

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**A influência da temperatura na condução de dois processos fermentativos  
para produção de cachaça**

**Vivian Santoro Braga**

**Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e  
Tecnologia de Alimentos**

**Piracicaba  
2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Vivian Santoro Braga  
Engenheiro Agrônomo**

**A influência da temperatura na condução de dois processos fermentativos para produção  
de cachaça**

Orientador:  
Prof. Dr. **JORGE HORII**

**Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e  
Tecnologia de Alimentos**

**Piracicaba  
2006**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Braga, Vivian Santoro

A influência da temperatura na condução de dois processos fermentativos para  
produção de cachaça / Vivian Santoro Braga. - - Piracicaba, 2006.  
90 p.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

1. Aguardente 2. Bebidas alcoólicas 3. Cachaça 4. Fermentação alcoólica 5. Levedura  
6. Temperatura I. Título

CDD 663.53

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

*À Deus, pela vida, por agradecer-me com saúde, paz, uma família maravilhosa e permitindo-me alcançar mais uma vitória.*

### **OFEREÇO**

*Aos meus pais, Luiz e Selma,  
pelo exemplo de vida, pelo incentivo nos momentos mais difíceis,  
por mostrarem sempre o caminho da verdade,  
por tantas vezes que abdicaram de vossos sonhos para realizar os meus,  
por todas as alegrias que proporcionaram-me,  
pelo amor incondicional e apoio na realização deste trabalho.*

*E à minha irmã Graziela, pela amizade, generosidade  
e companheirismo em todas as situações.*

### **DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em especial ao Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN) pela oportunidade de realização do curso.

À Universidade Estadual Paulista (UNESP), em especial à Faculdade de Ciências Agrônomicas, Campus de Botucatu (FCA), pela formação profissional e apoio de seus funcionários e professores.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Horii, por sua amizade e confiança que possibilitaram a oportunidade de iniciar este trabalho; pela compreensão durante todos os momentos e pelo incentivo e apoio nas dificuldades que surgiram no decorrer do curso.

Ao Prof. Dr. André Ricardo Alcarde e à Profa. Dra. Sandra Helena da Cruz pelas valiosas sugestões.

Aos técnicos de laboratório do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição do Setor de Açúcar e Álcool Rosemary Leonessa da Silva e Sylvino Luiz Torrezan pela amizade e auxílio durante o desenvolvimento do projeto.

Às técnicas do laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN), Denise de Almeida Leme Baptista e Rosalina de Fátima Oncagne.

A todos os funcionários, do Setor de Açúcar e Álcool do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN), Daniela, Dito, Fábio, Gil, Joana, Regina e Vana, em especial, Pedro, pelo auxílio e amizade.

À bibliotecária Beatriz Helena Giongo pelo auxílio na correção e organização das referências bibliográficas.

À amiga Cristiane Pilon pela amizade, apoio e auxílio nas etapas preliminares do trabalho, além de seu constante incentivo.

Aos amigos Adilson de Oliveira Júnior e Antonio Sampaio Baptista pela amizade, auxílio nas análises estatísticas e durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo André Eduardo Belluco pela amizade, incentivo e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Fernando, José Rubens, Matheus, Nilo e Thais pelo apoio em todos os momentos.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

"Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor... Lembre-se: se escolher o mundo ficará sem o amor, mas se escolher o amor, com ele conquistará o mundo."

Albert Einstein



## SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Importância econômica da aguardente	12
2.2 Caracterização da aguardente e da cachaça	13
2.3 Caracterização e qualidade da matéria-prima	15
2.3.1 Produção de etanol através de outras fontes	18
2.4 Fatores relacionados ao processo fermentativo	19
2.4.1 Condução da fermentação visando à produção de aguardentes	20
2.4.2 Linhagens	22
2.4.3 Contaminação	24
2.4.3.1 Contaminação por leveduras	25
2.4.3.2 Contaminação por bactérias	25
2.4.4 Temperatura	26
2.5 Carbamato de etila	28
2.6 Compostos voláteis	30
2.6.1 Álcoois superiores	30
2.6.2 Ésteres	32
2.6.3 Aldeídos	32
2.6.4 Ácidos orgânicos	33
2.6.5 Furfural e hidroximetil-furfural	34
2.6.6 Metanol	34
2.6.7 Cobre, Arsênio e Chumbo	35
2.7 Destilação	35
2.7.1 Alambique	36
2.7.2 Colunas de destilação	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Local	39

3.2	Microrganismos _____	39
3.3	Meios de cultivo para fermentação _____	40
3.3.1	Meio YEPD _____	40
3.3.2	Meio com caldo de cana-de-açúcar _____	40
3.4	Tratamentos _____	41
3.5	Condução da fermentação _____	41
3.5.1	Condução da fermentação para análise cromatográfica do destilado _____	41
3.5.1.1	Destilação do vinho para as análises cromatográficas _____	42
3.6	Análises físico-químicas _____	42
3.6.1	Concentração de leveduras _____	42
3.6.2	Açúcar redutor total _____	42
3.6.3	Determinação do teor alcoólico _____	42
3.6.4	Análise cromatográfica do vinho _____	42
3.7	Análise estatística _____	43
3.7.1	Estudo 1: Crescimento celular, açúcar residual e teor alcoólico do vinho _____	43
3.7.2	Estudo 2: Amostras cromatografadas _____	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	44
4.1	Estudo 1: Análise de crescimento celular, açúcar residual e teor alcoólico do vinho _____	44
4.2	Estudo 2: Análise cromatográfica do destilado _____	48
5	CONCLUSÕES _____	56
	REFERÊNCIAS _____	57
	APÊNDICES _____	77

## RESUMO

A influência da temperatura na condução de dois processos fermentativos para a produção de cachaça

O presente trabalho teve como objetivo estudar o comportamento de três linhagens de leveduras, sendo duas da espécie *S. cerevisiae*, (Y-904 e CAT) e uma da espécie *S. bayanus*, (EC) em duas temperaturas de fermentação 20 e 32 °C, usando dois meios, YEPD (meio controle) e caldo de cana-de-açúcar clarificado. As fermentações foram realizadas em câmara de BOD, estático, em frascos de erlenmeyer, com 200 mL de meio e 1 g de fermento seco. A concentração de açúcar foi padronizada para 150,0 g L<sup>-1</sup> de ART (açúcares redutores totais) e 15,2 °brix, nos ensaios que se utilizou o caldo de cana como substrato. As fermentações que se utilizou apenas o caldo de cana foram realizadas em balões de cinco litros, em ambas as temperaturas, nas quais as três linhagens de levedura foram avaliadas, através da análise cromatográfica do destilado. Para a obtenção dos destilados foi montado em laboratório um destilador feito totalmente de vidro. Nos ensaios que se utilizou o meio controle e o caldo de cana nas duas temperaturas de fermentação, as leveduras foram avaliadas quanto ao crescimento celular, o açúcar residual e o teor alcoólico. As amostras dos destilados provenientes das fermentações que utilizaram apenas o caldo de cana como mosto, foram avaliadas quanto: ésteres, aldeídos, acidez volátil, álcoois superiores, álcool metílico, furfural, carbamato de etila, acroleína e cobre. As três linhagens ensaiadas apresentaram diferenças estatísticas entre si e entre os meios utilizados. O objetivo não foi a comparação entre as duas temperaturas e sim avaliar o comportamento das linhagens e verificar a possibilidade de se efetuar fermentações a 20 e a 32 °C. Pela análise cromatográfica alguns componentes voláteis como ésteres, aldeídos, acidez volátil, álcoois superiores e álcool metílico, apresentaram diferenças estatísticas, isto é, a formação desses compostos foi influenciada pela temperatura e pelas linhagens utilizadas. O teor de ésteres aumentou com o decréscimo da temperatura para *S. bayanus*. A acidez volátil aumentou com o acréscimo da temperatura, assim como ocorreu com a formação de álcoois superiores e de álcool metílico que foi mais elevada a 32 °C do que a 20 °C. Enquanto que outros componentes como: furfural, carbamato de etila, acroleína e cobre não apresentaram diferenças em relação a variação da temperatura ou pelas leveduras utilizadas.

