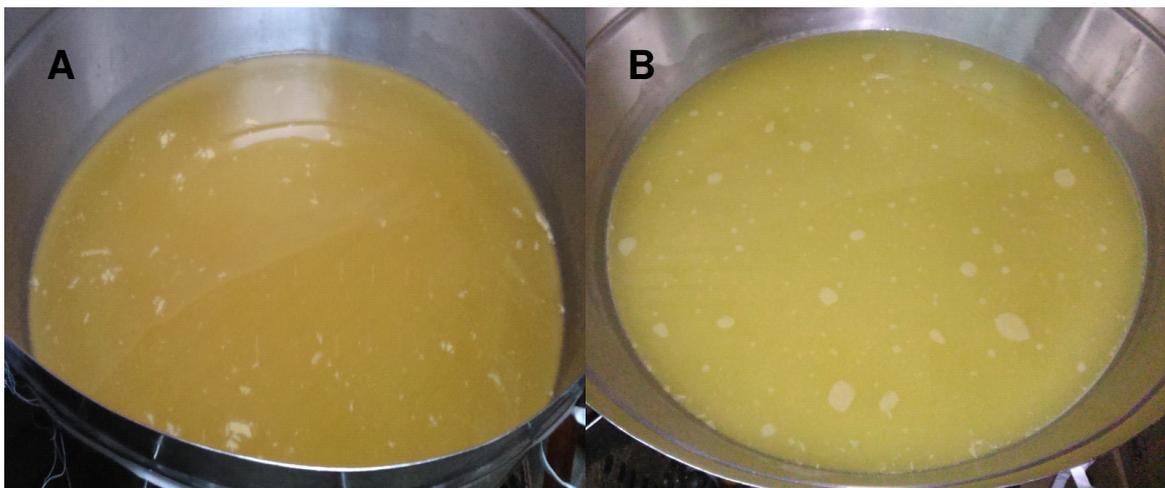
A utilização do inóculo comercial deve-se ao fato que alguns produtores de cachaça ainda utilizam este tipo de inóculo para iniciar a fermentação. O que não é recomendado já que o citado inóculo foi selecionado para a fermentação de massas alimentícias (Pereira, Rosa e Faria, 2006).

A fase de multiplicação dos inóculos testados durou aproximadamente nove dias, onde as etapas P1 até P4, que foram as fases mais controladas em termos de temperatura, de agitação e realizadas com condições estéreis. Por sua vez, as etapas P5 até P10 duraram mais cinco dias e foram realizadas em condições não controladas em termos de agitação e de temperatura e com a utilização de caldo de cana não estéril, com o objetivo de verificar o desenvolvimento e estabelecimento da levedura nessas condições usualmente utilizadas por produtores de cachaça.

De acordo com Martins (2013) a capacidade das leveduras em desenvolver respostas rápidas é importante para que as mesmas possam sobreviver a mudanças em seu ambiente em decorrência de fatores como temperatura, pH, níveis de nutrientes, disponibilidade de água e outros, que muitas vezes geram estresses e podem comprometer suas funções celulares normais.

No teste de comparação das fermentações verificou-se que apenas a levedura selecionada SC82 e o inóculo comercial foram capazes de zerar a concentração de açúcar inicial do caldo de cana de 15ºBrix adicionado em P10, etapa onde o caldo de cana já possui o teor de Brix ideal para a fermentação após 16h (Figura 10).

Figura 10 — Fermentações em dornas de aço inox mostrando o teor de açúcar zerado da etapa P10 da levedura selecionada SC82 (A) e do inóculo comercial (B).



Fonte: Elaborado pelo autor.

O inóculo selvagem não conseguiu zerar o teor de açúcar da etapa P10 após 24 h de inoculação (Figura 11), atingindo o valor de 2,5°Brix.

Figura 11 — Fermentação do inóculo selvagem após 24 h de inoculação na etapa P10.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O inóculo selvagem foi então mantido por mais dois dias na etapa P10 para avaliar a continuidade da fermentação, o que não foi observado, sendo descartado (Figura 12).

Figura 12 — Fermentação do inóculo selvagem após 48h do término da etapa P10.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O baixo desempenho alcançado na etapa de multiplicação pelo inóculo selvagem pode ser devido a diversidade de micro-organismos envolvidos no processo de multiplicação para a realização da fermentação espontânea (BARBOSA, 2013), onde pode ter ocorrido o predomínio, ao longa das etapas de multiplicação P1 a P10, de diferentes espécies e linhagens de leveduras, bem como de bactérias que podem ter interferido na condução da fermentação alcoólica, desviando para outros tipos de fermentações (CARDOSO, 2006).

De acordo com Alcarde, Monteiro e Belluco (2012), a utilização de inóculos selvagens proporciona fermentações totalmente aleatórias, pois depende da quantidade e da qualidade dos micro-organismos presentes no caldo de cana. Silva-Filho (2003) comenta que contaminações da fermentação por leveduras nativas de baixa capacidade fermentativa, pertencentes ou não à espécie *S. cerevisiae*, podem trazer consideráveis prejuízos por retardarem o tempo de fermentação, provocando expressivas quedas de rendimento na produção de etanol e quase sempre levando ao descarte total do fermento uma ou mais vezes no mesmo período de safra.

Após terem conseguido zerar o Brix da etapa P10, a levedura selecionada SC82 e o inóculo comercial foram utilizados para dar início ao processo de avaliação do rendimento, da eficiência e da produtividade da fermentação realizada por esses inóculos. Na Tabela 12 estão descritos os tempos fermentativos dos citados inóculos durante as três bateladas de fermentações realizadas, utilizando-se caldo de cana a

15°Brix, aquecido a 30°C e sem suplementação, para a avaliação dos parâmetros fermentativos.

Os tempos fermentativos da primeira, da segunda e da terceira fermentação realizadas (Tabela 12), duraram, respectivamente, 16 h, 16 h e 12 h para a levedura selecionada SC82, e 24 h, 22 h e 18 h, respectivamente, para o inóculo comercial.

Tabela 12 — Tempos de fermentação da levedura selecionada SC82 e do inóculo comercial durante três bateladas de fermentações realizadas utilizando-se caldo de cana a 15°Brix, aquecido a 30°C e sem suplementação.

INÓCULOS	TEMPO PARA FERMENTAR (h)			TEMPO MÉDIO (h)
	Primeira fermentação	Segunda Fermentação	Terceira fermentação	
Cepa SC82	16	16	12	14
Comercial	24	22	18	21

Fonte: Elaborado pelo autor.

Verifica-se na Tabela 12 que a levedura selecionada SC82 nas três bateladas de fermentações realizadas apresentou em cada fermentação sempre um tempo menor para fermentar do que o inóculo comercial. Isso demonstra uma das vantagens da levedura selecionada em relação a velocidade de fermentação para a produção de cachaça. Segundo Barbosa (2013), a utilização de leveduras selecionadas na produção de cachaça apresenta vantagens, como permite minimizar as contaminações indesejáveis, reduz o tempo de fermentação, aumenta a produtividade do processo e melhora a padronização da qualidade química e sensorial da bebida.

4.4.2 Cálculos dos parâmetros fermentativos

Foram determinados os valores dos parâmetros fermentativos em relação ao rendimento, a eficiência e a produtividade das três bateladas de fermentações conduzidas pela cepa SC82 e pelo inóculo comercial. Assim, na Tabela 13 estão descritos os valores obtidos dos açúcares totais consumidos, do etanol produzido, do rendimento, da eficiência e da produtividade alcançados nas três bateladas de fermentações realizadas pela cepa SC82 e pelo inóculo comercial para a avaliação de seus desempenhos fermentativos.

Tabela 13 — Açúcares totais consumidos, produção de etanol, rendimento, eficiência e produtividade nas três bateladas fermentativas para a cepa SC82 e para o inóculo comercial.