Palavras-chave: Cachaça, Temperatura, Leveduras, Compostos voláteis, Bebidas alcoólicas.

## ABSTRACT

Influence of the temperature in the conduction of two fermentative processes for cachaça production.

The present work had the aim of studying the behavior of three yeast strains, considering two from *Saccharomyces cerevisiae* species (Y-904 and CAT) and one from *Saccharomyces bayanus* species (EC), in two fermentation temperatures, 20 and 32 °C, utilizing two mediums, YEPD (control medium) and clarified sugarcane juice. The fermentations were carried out in stable BOD chambers, in bottles of Erlenmeyer, with 200 mL of each medium and 1 g of dried yeast. The sugarcane concentration was standardized to 150g/L of ART (total reductor sugar) and to 15,2 °brix in the essay that was used the sugarcane juice as medium. The fermentations that were used only the sugarcane juice were carried out into 5 liters balloons capacity, in both temperatures, where the three yeasts strains were evaluated through chromatography analysis of the distillates. In order to obtain the distillates, it was built a all-glass distillation apparatus. The yeasts were analyzed as the cell growth, the residual sugar and the alcoholic concentration at the essays which were used the control medium and the sugar cane juice in both temperatures. It was evaluated esters, aldehydes, acidity, higher alcohols, methyl alcohol, furfural, acrolein and copper in the distillates samples which came from the fermentations that used only the sugarcane juice as wort. The three yeast strains showed differences between each other and between the mediums. The aim of this study was not to compare the results between the temperatures, but it was to evaluate the behavior of the strains and find out the possibility of making fermentations at 20 and 32°C. The chromatography analysis showed statistical differences from volatile compounds as: esters, aldehydes, acidity, higher alcohols and methyl alcohol. These results show that the formation of these compounds was influenced by temperature and by the yeasts strains used. The content of esters increased when temperature decreased for *S. bayanus*. The acidity increased when the temperature also increased, the same occurred with higher alcohol formation and methyl alcohol formation. The methyl alcohol formation was higher at 32 °C than 20 °C. The others compounds as: furfural, ethyl carbamate, acrolein and copper did not show differences related to the temperature variation and the yeasts strains used.

Key words: Cachaca, Temperature, Yeasts, Volatile compounds, Alcoholic beverages.

## **1 INTRODUÇÃO**

A aguardente se destaca no cenário nacional como sendo a bebida alcoólica mais consumida no país gerando uma elevada receita no âmbito nacional, além de serviços diretos e indiretos, mas infelizmente ainda sendo consumida predominantemente pelas classes sociais menos favorecida, devido a isso se torna indispensável o aumento de conhecimento das técnicas de produção, possibilitando assim, um produto de melhor qualidade, que se possa agregar valores e obtenção de maior amplitude de comercialização dentro das classes sociais e do mercado externo.

A melhoria da qualidade da cachaça passará necessariamente pela padronização de procedimentos que permitam obter produtos de composição semelhante ao longo do processo produtivo. Atualmente, a maioria dos produtores trabalha com caldo de cana bruto, em concentração de açúcar variável e em processo fermentativo de pouco monitoramento quanto as

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Importância econômica da aguardente**

A cachaça, bebida genuinamente nacional produzida praticamente em todo o país, era a bebida destilada mais consumida no mundo (DRINKS INTERNATIONAL, 1994). Entretanto, ela passou a ser a terceira bebida destilada mais consumida no mundo e a primeira no Brasil (ABRABE, 2005).

A produção brasileira de aguardente se encontra na faixa de 1,5 bilhão de litros/ano, entretanto, em 1990, os valores da Carteira de Comércio Exterior do Banco do Brasil (CACEX) demonstraram que o volume de exportação não passava de 0,2 % do produzido, e que apesar da sua tradição e importância, ocorreu um crescimento em direção dos aumentos de produção, sem se preocupar com a qualidade final do produto entregue ao consumidor. A partir dessa data, foram criados grupos de trabalho formados por pesquisadores e técnicos com o objetivo de alertar os produtores para a necessidade de se incrementar medidas que viessem possibilitar a melhoria da qualidade da bebida. Para mudar essa situação foi necessário o desenvolvimento e o fortalecimento de conceitos, sem falar na atualização do sistema e da técnica de produção de aguardente, melhorando a qualidade e a produtividade, resultando em maior lucratividade para o produtor. (MUTTON; MUTTON, 2005).

A exemplo da promoção realizada por outros países, de suas bebidas locais, como é o caso da Tequila no México, no Brasil foi iniciado em 1997 um processo de criação de incentivos oficiais para a promoção da cachaça brasileira no mercado externo, através da implementação do Programa Brasileiro de Desenvolvimento da Aguardente de Cana, Caninha ou Cachaça (PBDAC). Através da divulgação da cachaça em feiras e congressos a Associação Brasileira de Bebidas (ABRABE) procura incentivar a melhoria da qualidade do produto e expandir sua venda no mercado externo. Iniciativas vêm sendo tomadas com o propósito de incentivar os pequenos e médios produtores de cachaça artesanal e adequar o seu produto às exigências de qualidade do mercado externo. (OLIVEIRA et al., 2001).

Os desafios em relação ao mercado externo têm sido basicamente relacionados à conquista de novos mercados e sobrepor a algumas barreiras preexistentes nesse mercado, como é o caso dos EUA que não aceitam a importação do produto com o nome de cachaça no rótulo,

mantendo-o como rum, categoria essa sujeita a taxas de importação mais elevadas além de descaracterizar o produto (MERCADO, 2002).

Setenta por cento da cachaça é consumida pura no Brasil (MORAES, 2001). Os principais países importadores são Alemanha, Portugal e Estados Unidos, respectivamente. Em 2003, o volume exportado foi de 5,2 milhões de litros de cachaça, e em 2004 aumentou para 10,2 milhões de litros (BRASIL, 2005). Atualmente as exportações representam em torno de 1 % da produção total (PBDAC, 2006).

## **2.2 Caracterização da aguardente e da cachaça**

A aguardente de cana possui graduação alcoólica de 38 a 54 % em volume, a 20 °C, obtida de destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) ou pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g L<sup>-1</sup> (BRASIL, 1997).

Cachaça é a denominação típica e exclusiva para aguardente de cana produzida no Brasil (BRASIL, 2001), com graduação alcoólica de 38 a 48 % v/v a 20 °C com características sensoriais peculiares (BRASIL, 2002).

A aguardente de cana ou caninha está submetida à Legislação Nacional (BRASIL, 1974), de responsabilidade do Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAAb), atual MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), que estabelece os denominados padrões de identidade e de qualidade aos quais a bebida deve atender.

Atualmente, a cachaça e a aguardente devem seguir os padrões de identidade e qualidade descritos na Tabela 1 (BRASIL, 2005).

Tabela 1 - Características físicas e químicas para a aguardente de cana-de-açúcar e cachaça, estabelecidas pela legislação brasileira (BRASIL, 2005).

Componente	Unidade	Limite	
		mínimo	máximo
<b>Graduação alcoólica de aguardente</b>	% em volume de álcool etílico a 20 °C	38	54
<b>Graduação alcoólica de cachaça</b>	% em volume de álcool etílico a 20 °C	38	48
<b>Acidez volátil, expressa em ácido acético</b>	mg 100 mL <sup>-1</sup> de álcool anidro	-	150
<b>Ésteres totais, expressos em acetato de etila</b>	mg 100 mL <sup>-1</sup> de álcool anidro	-	200
<b>Aldeídos totais, em acetaldeído</b>	mg 100 mL <sup>-1</sup> de álcool anidro	-	30
<b>Soma de Furfural e Hidroximetilfurfural</b>	mg 100 mL <sup>-1</sup> de álcool anidro	-	5
<b>Soma dos álcoois isobutílico (2-metilpropanol), isoamílicos (2-metil-1-butanol + 3 metil-1-butanol) e n-propílico (1-propanol)</b>	mg 100 mL <sup>-1</sup> de álcool anidro	-	360
<b>Coefficiente de Congêneres*</b>	mg 100 mL <sup>-1</sup> de álcool anidro	200	650

\* Congêneres = (Acidez Volátil + Ésteres + Aldeídos + Furfural + Álcoois Superiores)

De acordo com a Instrução Normativa nº 13 de 30 de junho de 2005, foram definidas quantidades máximas permitidas de alguns contaminantes anteriormente não mencionados como carbamato de etila, acroleína, álcool sec-butílico, álcool n-butílico, chumbo e arsênio, e alteração na concentração máxima permitida para álcoois superiores, que anteriormente era de 300 mg 100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro e passou a 360 mg 100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro. O prazo máximo para adequação e controle dos contaminantes da cachaça, com início na data da publicação da Instrução Normativa nº 13, é de três anos, com exceção do carbamato de etila que é de cinco anos.



Tabela 2 - Teores máximos de contaminantes permitidos por Brasil (2005).

Componente	Unidade	Limite	
		mínimo	Máximo
Álcool Metílico	mg 100 mL <sup>-1</sup> de álcool anidro	-	20
Carbamato de etila	µg L <sup>-1</sup>	-	150
Acroleína (2-propenal)	mg 100 mL <sup>-1</sup> de álcool anidro	-	5
Álcool sec-butílico (2-butanol)	mg 100 mL <sup>-1</sup> de álcool anidro	-	10
Álcool n-butílico (1-butanol)	mg 100 mL <sup>-1</sup> de álcool anidro	-	3
Cobre	mg L <sup>-1</sup>	-	5
Chumbo	mg L <sup>-1</sup>	-	200
Arsênio	µg L <sup>-1</sup>	-	100

No âmbito internacional, a formação e o controle dos compostos secundários de bebidas fermentadas e fermento-destiladas foram extensivamente estudados, nas décadas de 60 e 70 e ainda são objetos de pesquisas, em vários países; (REED; PEPPLER, 1973; SMEDT; LIDDLE, 1978; PUECH, 1983; PIGGOTT, 1989). No Brasil, porém, estas informações ainda não se encontram disseminadas e nem mesmo acessíveis à maioria dos fabricantes, especialmente os que operam em escala artesanal e que respondem por uma parcela significativa da produção nacional (MAIA 1994).

Parâmetros de qualidade ainda são escassos, uma vez que a legislação em vigor pouco rege sobre este atributo, impondo limites para garantia da saúde pública, e que pouco ou nada se refere à qualidade global do produto (RIBEIRO; HORII, 1998).

### 2.3 Caracterização e qualidade da matéria-prima

A matéria-prima para a fabricação da cachaça é a cana-de-açúcar, fator primordial na qualidade do produto e produtividade de uma fábrica de aguardente (RIBEIRO, 2002a). A cana-de-açúcar é uma planta pertencente à classe das Monocotiledôneas, família Poaceae (Gramineae), gênero *Saccharum* e espécie *Saccharum* spp (ANDRADE, 2001).

Stupiello (1992) conceitua qualidade da matéria-prima como o conjunto de características compatíveis com as exigências da indústria que devem atender a uma conjunção de parâmetros tecnológicos e microbiológicos que definam a sua qualidade e tenham influência fundamental no processamento. Segundo Clarke e Legendre (1999), dentre os fatores de qualidade da matéria-prima que influem no rendimento do processo de produção de aguardente estão a variedade, o conteúdo de sólidos solúveis e de açúcares, o teor de impurezas e fibra na cana e os fatores de estresse e deterioração, causados por atraso no processamento.

Na produção de aguardente de qualidade deve ser utilizada a cana colhida sem queima e processada no mesmo dia; isto se deve ao fato de que quando a cana é queimada para efetuar o corte, há uma modificação considerável na fisiologia do colmo, dependendo da intensidade do fogo e da temperatura ambiente por ocasião da queima. A perda de açúcares pode atingir 14,5 % e pode ser resultante da exsudação após a queima; além de causar a inversão gradativa do açúcar pelas enzimas hidrolíticas no colmo e causar um incremento na contaminação microbiana pela multiplicação no líquido exsudado e impregnação de partículas do solo na superfície do colmo. Ainda pode ocorrer a deterioração por transpiração, resultando depreciação do produto e favorecendo a ação microbiológica (YOKOYA, 1995).

O planejamento de colheita na cultura da cana-de-açúcar se baseia no conceito de que a cana tem uma época, durante o ano, onde ocorre máxima concentração de sacarose nos colmos, em maturação fisiológica completa ou bastante avançada (COPERSUCAR, 1983). A maturação, processo fisiológico envolvendo a síntese dos açúcares nas folhas, translocação dos produtos formados e estocagem da sacarose no colmo (amadurecimento), é um dos principais fatores da variação da composição tecnológica da cana-de-açúcar (PARAZZI, 1988).

De acordo com Brieger (1968) a cana-de-açúcar deve ser colhida e industrializada quando atingir teores mínimos de açúcares suficientes para permitir a sua extração e transformação em produtos comerciais, como a aguardente, por exemplo.

O período de safra da cana-de-açúcar no Brasil atinge cerca de 150 dias (BRIEGER; PARANHOS, 1964). Tal período é determinado em função de diversos fatores, destacando-se, entre eles, os teores de sacarose e os de açúcar redutores, contidos no caldo (Van DILLEWJN, 1952, BONNET, 1962; BRIEGER; PARANHOS, 1964; ALEXANDER, 1973). Por essa razão, não se recomenda iniciar a colheita para a produção de açúcar, enquanto as canas não atingirem os padrões tecnológicos mínimos para a sua industrialização (COPERSUCAR, 1980).

Em função das condições climáticas no Brasil têm-se duas épocas de colheita e moagem da cana-de-açúcar e álcool. No chamado Norte Açucareiro (Estados da Região Nordeste), a safra inicia-se em agosto/setembro e vai até março/abril. No Sul Açucareiro (Estados produtores do centro-sul, incluindo Minas Gerais) a safra inicia-se em maio e se estende até novembro/dezembro. São essas também as principais épocas para produção de aguardente, já que nesse período a cana se apresenta madura, o que resulta em melhores rendimentos (ANDRADE, 2001).

A Figura 1 representa as diferentes épocas de maturação e colheita na cultura da cana-de-açúcar. O período de maturação da cana-de-açúcar na maioria das variedades tem pico em agosto e setembro.

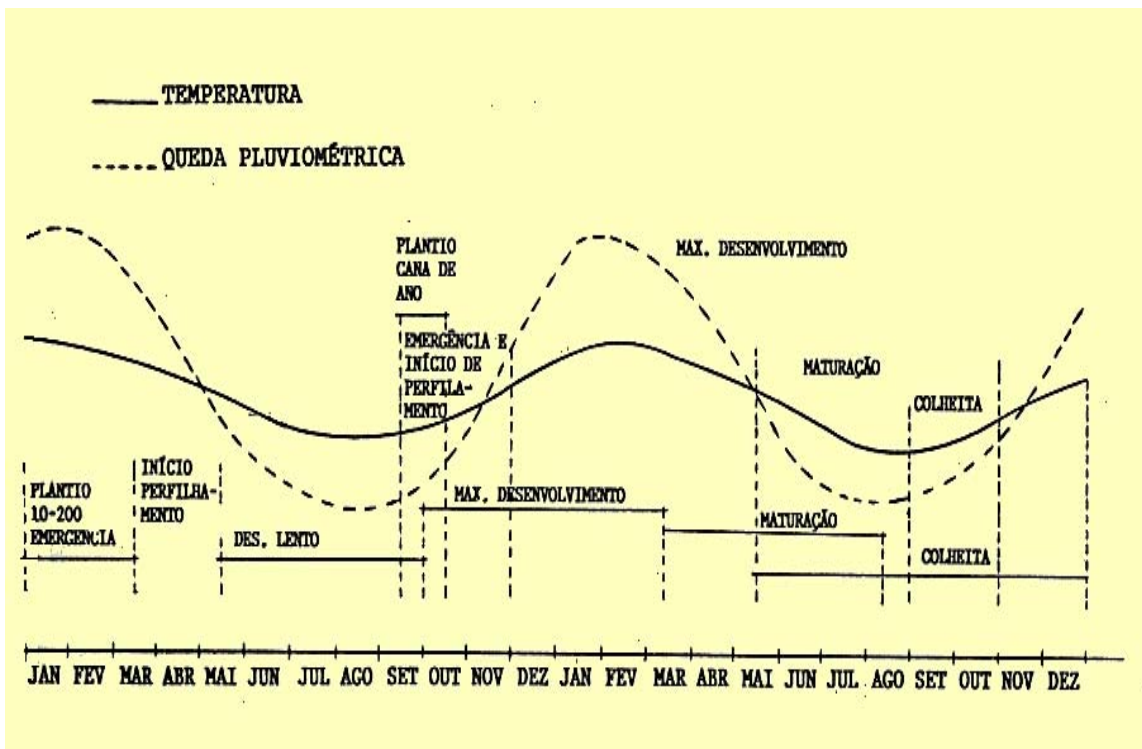


Figura 1. Ciclo da cana-de-açúcar e variações climáticas da região centro sul.