Parâmetros Fermentativos	Primeira Fermentação		Segunda Fermentação		Terceira Fermentação	
	Cepa SC82	Inóculo Comercial	Cepa SC82	Inóculo Comercial	Cepa SC82	Inóculo Comercial
Açúcares consumidos (g L ⁻¹)	55,93 b	56,73 b	58,71 ab	62,02 a	58,73 ab	60,67 ab
Etanol produzido (g L ⁻¹)	26,11 ab	19,17 b	28,01 ab	28,41 ab	28,19 ab	29,78 a
Etanol teórico (g L ⁻¹)	28,58 b	28,98 b	30,00 ab	31,69 a	30,01 ab	31,00 ab
Rendimento (%)	46,68 ab	33,79 b	47,71 a	45,81 ab	48,00 a	49,09 a
Eficiência (%)	91,36 ab	66,15 b	93,37 ab	89,65 ab	93,94 ab	96,06 a
Produtividade [g (Lh) ⁻¹]	1,63 abc	0,80 c	1,75 ab	1,29 bc	2,35 a	1,65 abc

Linhas que apresentam valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de probabilidade de 5%. Fonte: Elaborado pelo autor.

Verifica-se na Tabela 13 que na primeira fermentação realizada, para 55,93 g L⁻¹ de açúcares totais consumidos, a cepa SC82 alcançou ao final de 16 h de fermentação um rendimento de 46,68 % e uma eficiência fermentativa de 91,36 %. Por sua vez, o inóculo comercial, partindo-se de um total de 56,73 g L⁻¹ de açúcares consumidos, obteve no final de 24 h de fermentação um rendimento de 33,79 % e uma eficiência de 66,15 %. Assim, na primeira batelada a levedura SC82 apresentou melhor rendimento e eficiência fermentativa.

Na segunda fermentação realizada partindo-se de um valor de 58,71 g L⁻¹ de açúcares totais consumidos, a cepa SC82 alcançou ao final de 16 h de fermentação um rendimento de 47,71 % e uma eficiência fermentativa de 93,37 %. Já o inóculo comercial partindo-se de um total de 62,02 g L⁻¹ de açúcares consumidos, obteve no final de 22 h de fermentação um rendimento de 45,81 % e uma eficiência de 89,65 %. Observa-se assim, que ambos os inóculos apresentaram uma melhora no rendimento e na eficiência fermentativa na segunda batelada de fermentação em relação à primeira batelada, tendo novamente a cepa SC82 apresentado os melhores resultados.

Já na terceira fermentação realizada constata-se na Tabela 13 que partindo-se de um valor de 58,73 g L⁻¹ de açúcares totais consumidos, a cepa SC82 alcançou ao final de 12 h de fermentação um rendimento de 48,00 % e uma eficiência fermentativa de 93,94 %. Por sua vez o inóculo comercial a partir de um total de

60,67 g L⁻¹ de açúcares consumidos, obteve no final de 18 h de fermentação um rendimento de 49,09 % e uma eficiência de 96,06 %.

Verifica-se com isso que novamente ambos os inóculos apresentaram uma melhora no rendimento e na eficiência fermentativa ao iniciar mais uma batelada (terceira) de fermentação, onde a cepa SC82 conseguiu mais uma vez terminar a batelada da fermentação em menos tempo e com bons resultados em relação ao inóculo comercial.

A partir desses resultados do rendimento e da eficiência fermentativa obtidos ao final das três bateladas de fermentações realizadas verificou-se que rendimento médio (47,46 %) das três fermentações alcançado pela cepa SC82 foi maior que o valor médio obtido (42,90 %) pelo inóculo comercial. Esse maior rendimento médio alcançado pela cepa SC82 indica que esta linhagem selecionada de *S. cerevisiae* apresentou uma maior quantidade de álcool produzido por açúcares totais consumidos ao longo das três bateladas de fermentações executadas do que o inóculo comercial.

Já com relação a eficiência fermentativa, constatou-se que a eficiência média obtida ao final das três bateladas de fermentações realizadas pela cepa SC82 (92,89 %) foi maior que o valor médio alcançado pelo inóculo comercial (83,95 %). Tal fato indica que a cepa SC82 executou uma melhor conversão dos açúcares totais consumidos em etanol nas três bateladas de fermentações do que o inóculo comercial.

O termo produtividade refere-se à velocidade de produção de etanol ao final da fermentação (MAIA e CAMPELO, 2005). Observa-se na Tabela 13 que a produtividade obtida pela cepa SC82 no final da primeira, da segunda e da terceira bateladas de fermentação alcançaram valores, respectivamente, de 1,63; 1,75 e 2,35 g (Lh)⁻¹. Valores esses maiores do que a produtividade de 0,80; 1,29 e 1,65 g (Lh)⁻¹ obtidas, respectivamente, pelo inóculo comercial no final da primeira, da segunda e da terceira bateladas. Alencar et al. (2009) verificando a capacidade fermentativa de culturas de *S. cerevisiae* encontraram valores de produtividade variando de 1,12 a 3,15 g (Lh)⁻¹ para 12 h e valores entre 1,64 e 2,03 g (Lh)⁻¹ para 24 h de fermentação.

Segundo Maia e Campelo (2005) quanto menor for o tempo requerido para zerar o Brix, maior será a produtividade da fermentação. Diante disso, os valores superiores da produtividade obtidos pela cepa SC82 em relação ao inóculo

comercial deve-se as três bateladas de fermentações realizadas que duraram um tempo médio de 14 h. Por sua vez, as três bateladas de fermentações realizadas pelo inóculo comercial duraram um tempo médio de 21 h (Tabela 12).

O menor tempo fermentativo alcançado nas três bateladas de fermentações pela cepa SC82 evidencia uma melhor adaptação ao processo, bem como uma rápida velocidade de produção de etanol obtida pela citada cepa em relação ao inóculo comercial. Paschoalini e Alcarde (2009) comentam que uma elevada velocidade de fermentação é importante, pois aumenta a eficiência de transformação de açúcar em álcool, otimizando o processo, diminuindo o tempo de fermentação e reduzindo os riscos de infecção por micro-organismos contaminantes.

O melhor desempenho fermentativo em termos de rendimento, de eficiência e de produtividade da fermentação obtidos pela cepa SC82 demonstrou como a linhagem selecionada de *S. cerevisiae* SC82, isolada do processo fermentativo de produção de cachaça alcançou melhores respostas fermentativas em relação a produção de etanol e ao menor tempo de fermentação quando comparado com o inóculo comercial.

O uso de cepas selecionadas de *S. cerevisiae* que contribuam para o aumento do rendimento, da eficiência e da produtividade da fermentação pode se constituir em uma alternativa importante para a melhoria do desempenho do processo fermentativo de produção de cachaça, bem como para a obtenção de uma bebida com boas qualidades químicas e sensoriais. Oliveira (2005) comenta que a busca de linhagens iniciadoras e a caracterização de leveduras que prevalecem no processo de fermentação da cachaça poderão permitir uma interferência bem sucedida no processo fermentativo e para o estabelecimento de padrões de qualidade elevados para o produto final.

A melhor resposta fermentativa alcançado nesta pesquisa com a utilização de linhagem selecionada de *S. cerevisiae* durante o processo de fermentação para avaliação de parâmetros fermentativos ao se utilizar inóculo selecionado, comercial e selvagem, reforça a importância da utilização de leveduras selecionadas para a melhoria do desempenho da fermentação. Soares, Silva e Schwan (2011) comentam que o uso de cepas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* no processo de produção de cachaça tem aumentado a produtividade e melhorado a qualidade da bebida, pois essas linhagens selecionadas são competitivas e apresentam características tecnológicas mais desejáveis para a produção de cachaça.

Diante disso, a prática de alguns produtores de cachaça em utilizar inóculos comerciais durante a fermentação deve ser evitada, uma vez que, além de serem inóculos selecionados para atender aos propósitos da fermentação de massas alimentícias (PEREIRA, ROSA e FARIA, 2006), apresentaram parâmetros fermentativos inferiores aos obtidos com o uso do inóculo selecionado (SC82).

Assim, o uso de linhagens selecionadas de *S. cerevisiae* isoladas do processo de fermentação espontânea para a produção de cachaça, possibilita a realização de fermentações com uma menor contaminação, regulares (com tempos de duração similares), rápidas (menor tempo e maior produtividade) e de maior rendimento (alta conversão de açúcar para álcool). Além de permitir uma melhor padronização da qualidade química e sensorial da bebida produzida (CARDOSO, 2006).

4.5 CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS SOBRE A PRODUÇÃO DE CACHAÇA UTILIZANDO LEVEDURA SELECIONADA

As etapas de multiplicação para a produção de cachaça em laboratório e em escala de alambique, bem como as etapas de fermentação em escala piloto realizadas nesta pesquisa podem servir como um procedimento a ser analisado e utilizado como guia quando se pretende a propagação de leveduras selecionadas para a produção de cachaça, visto que se verificou a fácil aplicabilidade, possibilidades de ajustes e de adaptações e a fácil utilização e a aplicação em escala industrial.

A fase fermentativa apresenta etapas que são importantes e fáceis de serem utilizadas e aplicadas pelos produtores que não dispõem de equipamentos adequados quando pretendem realizar a propagação de leveduras selecionadas.

Nesse sentido convém salientar que os produtores de cachaça que estão pensando em utilizar leveduras selecionadas para a produção de cachaça e que não dispõem de equipamentos e recursos que propiciem a multiplicação adequada das leveduras, devem seguir algumas orientações técnicas importantes para o procedimento da multiplicação como escolher um local para multiplicação das leveduras que possua uma temperatura ambiente acima de 25°C; começar a propagação com um volume inicial de inóculo maior para diminuir as chances de

contaminações; adicionar inicialmente caldo de cana a 5ºBrix pasteurizado no mesmo volume que foi adicionado de inóculo na dorna; ir aumentando aos poucos os teores de Brix e volumes de caldos adicionados na dorna; após a adição do primeiro volume de caldo de cana pasteurizado, antes de colocar os demais volumes sempre aquecer o caldo a 32°C; manter sempre a higiene pessoal e na produção em todas as etapas do processo produtivo da cachaça; e buscar alternativas que facilitem a aeração como fazer o arejamento do mosto a cada adição de caldo, agitando-o por cinco minutos com uma escumadeira, por exemplo, ou outros meios que permitam a agitação do mosto, bem como dispor de uma dorna para multiplicação de leveduras que possua um diâmetro maior que a altura para facilitar a aeração.

Uma vez percebendo que o inóculo está executando seu metabolismo oxidativo de forma adequada e intensa através da observação de movimentação regular do mosto, aroma agradável e agitação que pode ser ouvida pode-se adicionar caldo de cana direto, sem aquecimento, desde que ele não esteja frio (> 25°C), já que a levedura está executando sua multiplicação de forma satisfatória.

Os produtores que tiverem como manter o sistema de aquecimento e agitação durante toda a etapa de multiplicação das leveduras melhor será para o aumento da biomassa celular. Outro detalhe é que para a pasteurização (aquecer até 70°C/15s) e/ou para o aquecimento (até 32°C) do caldo de cana que será adicionado na dorna, os produtores de cachaça podem utilizar equipamentos e utensílios de uso doméstico de grandes volumes, como panelas e/ou tachos grandes e fogão industrial, bem como de forma mais eficiente usar vapor da caldeira.

A utilização do procedimento de multiplicação das leveduras e de fermentação do caldo de cana bem como todas as considerações técnicas feitas neste projeto de pesquisa devem ser levada em consideração pelos produtores e pesquisadores quanto a sua utilização como um guia de consulta para a propagação de leveduras selecionadas para a produção de cachaça, visto que na literatura científica encontram-se apenas abordagens teóricas do que deve ser seguido e feito para a multiplicação de leveduras como a diluição do Brix, aumentos sucessivos dos teores de Brix, realizar aeração, controle de temperatura, entre outros.

Nada que possa ser visto de forma prática e esclarecedora através de procedimentos claros e que mostrem realmente como tudo foi realizado e deve ser feito, permitindo assim o avanço tecnológico, novas descobertas e o aprimoramento

de técnicas e tecnologias para a produção de cachaça através de leveduras selecionadas, além de permitir a implementação e a transferências de conhecimentos técnicos e científicos da área acadêmica com grandes possibilidades de serem utilizados por pequenos, médios e grandes produtores na busca de aperfeiçoar a sua tecnologia de produção.

Estudos devem ser conduzidos com relação à influência de determinadas concentrações, mesmo baixas, de contaminantes orgânicos e inorgânicos, e de alguns componentes secundários que podem estar presentes na composição química de cachaças, visando a um maior esclarecimento e entendimento dos seus mecanismos de formação, influencia sensorial e química na qualidade da bebida e formas de prevenção da contaminação.

Um maior conhecimento técnico-científico dos componentes químicos presentes na cachaça e a divulgação desses possibilitam ao produtor à melhoria na qualidade da bebida e permitem também uma maior proteção à saúde dos consumidores

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesta pesquisa sobre a utilização de leveduras selecionadas para a produção de cachaça e posterior avaliação da qualidade química das bebidas produzidas pode ser concluído que:

➤ A utilização do procedimento de multiplicação e de fermentação das leveduras selecionadas em escala piloto utilizado nesta pesquisa pode servir como um procedimento a ser analisado e utilizado como guia de consulta para propagação de leveduras selecionadas para a produção de cachaça de alambique.

➤ O bom desempenho alcançado nas etapas de multiplicação (aroma agradável e reduções pela metade dos teores de Brix em até 24 h) e de fermentação (aroma agradável e tempo para fermentar menor ou igual a 24 h) em escala piloto e em escala de alambique pela cepa *S. cerevisia* SC82, indicam a possibilidade desta ser uma cepa com potencial de cultura iniciadora do processo fermentativo para a produção de cachaça.

➤ Estudos da melhoria da fase de multiplicação com as leveduras que não apresentaram uma boa resposta fermentativa neste trabalho como o uso da aeração e controle da temperatura até o final da propagação podem mostrar um potencial não evidenciado nas condições utilizadas no presente trabalho.

➤ Através da técnica de mtDNA-RFLP verificou-se a semelhança dos perfis moleculares das amostras de leveduras (L1 a L13), isoladas da última batelada da fermentação (etapa F12), com o perfil molecular da cepa *S. cerevisiae* SC82, que demonstra a predominância desta cepa no mosto e seu potencial para ser utilizada como inóculo iniciador na condução do processo fermentativo para a produção de cachaça.

➤ A *S. cerevisiae* cepa SC82 apresentou o melhor desempenho nas fermentações testadas, mostrando um menor tempo de fermentação (média de 14 h) e um maior rendimento (48%), uma maior eficiência (93,94 %) e uma produtividade (2,35 g/Lh) superior ao final da terceira batelada de fermentação realizada em relação ao inóculo comercial e ao inóculo selvagem.

➤ Na avaliação dos compostos químicos das cachaças produzidas pela cepa *S. cerevisiae* SC82 apenas o teor de álcoois superiores estavam acima do limite permitido pela legislação vigente.