Fonte: Material dado em aula (HORII, 2004).

A partir da curva de maturação da variedade, pode-se classificá-la em precoce, média ou tardia, em termos de início de maturação, Figura 2a, (FERNANDES, 1977 apud SILVA, 2003). Com base nesse conceito, são estabelecidas as proporções de plantio de cada variedade.

Entretanto, deve ser salientado que a curva de maturação observada para a pol da cana tem estreita relação biológica com os teores de sólidos solúveis (brix) e com os açúcares redutores da cana-de-açúcar (Fig. 5b).

As variedades de curto período de crescimento e que amadurecem mais cedo, a maturação é acelerada, e as variedades com período de crescimento mais longo, a maturação é retardada. Com base nesse fato, as variedades foram classificadas em precoces, médias e tardias (Fig. 5a).

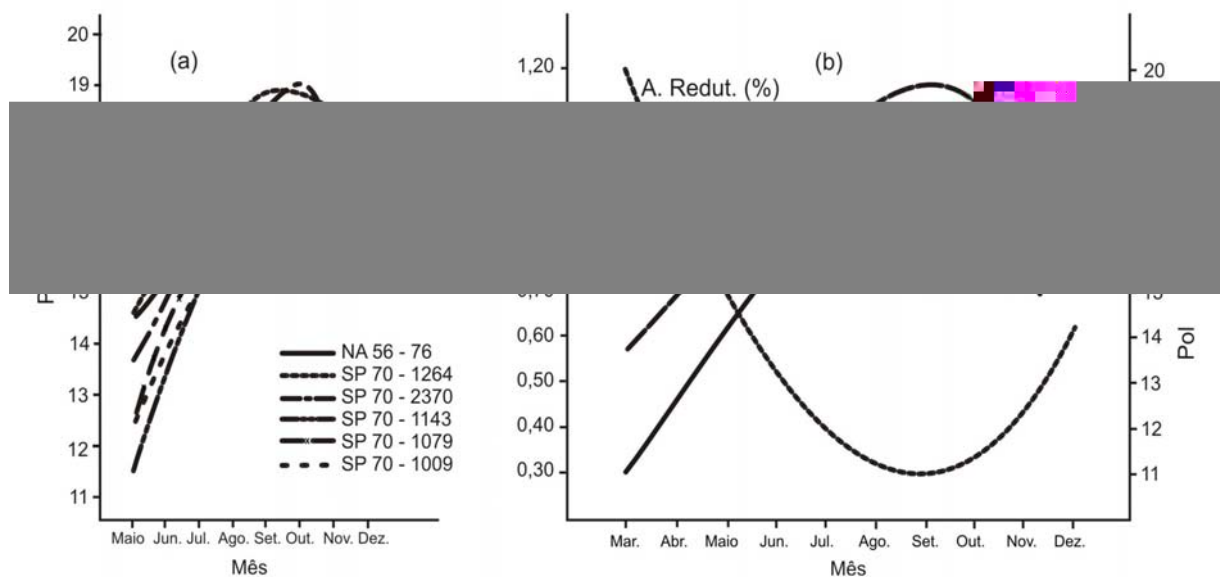


Figura 2 - Influência da maturação dos colmos na acumulação de sacarose (pol) da cana-de-açúcar: a) efeito varietal (FERNANDES, 1977)<sup>1</sup>; b) interações com outros parâmetros tecnológicos (brix e açúcares redutores) na safra.

Fonte: Silva et al. (2003).

### 2.3.1 Produção de etanol através de outras fontes

Nos países em que não há produção de cana-de-açúcar outras matérias-primas são utilizadas na produção de álcool etílico e de bebidas alcoólicas. As mais utilizadas são as frutas e os cereais.

<sup>1</sup> FERNANDES (1977) apud SILVA, et al. (2003).

Os sucos de frutas são geralmente boa fonte de açúcares fermentescíveis, e as frutas são desta forma, usadas como matéria-prima para a produção de bebidas alcoólicas, devido a sua relativa abundância, alto conteúdo de açúcar e baixo custo, fazem das uvas uma escolha favorável (WATSON, 1989). Outras matérias-primas começaram a serem utilizadas, mesmo aquelas não diretamente fermentescíveis como os cereais. Atualmente os cereais são amplamente utilizados na produção de algumas bebidas alcoólicas, como a cerveja, o uísque, saquê, dentre os quais podemos citar: o milho, a cevada, o trigo, o centeio, entre outros (COLE; NOBLE, 1995).

O milho é bastante utilizado em virtude de seu alto teor de amido, e é produzido em grande escala nos Estados Unidos, e representa matéria-prima básica para a produção de uísque e outras bebidas. O álcool de milho é um produto de alta qualidade, próprio para a produção de bebidas finas, setor em que seu emprego pode ser largamente ampliado. Quando colhido apresenta uma composição média de: 10,93 % de umidade, 9,88 % de proteína, 4,17 % de matéria graxa, 71,95 % de hidratos de carbono, 1,71 % de fibras e 1,36 % de matéria mineral, além de vitaminas e outros elementos nutritivos (TEIXEIRA, 1966).

Os cereais apresentam a vantagem de poderem ser armazenados, e quando armazenados de forma correta não há melhoria na qualidade do grão, mas a manutenção da mesma (SANTOS et al., 1994), assim, as características e a qualidade do grão são mantidas, possibilitando a produção de bebidas utilizando a mesma matéria-prima durante todo o ano e não apenas durante os meses de safra, como ocorre com a cana-de-açúcar, variando a qualidade em função do estágio de maturação, da variedade, das condições edafoclimáticas, entre outras.

## **2.4 Fatores relacionados ao processo fermentativo**

A fermentação alcoólica é a fase na qual são produzidos os principais componentes químicos da aguardente, sendo que muitos dos quais podem influenciar no aroma e no sabor da bebida, conseqüentemente, na caracterização e na qualidade (SUOMALAINEN; LEHTONEN, 1979).

O açúcar que se encontra no mosto é utilizado pela levedura para a produção de etanol, gás carbônico, massa celular, ácidos succínico e acético, glicerol, álcoois superiores, ésteres, aldeídos, entre outros produtos.

As leveduras são microrganismos eucariontes (possuem estrutura interna complexa), unicelulares, desprovidos de clorofila e podem ser encontrados em quase todo lugar no ambiente.

A habilidade de converter açúcares em etanol é característica de um pequeno grupo de microrganismos, sendo *Saccharomyces cerevisiae*, dentre as leveduras, a que mais se destaca pela alta produção e tolerância a concentrações elevadas de etanol (SCHWAN; CASTRO, 2001).