REFERÊNCIAS

- ❖ ABUJAMRA, Lizandra Bringhenti. **Produção de destilado alcoólico a partir de mosto fermentado de batata-doce**. 2010. 135p. Tese de Doutorado (Doutor em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, 2010.
- ❖ ALCARDE, André Ricardo. MONTEIRO, Bruno Miguel dos Santos. BELLUCO, André Eduardo de Souza. **Composição química de aguardentes de cana-de-açúcar fermentadas por diferentes cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae***. *Quim. Nova*, v. 35, n. 8, p. 1612-1618, 2012.
- ❖ ALCARDE, André Ricardo. SOUZA, Paula Araújo de. BELLUCO, André Eduardo de Souza. **Aspectos da composição química e aceitação sensorial da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de diferentes madeiras**. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 30, n. 1, p. 226-232, 2010.
- ❖ ALENCAR, Elvira Maria Bezerra de. SOUZA-MOTTA, Cristina Maria de. WALTER, Bruno Souza. SANTOS, Rejane Maria Pessoa. MARQUES, Olga Martins. QUEIROZ, Lusinete Aciole de. **Fermentation Capacity of *Saccharomyces cerevisiae* Cultures**. *Braz. Arch. Biol. Technol.* v. 52, n.4: p. 819-824, jul/agt, 2009.
- ❖ ANDRADE, Luiz Antônio de Bastos. ANJOS, Ivan Antônio dos. FIGUEIREDO, Paulo Alexandre Monteiro de. QUINTELA, Antônio Carlos Reis. **Utilização de Variedades Seleccionadas de Cana-de-Açúcar na Produção de Cachaça de Alambique**. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 33-36, 2002.
- ❖ ANDRIETTA SR, MIGLIARI PC, ANDRIETTA MGS. Classificação de cepas de leveduras de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa. *STAB:Açúcar Álcool e Subprodutos*, v. 17, p. 54-59, 1999.
- ❖ AQUINO, Francisco W. B. NASCIMENTO, Ronaldo F. RODRIGUES, Sueli. CASEMIRO, Antônio Renato S. **Determinação de Marcadores de Envelhecimento em Cachaças**. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 26, n. 1, p. 145-149, jan./mar. 2006.
- ❖ ARAUJO, R. A. C. et al. **Monitoring *Saccharomyces cerevisiae* populations by mtDNA restriction analysis and other molecular typing methods during spontaneous fermentation for production of the artisanal cachaça**. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 217-223, 2007.

- ❖ AZEVEDO, Sebastião Márcio de. CARDOSO, Maria das Graças. PEREIRA, Norma Eliane. RIBEIRO, Cleusa de Fátima Silva. SILVA, Vanisse de Fátima. AGUIAR, Fábio da Costa. **Levantamento da Contaminação por Cobre nas Aguardentes de Cana-de-Açúcar produzidas em Minas Gerais.** Ciênc. agrotec., Lavras. v.27, n.3, p.618-624, maio/jun. 2003.
- ❖ BADOTTI, F. et al. **Caracterização bioquímica e molecular de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de fermentações artesanais de caldo de cana e melado para a produção de cachaça em Florianópolis-SC.** Braz. J. Food Technol., Campinas, v. 13, n. 3, p. 205-213, jul./set. 2010.
- ❖ BADOTTI, F. **Diversidade genética e resistência a estresses em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de fermentações para a produção de cachaça em diferentes estados do Brasil.** 2009, 135 p. Tese (Doutorado em Microbiologia). Instituto de Ciência Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.
- ❖ BARBOSA, Edilene Alves. **Caracterização molecular e bioquímica de linhagens de *saccharomyces cerevisiae* da região de Salinas para fins de identificação geográfica.** 2013. 143p. Tese de Doutorado (Doutor em Ciências Biológicas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, 2013.
- ❖ BORTOLETTO, Aline Marques. **Composição química de cachaça maturada com lascas tostadas de madeira de carvalho proveniente de diferentes florestas francesas.** 2013. 80p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, 2013.
- ❖ BORTOLINI F, SANTANNA ES, TORRES RC. **Comportamento das fermentações alcoólica e acética de sucos de kiwi (*Actinidia deliciosa*); composição dos mostos e métodos de fermentação acética.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 21(2):236-243, maio-ago. 2001.
- ❖ BERNARDI, Taís Letícia. **Técnicas moleculares para a caracterização de *Saccharomyces cerevisiae* associadas à produção de cachaça.** 2007. 38p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, 2007.
- ❖ BOGUSZ JUNIOR, Stanislau; KETZER, Daiane Cristina Mertins; GUBERT, Raquel; ANDRADES, Lucieli; GOBO, Anagilda Bacarin. **Composição química da cachaça produzida na região noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v. 26, n. 4, p. 793-798, out./dez. 2006.

- ❖ BOSQUEIRO, Angelo Cesar. **Composição química da aguardente de cana-de-açúcar ao longo do processo de dupla destilação em alambique simples**. 2010. 84p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, 2010.

- ❖ BRASIL, 2014. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 28, de 08 de agosto de 2014**. Altera o subitem 5.1.2. do Anexo da Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005. Diário Oficial da União, Brasília (DF), Seção 1, p. 7.

- ❖ BRASIL, 2009a. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto n. 6.871, de 04 de junho de 2009**. Regulamenta a Lei n. 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário Oficial da União, Brasília (DF), 2009a. Seção 1, p. 20.

- ❖ BRASIL, 2009b. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Portaria INMETRO n. 276, de 24 de setembro de 2009**. Aprova a Revisão dos Requisitos de Avaliação da Conformidade da Cachaça.

- ❖ BRASIL, 2005a. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005**. Aprovar o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça.

- ❖ BRASIL, 2005b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 24, de 08 de Setembro de 2005. Manual Operacional de Bebidas e Vinagres. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 set. 2005. Seção 1, p. 11.

- ❖ BRASIL, 2002. Ministério da Saúde. Resolução – RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002. Publicado no Diário Oficial da União de 06/11/2002, Seção 1, Página 126. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 out. de 2002. Seção 1, p. 126.

- ❖ BRASIL, 2001. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 4.062, de 21 de dezembro de 2001**. Define as expressões "cachaça", "Brasil" e "cachaça do Brasil" como indicações geográficas e dá outras providências.

- ❖ BRASIL, 2000. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 5, de 31 de março de 2000**. Publicado no Diário Oficial da União de 05/04/2000, Seção 1, Página 10. Aprova o Regulamento Técnico para a fabricação de bebidas e vinagres, inclusive vinhos e derivados da uva e do vinho, dirigido aos estabelecimentos que especifica.

- ❖ BRASIL, 1997a. Presidência da República. **Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997**. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.

- ❖ BRASIL, 1997a. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 368, de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico sobre as condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores / Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 08 set. de 1997. Seção 1, p. 19697.

- ❖ BRASIL, 1997b. Ministério da Saúde. **Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997**. Aprova o Regulamento Técnico sobre "Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos".

- ❖ BRASIL, 1978. Ministério do Trabalho e Emprego. **Portaria nº 3.214, de 08 de junho de 1978**. Aprova as Normas Regulamentadoras – NR relativas à Segurança e Medicina do Trabalho.

- ❖ BRASIL, 1975. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 879, de 28 de novembro de 1975**. Publicado no Diário Oficial da União de 22/12/1975, Seção 1, Página 16942. Aprova as Normas para Instalações e Equipamentos Mínimos para Estabelecimentos de Bebidas e Vinagres.

- ❖ CALIARI, Márcio; SOARES JÚNIOR, Manoel; VIANA, Letícia Fleury; NAVES, Ronaldo Veloso; CHAVES, Lázaro José; SOUZA, Cleonice Borges de. **Diagnóstico da produção de cachaça na região de Orizona, estado de Goiás, Brasil**. Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiana, GO, v. 39, n. 1, p. 61-71, jan./mar. 2009.

- ❖ CANCELIER, Adriano et al. **Influência de parâmetros de processo na obtenção de bebida fermento-destilada de uva-japão (*Hovenia dulcis Thunberg*)**. Braz. J. Food Technol. [online]. v. 16, n. 1, p. 59-67, jan./mar. 2013.

- ❖ CARDOSO, Daniela Caetano. **Correlação entre a qualidade sensorial e a composição química da Cachaça de Alambique nova**. 2013. 188p. Tese de

Doutorado (Doutor em Ciências Biológicas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, 2013a.

❖ CARDOSO, M. G. C. **Produção de Aguardente de Cana**. 3 ed. Lavras: Editora UFLA, 340p. 2013b.

❖ CARDOSO, Maria das Graças Cardoso. **Produção de Aguardente de Cana**. 2 ed. Lavras: Editora UFLA, 445p. 2006.

❖ CARUSO, Miriam Solange Fernandes. NAGATO, Letícia Araujo Farah. ALABURDA, Janete. **Benzo(a)pireno, carbamato de etila e metanol em cachaças**. *Quim. Nova*, v. 33, n. 9, p. 1973-1976, 2010.