Segundo Ribeiro et al. (1987), as células de leveduras apresentam necessidades nutricionais durante o processo de fermentação alcoólica, influenciando diretamente na multiplicação e no crescimento celular e também na eficiência da transformação de açúcar em álcool. O nitrogênio devido a sua importância para as leveduras é considerado um elemento essencial para a multiplicação e crescimento das leveduras. Este nutriente entra como constituinte de várias substâncias orgânicas encontradas nas leveduras, como os aminoácidos, proteínas, enzimas, pirimidinas, purinas, pigmentos respiratórios (citocromos), lecitina, vitaminas e cefalina (WHITE, 1954).

Mudanças durante o processo fermentativo são fundamentais na obtenção de bebida de qualidade, pois promovem uma mudança na proporção dos componentes não-álcoois, que formam o “bouquet” característico da bebida (LIMA, 1964).

#### **2.4.1 Condução da fermentação visando à produção de aguardentes**

Para que ocorra uma vigorosa fermentação, é necessário que as exigências nutricionais da levedura (fermento) sejam supridas, permitindo, assim, a produção e garantindo a viabilidade celular (SCHWAN; CASTRO, 2001).

O preparo do mosto envolve operações que permitem melhorar as condições de fermentação do caldo de cana. Inicia-se pela sua filtração e decantação, com ajustes no teor de açúcar, acidez, nutrientes e temperatura (RIBEIRO, 2002a).

A preparação da cana para a moagem não é feita nas pequenas destilarias porque exige equipamento especial que eleva muito o investimento (LIMA, 1999a), e para o preparo do mosto o caldo de cana proveniente da moenda é filtrado em tela fina (“peneiras”), passando em seguida por decantador, para eliminar a terra e o bagacilho. Na filtração, são eliminados os pedaços maiores de bagaço arrastados com o caldo. O bagacilho, partículas de terra e outras impurezas menores, são extraídos durante a decantação. As impurezas do caldo são fontes de infecções na fermentação, provocando o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis. O bagacilho além de favorecer as contaminações, quando arrastado para o alambique, provoca a formação indesejável de furfural e metanol (RIBEIRO, 2002b).

Assim como nos laboratórios não é imprescindível a esterilização do caldo, por aquecimento a temperaturas letais para os microrganismos presentes, porém esse procedimento é caro para aplicação industrial, e sobretudo em pequenas instalações (LIMA, 1999a).

Na fabricação artesanal de cachaça, os produtores utilizam leveduras “selvagens”, ou seja, que já se encontram na superfície dos colmos (RIBEIRO, 2002b), as quais são provenientes da manipulação na colheita, transporte e moagem da cana (SCHWAN; CASTRO, 2001). Porém a quantidade de leveduras selvagens na cana é pequena, razão principal dos insucessos que ocorrem na prática quando se prepara o inóculo (pé inicial, pé-de-cuba ou pé de fermentação) pelo chamado processo caipira (LIMA, 1999b). As espécies de leveduras presentes variam de região para região, sendo afetadas principalmente pelas variedades de cana utilizadas, pelas condições climáticas da região e pelas peculiaridades operacionais de cada produtor (RIBEIRO, 2002c). O fermento caipira nada mais é que o resultado do aproveitamento das leveduras naturais do mosto de forma concentrada, mediante certos tratamentos cuja finalidade é ativar a sua multiplicação (LIMA, 1999b).

No processo de produção da cachaça artesanal, os produtores não utilizam ingredientes químicos. Todos os nutrientes originam-se de fontes naturais. O fubá e o farelo de arroz são os nutrientes mais empregados. Alguns produtores utilizam exclusivamente o caldo de cana (RIBEIRO, 2002d).

Nas pequenas destilarias é costume preparar, no início de cada safra, apenas um pé de fermentação e depois seguir o trabalho normal “cortando”, ou seja, dividindo o mosto em fermentação para diversas dornas, entretanto, embora seja de uso generalizado, não é o melhor meio de iniciar a safra (LIMA, 1999b).

No preparo do pé-de-cuba “selvagem” é utilizado o farelo arroz, o fubá de milho, caldo de limão ou de laranja azeda e existe ainda a possibilidade de se alterar o modo de preparo alterando-se a quantidade dos ingredientes utilizados. Apesar de neste método serem fornecidos todos os nutrientes (proteínas, vitaminas) e condições físicas (acidez e temperatura) propícias para o desenvolvimento de leveduras, ocorrem dois inconvenientes seriíssimos. O primeiro deles é que, aliado às leveduras, o número de microrganismos contaminantes será enorme, podendo, assim, interferir na qualidade e produtividade da fermentação. E a outra desvantagem deste método é a mão-de-obra e o tempo necessário para que o “pé-de-cuba” obtido tenha quantidade suficiente de leveduras para iniciar a fermentação alcoólica (SCHWAN; CASTRO 2001).

Em geral, a fermentação pode ser conduzida por três diferentes sistemas: convencional em batelada, descontínuo-alimentado e contínuo, que são escolhidos pelos produtores de acordo com o tipo de indústria. O método convencional é o comumente adotado pelos produtores de aguardente artesanal e consiste em colocar o inóculo e todo o meio a ser fermentado juntos na dorna de fermentação. Após 24 horas, destila-se o produto, lava-se a dorna e inicia-se novo processo. Esse método interfere significativamente no metabolismo das leveduras, fazendo com que as células sejam mais sensíveis aos efeitos tóxicos do etanol. No sistema de bateladas sucessivas, há o aproveitamento do fermento em várias fermentações subseqüentes. No sistema descontínuo alimentado, a dorna é alimentada aos poucos, de modo que mantenha um teor de açúcar pré-estabelecido e inferior ao utilizado no sistema de batelada. No processo contínuo, alimenta-se a dorna com fluxo contínuo de substrato, em concentração conveniente, e retira-se também de forma contínua parte do líquido (sem levedura) a ser destilado (SCHWAN; CASTRO 2001).

#### **2.4.2 Linhagens**

A influência das espécies ou linhagens de leveduras na formação de compostos do aroma (ésteres, álcoois superiores, aldeídos, ácidos graxos, entre outros) em fermentação de diferentes bebidas alcoólicas, tais como vinho, cerveja, uísque, conhaque e rum, é de relativa importância (NYKÄNEN; NYKÄNEN, 1977; SOLES et al., 1982; CABRERA et al., 1988; GIUDICI et al., 1990; MATEO et al., 1991; LONGO et al., 1992; MATEO et al., 1992; LURTON et al., 1995).

As condições de fermentação e as leveduras são apontadas como os fatores que mais influenciam o sabor das bebidas alcoólicas (SUOMALAINEN, 1971; SUOMALAINEN; LEHTONEN, 1979). Suomalainen e Nykänen (1966) relatam que os mesmos compostos aparecem como principais componentes nas diversas bebidas alcoólicas, independentemente da matéria-prima utilizada, o que evidencia a importância das leveduras na formação do sabor das bebidas alcoólicas. Segundo Lehtonen e Jounela-Erikson (1983), a natureza e a quantidade dos compostos formados na fermentação são grandemente afetadas pelas condições de fermentação, tais como a temperatura e nutrientes do meio de fermentação.

Suomalainen e Nykänen (1966) estudaram a capacidade de leveduras comerciais de *S. cerevisiae* sintetizar vários compostos de aroma em meio sintético contendo sacarose como fonte de carbono sem adição de nitrogênio. Os autores verificaram grande similaridade entre a



composição qualitativa das substâncias voláteis presentes nos destilados desta fermentação com a dos destilados obtidos na produção do uísque de origem escocesa, embora certas diferenças quantitativas fossem evidentes. Estas similaridades indicaram que as leveduras eram as responsáveis pela maior parte dos compostos aromáticos produzidos.

Suomalainen (1971) relata que dentro de um grupo de mais de 100 componentes voláteis verificou-se que as mesmas substâncias aparecem na fração de componentes do aroma em cervejas, vinhos e bebidas destiladas. Em vista disso, parece evidente que a matéria-prima utilizada na produção de bebidas contribui de maneira limitada para o aroma.

Diferentes espécies e linhagens de leveduras são responsáveis por elevada variabilidade (até cinco vezes) na concentração de álcoois superiores em cerveja Engan (COLE; NOBLE, 1995).