❖ CARVALHO, João Carlos Monteiro de; SATO, Sunão. Fermentação Descontínua Alimentada. *In: SCHMIDELL W, LIMA U A, AQUARONE E, BORZANI W. Biotecnologia Industrial*. 1ª. ed., v. 2. cap. 10. São Paulo: Edgard Blucher, p. 205 – 218, 2001.

❖ DANTAS, Hermeval Jales; VILAR, Francisco de Assis; SILVA, Flavio Luiz Honorato da; SILVA, Adriano Santana. **Avaliação da influência da velocidade de destilação na Análise físico-química de aguardente de cana-de-açúcar**. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.9, n.2, p.101-109, 2007.

❖ DATO, M. C. F., P.Jr, J. M., & MUTTON, M. J. R. **Analysis of the secondary compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* and wild yeast strains during the production of "cachaça"**. *Braz. J. Microbiol.* v. 36, p. 70-74, 2005.

❖ DIAS, Silvia. MAIA, Amazile. NELSON, David. **Efeito de Diferentes Madeiras Sobre a Composição da Aguardente de Cana Envelhecida**. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* v. 18, n. 3. Campinas ago./out. 1998.

❖ ETIÉVANT, P. X. Wine. *In: MAARSE, H. Volatile Compounds in Foods and Beverages*. New York: Marcel Dekker, Cap. 14, p. 483-546, 1991.

❖ FERNANDES, Oscar William Barbosa. **Avaliação da composição físico-uímica de Cachaça de Alambique de cinco cultivares de cana-de-açúcar colhidas em três épocas de maturação**. 2013. 132p. Tese de Doutorado (Doutor em Ciências Biológicas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, 2013.

- ❖ FRANÇA, Norival. SÁ, Odila Rigolin de. FIORINI, João Evangelista. **Avaliação da qualidade da cachaça artesanal produzidas no município de Passos (MG).** *Ciência et Praxis*, v. 4, n. 7, 2011.
- ❖ FRANÇA JUNIOR, Adalcino. **Influência do fracionamento no destilado para a otimização da produção da Cachaça de Alambique: Uma prática pedagógica no processo produtivo.** 2009. 123p. (Dissertação de Mestrado) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rio de Janeiro, 2009.
- ❖ GARBIN, Renata. BOGUSZ JUNIOR, Stanislaw. MONTANO, Marco Aurélio. **Níveis de cobre em amostras de cachaça produzidas na região noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil.** *Ciência Rural*, Santa Maria, v.35, n.6, p.1436-1440, nov./dez. 2005.
- ❖ GOMES FCO, SILVA CLC, MARINI MM, OLIVEIRA ES, ROSA CA. **Use of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of the traditional cachaça in Brazil.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, n.6, 2007.
- ❖ GOMES, F. C. O. **Produção de cachaça artesanal utilizando linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* e por fermentação espontânea, com a caracterização química e sensorial da bebida e das bactérias do ácido láctico associadas ao processo.** 2006. 120p. (Tese de Doutorado) - Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- ❖ GOMES et al. **Comparison between Two Selected *Saccharomyces cerevisiae* Strains as Fermentation Starters in the Production of Traditional Cachaça.** *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.52, n.1, pp. 449-455, Mar/apr 2009.
- ❖ GONÇALVES, Cleber Miranda. **Avaliação das Boas Práticas de Fabricação da Cachaça de alambiques no estado da Bahia como suporte para desenvolvimento biotecnológico dos processos produtivos da bebida.** 2009. 174p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Biotecnologia) – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, 2009.
- ❖ GONÇALVES, Cleber Miranda. FIGUEIREDO, Antonio Fábio. UETANABARO, Ana Paula Trovatti. Higienização dos Equipamentos. *In*: GONÇALVES, Cleber Miranda. UETANABARO, Ana Paula Trovatti. **Higienização, biossegurança e controle dos resíduos no processamento da Cachaça de Alambique.** cap. 1. Ilhéus, BA: Editus, p. 15 – 24, 2012.

- ❖ GONÇALVES, Cleber Miranda. ROSA, Carlos Augusto. UETANABARO, Ana Paula Trovatti. **Manual de Boas Práticas de Fabricação da Cachaça de Alambique**. Ilhéus, BA: Editus, 80p. 2009.
- ❖ GUEROLA, P. M. **Desarrollo y aplicación de sistemas rápidos para la detección, identificación y caracterización de levaduras alterantes de alimentos**. 2006, 190 p. Tesi Doctoral (Doctor em Ciências Biológicas). Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Departamento de Biotecnología, Universitat de Valencia, Valencia, 2006.
- ❖ IBRAC, **Instituto Brasileiro da Cachaça**. Mercado Interno. Disponível em <<http://www.ibraccachacas.org/index.php/servicos/estatisticas/mercado-interno>> Acesso em 13 de setembro de 2013.
- ❖ KIRSOP, B.E.; C.P. KURTZMAN, eds. *Living Resources for Biotechnology: Yeasts*. Cambridge University Press, 1988.
- ❖ LÉAUTÉ R. **Distillation in alambic**. Am. J. Enol. Vitic. 41(1):90-103, 1990.
- ❖ LEÃO, Daniella Arruda Falcão de Souza. **Coopetição: Tipologia e Impactos no Desempenho das Empresas da Indústria de Cachaça de Alambique do Estado de Minas Gerais**. 2004. 146p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Administração) – Programa de Pós-Graduação em Administração da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, 2004.
- ❖ LEÃO, Marcelo Machado. **Influência do termotratamento na composição química da madeira de amburana (*Amburana cearensis*), bálsamo (*Myroxylon balsamum*) e carvalho (*Quercus sp.*) e o impacto no aroma de uma solução modelo de cachaça**. 2006. 86p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, 2006.
- ❖ LELIS, Viviane Gomes. **Ocorrência de Carbamato de etila e sua formação em cachaça de alambique e em aguardente de cana-de-açúcar**. 2006. 80p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, 2006.
- ❖ LIMA, Anete de J. Boari. CARDOSO, Maria das Graças. GUERREIRO, Mário César. PIMENTEL, Flávio Araújo. **Emprego do Carvão Ativado para Remoção de Cobre em Cachaça**. Quim. Nova. v. 29, n. 2, p. 247-250, 2006.

- ❖ LIMA, Annete de J. Boari; CARDOSO, Maria das Graças; GUIMARÃES, Luiz Gustavo de L.; LIMA, José Maria de; NELSON, David Lee. **Efeito de substâncias empregadas para remoção de cobre sobre teor decompostos secundários da cachaça**. *Quim. Nova*, v. 32, n. 4, p. 845-848, 2009.
- ❖ LIMA, Thiago Lucas de Abreu. MAIA, Amazile Biagioni Ribeiro de Abreu. OLIVEIRA, Evelyn de Souza. **Efeitos Sensoriais da Adição de Extratos de Diferentes Madeiras à Cachaça**. *B.CEPPA*, Curitiba, v. 23, n. 2, p. 347 – 360, jul/dez. 2005.
- ❖ LOPEZ, Regina Lúcia Tinoco. **Dossiê Técnico: Processamento de Cachaça de alambique**. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, MG – CETEC, agosto, 2007.
- ❖ LÓPEZ, Rosa. Cachaça amplia potencial de consumo no mercado externo. **Revista Engarrafador Moderno**. Edição 110, São Paulo, p. 18-24. Junho. 2003.
- ❖ MALTA, Hélia Lucila. **Estudos de parâmetros de propagação de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*) para produção de cachaça de alambique**. 2006. 70p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, 2006.
- ❖ MARINHO, Aline Viana; MACEDO, Janaína Pereira de; SIQUEIRA, Rodrigues, Maria Isabel Dantas de. **Avaliação da acidez volátil, teor alcoólico e de cobre em cachaças artesanais**. *Estudos*, Goiânia, v. 36, n. 1/2, p. 75-93, jan./fev. 2009.
- ❖ MARTINS, Rafaela Leite. **Importância das reservas energéticas para a resposta ao estresse ácido em *Saccharomyces***. 2013. 91p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, 2013.
- ❖ MASSON, José. **Parâmetros físico-químicos e cromatográficos em aguardentes de cana queimada e não queimada**. 2005. 79p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, 2005.
- ❖ MARTINO, Denise Berto de. Aguardente: O destilado do século 21. **Revista Engarrafador Moderno**. São Paulo, n. 57. p. 84-88. Editora Aden. maio/junho, 1998.