Segundo Korhola et al., (1989), as espécies e linhagens de leveduras diferem na sua capacidade de produzir álcoois superiores. Giudici et al. (1990) examinaram a capacidade de produzir álcoois superiores em 100 linhagens de *S. cerevisiae* e verificaram que para as linhagens testadas a produção de álcoois superiores é uma característica individual e as diferenças foram estatisticamente significativas. Parfait e Jouret (1975) mostraram que *S. pombe* produz relativamente pouca quantidade de álcool fúsel.

Na produção de uísque, assim como em outras bebidas alcoólicas, são utilizadas para fermentação, leveduras específicas como *Saccharomyces cerevisiae*, enquanto o malte e outros cereais podem estar contaminados com uma grande variedade de organismos, leveduras e bactérias (WATSON, 1981, 1984).

Na produção de cidra, *Saccharomyces cerevisiae* não era a principal levedura constituinte da microflora das maçãs, por isso leveduras não pertencentes à *Saccharomyces* ssp. predominavam no início das fermentações, pois se multiplicavam rapidamente produzindo gás e álcool e uma variedade de distintos sabores, e também, favoreciam as contaminações bacterianas necessitando o uso de SO<sub>2</sub>. Com o aumento do nível de álcool, esses microrganismos começavam a morrer e a microbiota sucessiva era tomada por *Saccharomyces uvarum*; essa levedura era responsável por completar a conversão de todo açúcar em álcool e pela geração de vinhos com melhores sabores (LEA, 1995).

Atualmente poucos produtores de cidra no Reino Unido esperam pela estabilização natural de *Saccharomyces*. Culturas específicas de leveduras têm sido adicionadas aos meios de

fermentação para a produção de cidra, sendo que, inicialmente elas eram isoladas das próprias fábricas dessa bebida, enquanto que outras companhias fizeram uso de conhecidas leveduras de vinho de instituições de pesquisa mundial. Além da habilidade dessas leveduras se multiplicarem rapidamente e de dominarem a fermentação, elas foram recomendadas, pois estão livres de contaminação ou da produção de sulfeto de hidrogênio, e da capacidade de flocular e compactar-se no final da fermentação (LEA; DRILLEAU, 2003).

Leveduras secas de vinho têm sido amplamente utilizadas na indústria de cidra no Reino Unido; em termos comerciais a tecnologia de preparo e armazenagem dessas leveduras tem sido perfeita. Entre as leveduras que se destacam estão “Uvaferm” CM e BC Lalvin” EC1118 e “Siha” Número 3. O uso de inóculos contendo *S. bayanus* e *S. uvarum* é uma prática utilizada mundialmente, pois a primeira levedura promove um começo rápido, mas a segunda se adapta melhor ao ambiente seco promovido pela escassez de açúcar (LEA; DRILLEAU, 1995).

As linhagens de levedura *Saccharomyces bayanus* e *S. uvarum* são usadas no início das fermentações na produção de vinhos em mostos de baixa acidez, pois sintetizam os ácidos málico e succínico (RAINIERI et al., 1998), inibindo a fermentação malolática (CARIDINI; CORTE, 1997) e produzindo mais glicerol do que *Saccharomyces cerevisiae* e menos ácido acético e etanol (BERTOLINI et al., 1996; CASTELLARI et al., 1994).

Com a utilização dessas leveduras é possível diminuir a quantidade de sulfitos adicionados para estabilização de vinhos (CARIDINI; CORTE, 1997), sendo uma grande vantagem para os consumidores sensíveis ao sulfito. *Saccharomyces bayanus* e *S. uvarum* também são descritos por diferentes autores como sendo uma linhagem que produz altas concentrações de compostos voláteis, assim como beta-phenylethanol e seus acetatos (SERRA et al., 2005).

### **2.4.3 Contaminação**

Em destilarias de álcool é importante se avaliar os microrganismos contaminantes e seus reflexos sobre o processo fermentativo (CAMOLEZ; MUTTON, 2005). Para Oliva-Neto e Yokoya (1997) os maiores prejuízos causados pela contaminação bacteriana são a degradação da sacarose e a formação de ácidos orgânicos que ocasionam a perda de açúcar e intoxicação das leveduras.

A contaminação por microrganismos deteriorantes geralmente leva a impedimentos tecnológicos no processo de maltagem e na produção de cervejas, incluindo a deterioração de material cru, problemas na filtração e outros efeitos deletérios, tanto no processamento quanto no produto final, a cerveja. Dentre esses efeitos incluem-se turbidez na cerveja e a formação de sabores e aromas indesejáveis (HAIKARA; LAITILA, citados por LOWE et al., 2005).

#### **2.4.3.1 Contaminação por leveduras**

Cabrini e Gallo (1999) definiram levedura contaminante como qualquer levedura presente no processo fermentativo que não seja aquela selecionada para a condução da produção de álcool, que atuam prejudicando o processo fermentativo, causando problemas operacionais e aumentando o tempo de fermentação.

Segundo Camolez e Mutton (2005), a presença de contaminantes na fermentação resulta em sérios prejuízos para as leveduras refletindo-se de modo direto sobre a produtividade e o rendimento do processo fermentativo. Em experimento visando a produção de álcool, houve maior formação de glicerol e de ácidos totais como resultado das contaminações e/ou desvios no metabolismo das leveduras, assim como queda no rendimento fermentativo.

#### **2.4.3.2 Contaminação por bactérias**

Segundo Alcarde e Yokoya (2003) a contaminação bacteriana é um dos fatores preponderantes dentre aqueles que afetam a fermentação alcoólica industrial, posto que é o mais freqüente agente presente.

O crescimento de bactérias acéticas em uvas ou através do processo de produção de vinhos influencia a qualidade do vinho, principalmente porque ela aumenta a acidez volátil. Embora outros microrganismos do vinho, assim como leveduras e bactérias lácticas possam produzir ácido acético, populações significantes de bactérias acéticas são as maiores responsáveis pela produção desse ácido em vinho (GONZÁLEZ et al., 2005). E o crescimento excessivo delas no mosto pode fazer com que a fermentação alcoólica não se complete (DRYSDALE; FLEET, 1988,1989).

As bactérias lácticas, tanto na forma de cocos (*Streptococcus* e *Leuconostoc*) como em bastonetes (*Lactobacillus*) tem mostrado mais atuantes na fermentação alcoólica (AMORIM;

OLIVEIRA, 1982). A presença dessas bactérias causa incremento na acidez do vinho pela produção de ácidos láctico e acético e acarretam quedas na percentagem de células vivas das leveduras e do rendimento alcoólico (ALTERTHUM et al., 1984).

Oliveira-Freguglia e Horii (1998), demonstraram que a contaminação por *L. fermentum* causa floculação, além de ter grande influência sobre a viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae*, podendo reduzir a valores próximos a 0 em cerca de 12 horas após o término da fermentação alcoólica. Um fator de relevante importância, é que a toxidez de seus produtos metabólicos se manifesta mesmo atenuada por um tratamento térmico ou antimicrobiano.

#### 2.4.4 Temperatura

A temperatura é indiscutivelmente um dos parâmetros mais importantes que afetam a fermentação (FLEET; HEARD, 1993; KILLIAN; OUGH, 1979; SUOMALAINEN; LEHTONEN, 1979; WATSON, 1987). A temperatura influencia no metabolismo da levedura e na produção de compostos voláteis (FLEET; HEARD, 1993; KILLIAN; OUGH, 1979; SUOMALAINEN; LEHTONEN, 1979). O perfil aromático dos vinhos é resultante destes componentes que são formados e retidos, a maior parte deles, durante a fermentação, desde que estejam presentes em concentrações elevadas (PRETORIUS, 2000). As baixas temperaturas reduzem o crescimento de bactérias acéticas e lácticas, facilitando o controle da fermentação alcoólica (MEURGUES, 1996).

A indústria de vinho tem se preocupado consideravelmente em controlar a temperatura de fermentação. Vinhos produzidos a baixas temperaturas (10-15 °C) são conhecidos por desenvolverem certas características de sabor e aroma (FEUILLAI et al., 1997; JACKSON, 1994), além de aumentar a duração da fermentação alcoólica, por diminuição da velocidade de crescimento da levedura e modificando a ecologia da fermentação do vinho. A competição por nutrientes durante fermentações a baixas temperaturas é maior entre as leveduras inoculada e as selvagens (FLEET; HEARD, 1993), podendo levar à paralisação da fermentação (LLAURADÓ, 2002).

As leveduras selvagens, não pertencentes à espécie *Saccharomyces cerevisiae* contribuem significativamente para as fermentações conduzidas abaixo de 20 °C, de modo que essa influência ecológica deveria ser refletida na composição química e sensorial do vinho (FLEET; HEARD, 1993; LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000). Embora baixas temperaturas de

fermentação tenham interessantes aplicações na indústria de produção de vinhos, existe também um efeito adverso no crescimento celular, porque ela aumenta o estresse da levedura durante a produção de vinho (BAUER; PRETORIUS, 2000), o qual pode ser controlado inoculando-se leveduras selecionadas na fermentação alcoólica (FEUILLAT et al., 1997).

Embora não se saiba exatamente o que causa a paralisação da fermentação alguns fatores importantes são: composição do mosto, que é determinado pela variedade da uva, clima, entre outros, e práticas tecnológicas como clarificação do mosto e a temperatura de fermentação (INGLEDEW; KUNKEE, 1985; AYESTARAN et al., 1995).

A realização da fermentação em temperaturas baixas, demonstra como efeito inicial, o prolongamento da fase Lag (NOVO et al., 2003).

Existem evidências que mostram que as células de levedura possam se adaptar ao estresse provocado pela queda de temperatura. A composição da membrana lipídica é modificada para corrigir as mudanças de fluidez causadas por baixas temperaturas (SUUTARI et al., 1990). A membrana composta por ácidos graxos é principalmente variável e influenciada por vários fatores como a temperatura, oxigênio, limitação de nutrientes e taxa de crescimento (HUNTER; ROSE, 1972; RATLEDGE; EVANS, 1989). A membrana de composição lipídica das leveduras, assim como em outros microrganismos, muda de acordo com as variações de temperatura; quanto menor a temperatura, mais insaturada é a membrana de composição lipídica (WATSON, 1987). Alguns outros metabólitos e atividades enzimáticas se modificam a baixas temperaturas de fermentação, como o glicerol (RANKINE; BRIDSON, 1971; CASTELLARI et al., 1995), e alguns carboidratos de reserva como a trealose ou glicogênio, (NOVO et al., 2003; THEVELEIN, 1998), assim como a assimilação e metabolismo do nitrogênio.

A adaptação de alguns meios e temperaturas antes da inoculação pode afetar não apenas a habilidade das células sobreviverem, mas também a qualidade e a composição dos vinhos (LLAURADÓ et al., 2002).

No experimento conduzido entre linhagens de *Saccharomyces* e dois níveis de temperatura, 13 e 25 °C, Torija et al. (2003), demonstraram que nas fermentações a 13 °C, *S. bayanus* teve as mais altas concentrações de ácidos graxos de cadeia média e foi a única linhagem que mostrou diferenças significativas entre as duas temperaturas durante toda fermentação. As maiores concentrações de compostos voláteis foram detectadas entre as fermentações conduzidas às baixas temperaturas. Porém isso não foi observado em *S. cerevisiae*,

onde as quantidades de compostos voláteis no vinho final foram similares às duas temperaturas. A maior diferença dentre os compostos voláteis produzidos entre as espécies foi a produção de 2-phenyl-ethanol. *S. bayanus* produziu três vezes mais comparando com *S. cerevisiae*, o qual geralmente é produzido durante os primeiros estágios de fermentação. A produção de acetatos, ésteres de etila e ácidos graxos de cadeia média foi máxima em *S. cerevisiae* a 13 °C.

## 2.5 Carbamato de etila

O carbamato de etila (CE) ou uretana é um composto considerado potencialmente carcinogênico. O Canadá foi o primeiro país a ter legislação específica sobre o assunto se tornando um referencial para os Estados Unidos e a Comunidade Européia, seguindo assim, o teor máximo deste contaminante estabelecido para bebidas destiladas. O Brasil sendo um dos maiores produtores de destilados alcoólicos do mundo torna-se imprescindível o conhecimento dos níveis de ocorrência do carbamato de etila nos destilados e principalmente na cachaça, pois além dos aspectos ligados à saúde pública, a sua presença em concentrações superiores a  $150 \mu\text{g L}^{-1}$  constitui uma barreira para exportações para a Europa e América do Norte (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002).

O carbamato de etila é formado nas bebidas destiladas por diferentes vias, podendo ser pela reação entre o etanol e 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 (OUGHT et al., 1988; STEVENS; OUGHT, 1993; TEGMO-LARSSON; SPITTLER, 1990).

Nas bebidas destiladas o carbamato de etila é encontrado em altas concentrações nas aguardentes de frutas, entretanto o problema não está somente na fermentação ou durante a destilação, mas no próprio destilado (AYLOTT et al., 1990; MacKENZIE et al., 1990; RIFFIKIN et al. 1989).

Riffikin et al. (1989) estudaram a formação de carbamato de etila durante a destilação de uísques. As destilações foram realizadas em alambique feito totalmente de cobre e em destilador feito totalmente de vidro, e verificaram que a formação de CE ocorreu somente quando a destilação foi realizada em presença de cobre. O aumento dos níveis naturais de carbamato de etila após a destilação, ocorreu apenas quando o cobre esteve presente durante e após a destilação, e esta foi dependente do tempo; quanto maior o tempo de armazenamento, maior a

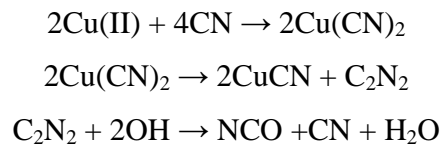
formação de carbamato de etila. No fermentado destilado em equipamento de vidro, nenhuma formação significativa de carbamato de etila ocorreu, ficando abaixo de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ .

O mecanismo de formação de carbamato de etila é dependente do contato do cobre com alguns compostos protéicos presentes no mosto, durante a destilação nas fases líquidas e vapor (RIFFKIN a;b, 1989).

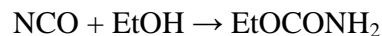
Andrade-Sobrinho et al. (2002) analisaram 126 amostras de aguardentes de cana de diferentes regiões produtoras no país e verificou que o teor médio de carbamato de etila foi de  $0,77 \text{ mg L}^{-1}$ , variando de  $0,013$  a  $5,7 \text{ mg L}^{-1}$  e que apenas 21 % das amostras analisadas apresentaram teores menores que  $0,150 \text{ mg L}^{-1}$ , valor considerado internacionalmente aceitável. Tendo como um dos fatores responsáveis por essa variação a influência do sistema de destilação empregado. Devido à necessidade de aumentar os valores de produção, muitos produtores abandonaram o sistema de destilação tradicional em alambique (sistema descontínuo) e adotaram a destilação em coluna (sistema contínuo), os quais diferem não apenas no sistema de destilação, mas também da natureza do material utilizado na confecção dos aparelhos destiladores. As amostras destiladas em alambique apresentaram um maior percentual de amostras com teor de carbamato de etila menor ou igual a  $0,150 \text{ mg L}^{-1}$  e nas faixas de  $0,401 - 1,00 \text{ mg L}^{-1}$  e acima de  $1,00 \text{ mg L}^{-1}$  notou-se um crescente aumento percentual das amostras destiladas em coluna.

Isto provavelmente é conseqüência não apenas do sistema de destilação em si, mas do material empregado na confecção dos aparelhos destiladores. A maior parte dos alambiques é construída de cobre, enquanto as colunas são de aço inoxidável.