❖ MENDES, Tiago Antônio de Oliveira; PINTO, Lucas Martins; MENDES, Débora de Sena Oliveira; MALTA, Hélia Lucila; OLIVEIRA, Evelyn de Souza. **Aumento na produção de biomassa de levedura em propagador aerado por processo descontínuo e semicontínuo para produção de cachaça.** Braz. J. Food Technol, Campinas, v. 16, n. 2, p. 81-89, abr./jun. 2013.

❖ MIRANDA, Mariana Branco de. **Avaliação físico-química de cachaças comerciais e estudo da influência da irradiação sobre a qualidade da bebida em tonéis de carvalho.** 2005. 70p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, 2005.

❖ MIRANDA, Mariana Branco de; MARTINS, Nilo Gustavo Souza; BELLUCO, André Eduardo de Souza; HORII, Jorge; ALCARDE, André Ricardo. **Qualidade química de cachaças e de aguardentes brasileiras.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 27(4): 897-901, out.-dez. 2007.

❖ MONTEIRO, Bruno Miguel dos Santos. **Composição química de aguardente de cana-de-açúcar obtidas por fermentação com diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*.** 2010. 73p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, 2010.

❖ MOREIRA, Ricardo F. A. NETTO, Claudia C. MARIA, Carlos A. B. de. **A fração volátil das aguardentes de cana produzidas no Brasil.** Quim. Nova, v. 35, n. 9, p. 1819-1826, 2012.

❖ MORI, Fábio Akira. MENDES, Lourival Marin. TRUGILHO, Paulo Fernando. CARDOSO, Maria das Graças. **Utilização de Eucaliptos e de Madeiras Nativas no Armazenamento da Aguardente de Cana-de-Açúcar.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v. 23, n.3, p. 396 – 400, set./dez. 2003.

❖ MOSER, Alexandre de Souza. **Efeito da micro-oxigenação na qualidade química e sensorial da cachaça não envelhecida.** 2012. 86p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Parana (UFPR), Curitiba, 2012.

❖ NASCIMENTO, Eduardo Sanches Pereira do. **Ésteres em aguardente de cana: seu perfil.** 2007. 150p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, 2007.

- ❖ OLIVEIRA, Sônia Paula Alexandrino de. **Níveis de congêneres, carbamato de etila e outros contaminantes em runs e uísques de consumo popular no Brasil.** 2012. 87p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, 2012.
- ❖ OLIVEIRA, B. M. **Comportamento killer em leveduras associadas à fermentação espontânea do mosto de cana-de-açúcar de produtores de Cachaça de Alambique da Bahia.** 2009. 123p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, UEFS.
- ❖ OLIVEIRA, Consuelo Ribeiro de. GARÍGLIO, Helder A. de Aquino. RIBEIRO, Morgana Menezes. ALVARENGA, Miriam Souza Pinto de. MAIA, Francisco Xavier. **Cachaça de Alambique: Manual de Boas Práticas Ambientais e de Produção.** Convênio de Cooperação Técnica SEAPA / SEMAD / AMPAQ / FEAM / IMA. 72p. 2005.
- ❖ OLIVEIRA, Itamaury Teles de. **Determinantes da formulação de estratégia em indústrias emergentes: Análise do setor de destilarias de cachaça artesanal de qualidade (AMPAQ).** 2004. 224p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Administração) – Faculdade de Ciências Econômicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, 2004.
- ❖ PASCHOALINI G, ALCARDE VE. **A Study on the Fermentation Process in a Sugarcane Mill and an Optimization Proposal.** Rev. de Ciênc. Tecnol. 16(32):59-68.
- ❖ PATARO, Carla. GOMES, Fátima C. O. ARAÚJO, Roberta A. C. ROSA, Carlos A. SCHWAN, Rosane Freitas. CAMPOS, Cássia Roberta. CLARET, Antonio Sales. CASTRO, Hilário Antonio de. **Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 37-43, 2002.
- ❖ PATARO, C. et al. **Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil.** Journal of Applied Microbiology, v. 88, p.1-9, 2000.
- ❖ PEREIRA, Alexandre Fontes. **Suplementação de nitrogênio sobre a fermentação alcoólica para produção de cachaça, cerveja e vinho.** 2007. 113p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, 2007.

- ❖ PEREIRA, José Antonio; ROSA, Carlos Augusto; FARIA, João Bosco. **Cachaça de Alambique**. Brasília (DF): LK Editora e Comunicação, 180 p. 2006. Coleção Tecnologia Fácil, 2006.
- ❖ PEREIRA, Norma Eliane. CARDOSO, Maria das Graças. AZEVEDO, Sebastião Márcio De. MORAIS, Augusto Ramalho de. FERNANDES, Welington. AGUIAR, Priscila Mendes. **Compostos Secundários em Cachaças Produzidas no Estado de Minas Gerais**. Ciênc. agrotec., Lavras. v.27, n.5, p.1068-1075, set./out., 2003.
- ❖ PINHEIRO, Carla Santos Ribeiro. **Seleção de leveduras produtoras de etanol como suporte para a produção de álcool combustível e cachaça artesanal por produtores rurais**. 2012. 94p. Tese de Doutorado (Doutor em Biotecnologia) – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, 2012.
- ❖ PINHEIRO, Sandra Helena de Mesquita. **Avaliação sensorial das bebidas aguardente de Cana industrial e cachaça de alambique**. 2010. 129p. Tese de Doutorado (Doutor em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, 2010.
- ❖ PIRES, Antônio Carlos Rabelo. **Cachaça: Análise de um Empreendimento**. Recife – Pe. SEBRAE / PE. 58 p. 2001.
- ❖ QUEROL, A. et al. **Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeasts strains**. Applied and Environmental Microbiology, v. 58, p. 2948-2593, 1992a
- ❖ QUEROL, A.; BARRIO, E.; RAMÓN, D. **Population dynamics of natural Saccharomyces strains during wine fermentation**. International Journal of Food Microbiology, 1994.
- ❖ RAMOS, Juliana Amaral. **Identificação molecular de populações de Saccharomyces cerevisiae em destilarias de cachaça no estado de Pernambuco**. 2009, 135 p. Monografia (Especialização). Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009
- ❖ RIBEIRO, Carlos Alberto França; HORII, Jorge. **Potencialidades de linhagens de leveduras Saccharomyces cerevisiae para a fermentação do caldo de cana**. Sci. Agric., Piracicaba, v. 56, n. 2, 1999.

- ❖ RODRIGUES FILHO, André. OLIVEIRA, Reinaldo Nunes de. **Tecnologia de Produção de Cana-de-Açúcar e Cachaça de Minas de Qualidade**. Belo Horizonte: EMATER – MG. 75 p. 1999.
- ❖ SALES, Luciane Reis. **Seleção de cultivares de cana-de-açúcar potenciais para a produção de cachaça artesanal**. 2013. 59p. Dissertação de Mestrado (Mestre) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, 2013.
- ❖ SANTOS, Thiago Moreira dos. **Avaliação da influência de bactérias lácticas isoladas da região de Salinas/MG, em fermentações consorciadas com leveduras selecionadas, na composição físico-química e sensorial de cachaças**. 2013. 119p. Tese de Doutorado (Doutor em Ciências Biológicas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, 2013.
- ❖ SANTOS, Darlene Pereira dos. CARDOS, Hércules Danilo dos Reis. CARDOSO, Daniela Caetano. MEIRELES, Wesley Antunes. **Influência da embalagem na aceitação de cachaças Artesanais de diferentes marcas comerciais na região de Salinas/MG**. Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos, Campo Mourão (PR), v.3, n.1, p.57-62, jan./jun., 2012.
- ❖ SANTOS, V. R.; FARIA, J. B. **Efeito da adição de açúcar na qualidade sensorial de cachaça obtida tradicionalmente e redestilada**. Alim. Nutr., v. 22, n. 3, p. 489-497, jul./set. 2011.
- ❖ SCHMIDT, Lucas. MARMITT, Sandro. OLIVEIRA, Eniz Conceição. SOUZA, Claucia Fernanda Volken de. **Características físico-químicas de aguardentes produzidas artesanalmente na região do vale do taquari no Rio Grande do Sul**. Alim. Nutr. v.20, n.4, out./dez. 2009.
- ❖ SERAFIM, Felipe Augusto Thobias. SILVA, Alexandre Ataíde da. GALINARO, Carlos Alexandre. FRANCO, Douglas Wagner. **Comparação do perfil químico entre cachaças de um mesmo vinho destiladas em alambiques e em colunas**. Quim. Nova, v. 35, n. 7, p. 1412-1416, 2012.
- ❖ SERAFIM, Felipe Augusto Thobias. BUCHVISER, Silmara França. GALINARO, Carlos Alexandre. FRANCO, Douglas Wagner. **Ácidos orgânicos em aguardentes produzidas em alambique e em coluna**. Quim. Nova, v. 34, n. 1, p. 28-32, 2011.
- ❖ SIEBALDE, H. G. L.; CANUTO, M. H.; LIMA, G. M. de; SILVA, J. B. B.; Informe agropecuário 2002, 23, 59.

❖ SILVA, Marcondes Viana; DIAS, Fabíola Morais; ALEXANDRINO, Daniela Marques; OLIVEIRA, Jussimara Barros de; BOTÊLHO, Poliana Souza.

Caracterização físico-química de aguardentes artesanais de cana-de-açúcar produzidas na região Sudoeste da Bahia. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.14, n.2, p.197-202, 2012.

❖ SILVA PHA, Santos JO, Araújo LD, Faria FC, Pereira AF, Oliveira VA, Vicente MA, Brandão RL. **Chromatographic evaluation of volatile compounds in brazilian sugar cane spirits produced with yeasts from different locations.** Ciênc. Tecnol. Aliment. 2009; 29(1):100-106.

❖ SILVA, Alice Ferreira. **Caracterização genética de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de fermentações artesanais de cachaças da Bahia.** 2009. 117p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Biotecnologia) – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, 2009

❖ SILVA, Carol Líliam Coelho; ROSA, Carlos Augusto; MAIA, Amazile Biagionil Ribeiro de Abreu; OLIVEIRA, Evelyn Souza. **Qualidade química e sensorial de cachaças produzidas com quatro linhagens de *saccharomyces cerevisiae* (floculantes, não-produtoras de H₂S e de referência).** B.CEPPA, Curitiba v. 24, n. 2, p. 405-422, jul./dez. 2006.

❖ SILVA FILHO EA. Caracterização genética de populações de leveduras de destilarias de álcool combustível para otimização do processo de fermentação. Recife, Brasil, 107p. (D. Sc. Thesis. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos. UFPE).

❖ SILVEIRA, Luís Cláudio Inácio da. BARBOSA, Márcio Henrique Pereira. OLIVEIRA, Mauro Wagner de. **Manejo de Variedades de Cana-de-Açúcar Predominantes nas Principais Regiões Produtoras de Cachaça em Minas Gerais.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 25 – 32. 2002.

❖ SOARES, Thaís Louise. SILVA, Cristina Ferreira. SCHWAN, Rosane Freitas. **Acompanhamento do processo de fermentação para produção de cachaça através de métodos microbiológicos e físico-químicos com diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae*.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v. 31, n. 1, p. 184-187, jan./mar. 2011.

❖ SOUZA, Leandro Marelli de. FERREIRA, Karla Silva. PASSONI, Luís César. BEVITORI, Alice Barreto. MELO, Karen Vieira. VIANA, Arivaldo Ribeiro. **Teores de**

compostos orgânicos em cachaças produzidas na região norte fluminense – Rio de Janeiro. *Quim. Nova*, v. 32, n. 9, p. 2304-2309, 2009.

❖ STELLA, Fabiula Melissa. **Efeito da filtração com resinas iônicas sobre a qualidade da cachaça.** 2010. 98p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná (UFP), Curitiba, 2010.

❖ STROPPA, Cibele Tosin. ALVES, José Guilherme Lembi Ferreira. FIGUEIREDO, Ana Luíza França de. CASTRO, Cristina Calabresi. **Parâmetros cinéticos de linhagens de levedura isoladas de alambiques mineiros.** *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 1978-1983, 2009.

❖ VICENTE, Maristela de Araújo. **Caracterização molecular e bioquímica de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na fabricação da Cachaça de Alambique.** 2007. 141p. Tese de doutorado (Doutor em Ciências Biológicas) – Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, 2007.

❖ VIEIRA, Érica Nascif Rufino. **Influência do tipo de mosto e do gênero de levedura na formação de aminas bioativas e carbamato de etila em destilados alcoólicos.** 2011. 167p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, 2011.

❖ VEZINHET, F.; BLONDIN, B.; HALLET, J.N. **Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tools for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 32, p. 568-571, 1990.

❖ ZACARONI, Lidiany Mendonça. CARDOSO, Maria das Graças. SACZK, Adelir Aparecida. SANTIAGO, Wilder D. ANJOS, Jeancarlo Pereira dos. MASSON, José. DUARTE, Felipe C. NELSON, David Lee. **Caracterização e quantificação de contaminantes em aguardentes de cana.** *Quim. Nova*, v. 34, n. 2, p. 320-324, 2011.

ANEXOS

ANEXO 1. Localização do município e da região da destilaria onde foram coletadas as leveduras, fase da fermentação de onde foram isoladas as leveduras, atividade *killer* dos isolados e a tolerância dos isolados de leveduras a concentração de 50% de glicose, a concentração de 15% de etanol e a temperatura de 35°C.....116

ANEXO 2. Resultado da análise química realizada pelo LABTOX do ITEP da CPEP pela cepa SC82.....117

ANEXO 3. Resultado da análise química realizada pelo LABTOX do ITEP da CPEA pela cepa SC82..... 118

ANEXO 1. Localização do município e da região da destilaria onde foram coletadas as leveduras, fase da fermentação de onde foram isoladas as leveduras, atividade *killer* dos isolados e a tolerância dos isolados de leveduras a concentração de 50% de glicose, a concentração de 15% de etanol e a temperatura de 35°C.

Leveduras Testadas	Município (BA)	Região	Fase da fermentação onde foi isolada	Atividade <i>Killer</i>	Tolerância a 50% de glicose	Tolerância a 15% de etanol	Tolerância a temperatura de 35°C
SC52	Ibirataia	Mata Atlântica	Final	Não	Não	Não	Não
SC60	Jaguaripe	Mata Atlântica	Inicial	Não	Não	Sim	Não
SC82	Jaguaripe	Mata Atlântica	Final	Não	Sim	Sim	Sim
SC91	Jaguaripe	Mata Atlântica	Inicial	Não	Não	Não	Não
SC102	Jaguaripe	Mata Atlântica	Intermediária	Não	Não	Não	Não
SC114	Ilhéus	Mata Atlântica	Inicial	Não	Não	Não	Não
SC129	Ilhéus	Mata Atlântica	Final	Não	Não	Não	Não
SC138	Ilhéus	Mata Atlântica	Final	Não	Não	Não	Não
SC174	Condeúba	Caatinga	Intermediária	Não	Sim	Sim	Sim
SC177	Condeúba	Caatinga	Intermediária	Não	Não	Não	Não
SC179	Condeúba	Caatinga	Intermediária	Não	Não	Sim	Não
SC184	Condeúba	Caatinga	Final	Não	Não	Sim	Sim
SC219	Caculé	Caatinga	Inicial	Não	Não	Sim	Não
SC220	Caculé	Caatinga	Inicial	Não	Não	Não	Não
SC225	Caculé	Caatinga	Intermediária	Não	Não	Sim	Não
SC229	Caculé	Caatinga	Intermediária	Não	Não	Sim	Não

Fonte: Oliveira, 2009; Silva, 2009; Pinheiro, 2012.

ANEXO 2. Resultado da análise química realizada pelo LABTOX do ITEP da CPEP pela cepa SC82.



RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 89050

Recife, 29 de outubro de 2013

RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 89050



NATUREZA DO TRABALHO: Análise dos padrões de identidade e qualidade de cachaça.
 MATERIAL: 01 amostra de cachaça, ref. C - 16/10/13, colhida e remetida pelo cliente.
 CLIENTE: Ana Paula Trovatti Uetanabaro
 ENDEREÇO: Rodovia Jorge Amado, Km 16 Salobrinho Ilhéus- BA, 45.662-90

Recebimento amostra: 16/10/2013 **Início/término da análise : 17 - 23/10/2013**

RESULTADO

Análises	Valor encontrado	Valor máximo permitido(5)	Valor máximo permitido(6)
Acroleína, em mg/100mL de álcool anidro	<0,85	5	5
Álcool metílico, em mg/100mL de álcool anidro	1,9	20	20
Álcool n-butílico, em mg/100mL de álcool anidro	0,4	3	3
Álcool séc-butílico, em mg/100mL de álcool anidro	<0,04	10	10
Arsênio, em ug/L	<8	100	100
Carbamato de Etila, em ug/L	<50	150	150
Chumbo, em ug/L	<10	200	200
Cobre, em mg/L	3,1	5	5
Ésteres totais, expressos em acetato de etila, em mg/100mL de álcool anidro	25,5	200	200
Furfural, em mg/100mL de álcool anidro	<0,99	5	5
Soma dos álcoois isobutílicos, isoamílicos e n-propílico, em mg/100mL de álcool anidro	391	360	360
Teor alcoólico real, em % v/v a 20° C	45	38 a 54**	38 a 48*

* Valor de graduação alcoólica para cachaça / **Valor de graduação alcoólica para aguardente de cana

Obs:

- Método utilizado: POP TC 020 e IT 006 (Documentos do Sistema da Qualidade da LABTOX)
- Referências Bibliográficas: MAPA/SDA/CGAL - Manual de Análises de Bebidas e Vinagres.
- Acreditação: INMETRO (CRL 0153)
- Signatário do acordo de reconhecimento mútuo para atividade de acreditação de organismo de certificação de produtos e de sistemas de gestão da qualidade e ambiental.
- D.O.U. - Seção 1- Edição Número 124 de 30/06/2005: MAPA, Instrução Normativa nº13 de 29/06/2005
- D.O.U. - Seção 1- Edição Número 184 de 25/09/2009: INMETRO, Portaria nº276 de 24/09/2009

RESULTADO

Análises não acreditadas pelo INMETRO	Valor encontrado	Valor máximo permitido(5)	Valor máximo permitido(6)
Acidez volátil, expressa em ácido acético, em mg/100mL de álcool anidro	9,9	150	100
Açúcares em g/L de sacarose	<1,0	30	30
Aldeídos totais, em acetaldeído, em mg/100mL de álcool anidro	13,5	30	30
Soma dos Componentes secundários, em mg/100mL de álcool anidro	440	650	650



Edén Cavalcanti de Albuquerque Junior
Supervisor de Programas - CREA-PE - 180460953-6

LABTOXR2884/2013
OS Nº 3352/2013

NOTA IMPORTANTE: Os resultados deste ensaio/análise têm significação restrita e se aplicam tão somente a(s) amostra(s) coletada(s) pelo cliente. O relatório de ensaio só pode ser reproduzido por completo.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE PERNAMBUCO - ITEP
 LABORATÓRIO DE ANÁLISES DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS E DE BEBIDAS ALCOÓLICAS - LABTOX
 Av. professor Luiz Freire, 700 - Cidade Universitária - Recife - PE CEP: 50.740-540
 PABX: 81 3183.4399 FAX: 81 3183.4313 www.itep.br e-mail: itep@itep.br

ANEXO 3. Resultado da análise química realizada pelo LABTOX do ITEP da CPEA pela cepa SC82.



RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 89054

RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 89054



Recife, 29 de outubro de 2013

NATUREZA DO TRABALHO: Análise dos padrões de identidade e qualidade de cachaça.
 MATERIAL: 01 amostra de cachaça, ref. S - 16/10/13, colhida e remetida pelo cliente.
 CLIENTE: Ana Paula Trovatti Uetanabaro
 ENDEREÇO: Rodovia Jorge Amado, Km 16 Salobrinho Ilhéus- BA, 45.662-90

Recebimento amostra: 16/10/2013

Início/término da análise : 17 - 23/10/2013

RESULTADO

Análises	Valor encontrado	Valor máximo permitido(5)	Valor máximo permitido(6)
Acroleína, em mg/100mL de álcool anidro	<0,73	5	5
Álcool metílico, em mg/100mL de álcool anidro	2,6	20	20
Álcool n-butílico, em mg/100mL de álcool anidro	0,4	3	3
Álcool séc-butílico, em mg/100mL de álcool anidro	<0,04	10	10
Arsênio, em ug/L	<8	100	100
Carbamato de Etila, em ug/L	<50	150	150
Chumbo, em ug/L	<10	200	200
Cobre, em mg/L	2,4	5	5
Ésteres totais, expressos em acetato de etila, em mg/100mL de álcool anidro	20	200	200
Furfural, em mg/100mL de álcool anidro	<0,84	5	5
Soma dos álcoois isobutílicos, isoamílicos e n-propílico, em mg/100mL de álcool anidro	472	360	360
Teor alcoólico real, em % v/v a 20° C	52	38 a 54**	38 a 48*

* Valor de graduação alcoólica para cachaça / **Valor de graduação alcoólica para aguardente de cana

Obs:

- Método utilizado: POP TC 020 e IT 006 (Documentos do Sistema da Qualidade da LABTOX)
- Referências Bibliográficas: MAPA/SDA/CGAL - Manual da Análises de Bebidas e Vinagres.
- Acreditação: INMETRO (CRL 0153)
- Signatário do acordo de reconhecimento mútuo para atividade de acreditação de organismo de certificação de produtos e de sistemas de gestão da qualidade e ambiental.
- D.O.U. - Seção 1- Edição Número 124 de 30/06/2005: MAPA, Instrução Normativa nº13 de 29/06/2005
- D.O.U. - Seção 1- Edição Número 184 de 25/09/2009: INMETRO, Portaria nº276 de 24/09/2009

RESULTADO

Análises não acreditadas pelo INMETRO	Valor encontrado	Valor máximo permitido(5)	Valor máximo permitido(6)
Acidez volátil, expressa em ácido acético, em mg/100mL de álcool anidro	20,9	150	100
Açúcares em g/L de sacarose	<1,0	30	30
Aldeídos totais, em acetaldeído, em mg/100mL de álcool anidro	6,1	30	30
Soma dos Componentes secundários, em mg/100mL de álcool anidro	519	650	650

Edén Cavalcanti de Albuquerque Junior
 Supervisor de Programas - CREA-PE - 180460953-6

LABTOXR2888/2013
 OS Nº 3352/2013

NOTA IMPORTANTE: Os resultados deste ensaio/análise têm significação restrita e se aplicam tão somente a(s) amostra(s) coletada(s) pelo cliente. O relatório de ensaio só pode ser reproduzido por completo.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE PERNAMBUCO - ITEP
 LABORATÓRIO DE ANÁLISES DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS E DE BEBIDAS ALCOÓLICAS - LABTOX
 Av. professor Luiz Freire, 700 - Cidade Universitária - Recife - PE CEP: 50.740-540
 PABX: 81 3183.4399 FAX: 81 3183.4313 www.itep.br e-mail: itep@itep.br