Com o objetivo de melhorar as características sensoriais das bebidas destiladas em colunas feitas exclusivamente em aço inoxidável, empregou-se partes em cobre no aparelho destilador, assim as propriedades organolépticas negativas são notadamente diminuídas (FARIA, 1993). Por outro lado pode favorecer consideravelmente a formação de carbamato de etila, pois o ácido cianídrico, não sendo fixado na coluna (parte ascendente do fluxo) atinge o condensador, complexando-se com os íons  $\text{Cu(II)}$  originados da corrosão do condensador pelos vapores ácidos da bebida. Através da redução do  $\text{Cu(II)}$  a  $\text{Cu(I)}$  e com a formação de cianogênio, seguido de seu desproporcionamento, ocorre a formação de íons cianato (BEATTIE; POLYBLANK, 1995).



Os íons cianato por reação com etanol produzem o carbamato de etila:



Quando o cobre é empregado na parte ascendente do fluxo, como ocorre nos alambiques, é esperado que ocorra uma fixação de cianeto (MacKENZIE et al., 1990), com a formação de compostos como: CuCN, Cu(CN)<sub>2</sub>, Cu<sub>2</sub>(CN)<sub>3</sub>, Cu<sub>3</sub>(CN)<sub>4</sub>, diminuindo a concentração de cianeto no destilado (BOSCOLO, 2001) e conseqüentemente, reduzindo o teor de carbamato de etila (ANDRADE-SOBRINHO, 2002).

Vários fatores são importantes para a formação de carbamato de etila em bebidas destiladas, porém ainda não existe uma explicação satisfatória sobre a sua influência nas cachaças (ANDRADE-SOBRINHO, 2002).

## 2.6 Compostos voláteis

Na fermentação bem sucedida praticamente todo o açúcar é convertido em etanol, é normal que uma pequena porcentagem seja convertida em outros sub-produtos (BERRY; SLAUGHTER, 1995).

Embora diferentes bebidas possam ser facilmente distinguidas uma das outras organolepticamente, métodos analíticos não revelam maiores diferenças em sua composição química, a diferença mais importante aparece no conteúdo quantitativo desses compostos nas diferentes bebidas (SUOMALAINEN; LEHTONEN, 1978).

### 2.6.1 Álcoois superiores

Álcoois superiores são importantes componentes para a formação do aroma e sabor de bebidas alcoólicas, porém, dificultam a destilação dos vinhos, entretanto, poucas pesquisas



desenvolvidas com aguardentes deram ênfase à formação de álcoois superiores na fermentação alcoólica de caldo de cana (CHERUBIN, 1998).

Os álcoois superiores são conhecidos por apresentarem um impacto negativo na qualidade final do vinho. A formação desses álcoois é dependente da temperatura de fermentação (ETIEVANT, 1991). Um aumento na temperatura de fermentação resulta num aumento da concentração total de álcoois produzidos (BARDI et al., 1997).

Segundo Webb e Ingraham (1963) e Almeida e Barreto (1973), o óleo fúsel é obtido na fração de ponto de ebulição entre 90 e 150 °C da destilação de um meio fermentado, sendo composto principalmente pelos álcoois: isoamílicos (3 metil butanol-1), amílico (2 metil butanol - 1) e n-propílico. Suomalainen e Nykänen (1966) complementam que a quantidade desses álcoois representa apenas 0,05 a 0,15 % do açúcar consumido pelas leveduras durante a fermentação alcoólica.

As leveduras são capazes de sintetizar todos os aminoácidos necessários para seu crescimento e, de maneira geral, com o aumento do fornecimento de fonte nitrogenada, ocorre redução na produção de álcoois superiores (ÄYRAPÄÄ, 1967; SUOMALAINEN; KAHANPÄÄ, 1963).

Webb e Ingraham (1963) relatam que Ehrlich, em 1907, observou que os álcoois superiores são formados a partir dos aminoácidos, pois constatou que a adição de leucina durante a fermentação alcoólica estimulou a produção de álcool isoamílico. Contudo, o fornecimento de fonte de nitrogênio inorgânico inibiu a produção do óleo fúsel. No mesmo trabalho, também citam que em 1911, Neubauer e Fromherz estudaram o mecanismo de formação de álcoois superiores e propuseram que os aminoácidos são desaminados com produção de cetoácidos, os quais são descarboxilados e reduzidos, produzindo álcoois superiores em cadeia carbônica com um carbono a menos que o correspondente aminoácido de origem.

A produção de álcoois superiores pode ser uma característica das linhagens das leveduras, para esclarecer esse fato, Webb e Kepner (1961) estudaram a formação de álcoois superiores por algumas linhagens de leveduras e relataram diferenças principalmente em relação aos teores de álcool n-propílico.

### 2.6.2 Ésteres

Os ésteres constituem a maior classe dos compostos aromáticos nas bebidas alcoólicas, e são produzidos pelas leveduras durante a fermentação numa reação entre os álcoois, produzidos durante a fermentação pelas leveduras, e acil co-enzima A (Co A), a qual é formada pela ativação do ácido correspondente com o auxílio do ATP. A Acetil-CoA é resultante da descarboxilação oxidativa do ácido pirúvico e a próxima reação não requer ATP mas ácido lipóico, pirofosfato de tiamina e NAD (NORDSTRÖM, 1963; PEDDIE, 1990).

Vários fatores influenciam na concentração de ésteres no vinho, como: nível de oxigênio; temperatura e pH de fermentação; linhagem da levedura (KILLIAN; OUGHT, 1979; NYKÄNEN; NYKÄNEN, 1977; RAMSAY; BERRY, 1984).

O éster mais abundante encontrado nas bebidas é o acetato de etila (possui aroma frutado), porém existem outros de grande importância, os quais, acetato de isoamila (aroma de pêra), acetato de isobutila (aroma de banana), acetato 2-phenylethyl (aroma de mel, frutado, flores e caproato de etila (aroma de maçã) (PEDDIE, 1990).

Os ésteres, de modo geral são desejáveis, pois favorecem o aroma da aguardente, sendo oriundos da fermentação, da destilação e do envelhecimento (AMERINE et al., 1972; SIMPSON, 1971). O acetato de etila que corresponde a cerca de 80 % do conteúdo total de ésteres da aguardente, é formado durante a fermentação e na destilação, como produto de reação de esterificação entre álcool etílico e ácido acético, confere odor e gosto desagradável, sendo um dos componentes indesejáveis (HASHIZUME, 1976).

### 2.6.3 Aldeídos

Os compostos carbonílicos são um dos principais componentes responsáveis pelo flavour das bebidas, particularmente os aldeídos (ROSE, 1977). Geralmente são formados durante a fermentação e são considerados produtos intermediários da rota biossintética de ácidos ou álcoois formados através da descarboxilação de alfa-cetoácidos pela ação da piruvato descarboxilase (SUOMALAINEN; LEHTONEN, 1978).

Os aldeídos com até oito átomos de carbono têm aromas penetrantes, geralmente enjoativos, considerados indesejáveis em bebidas destiladas. Os aldeídos maiores que, contêm acima de dez átomos de carbono, apresentam aroma agradável. Esses aldeídos podem ser

formados pela redução de ácidos graxos, mas são de ocorrência restrita na fermentação alcoólica (PIGGOTT, 1989; POTTER, 1980).

O principal aldeído associado à fermentação alcoólica propriamente dita é o acetaldeído (PIGGOTT, 1989; REED, 1973; RIGOTT, 1989). O acetaldeído é o composto predominante em bebidas destiladas, representando 90 % da concentração total de aldeídos em uísque, conhaque e rum (NYKÄNEN; NYKÄNEN, 1991). Normalmente não apresentam problemas em relação à legislação; conforme constatação de Stupiello (1992), no qual 71 % das aguardentes analisadas continham teores relativamente baixos, inferiores a  $20,0 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$  de álcool anidro.

Nascimento et al. (1997a) analisaram aldeídos em 56 aguardentes e 10 uísques importados e concluíram que as aguardentes comerciais contêm menores concentrações de aldeídos que as artesanais e que, de modo geral, as aguardentes foram de  $12,7 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$  de álcool anidro e nos uísques,  $16,0 \text{ mg } 100 \text{ mL } \text{mL}^{-1}$  de álcool anidro, sendo que o aldeído presente em maior concentração foi o acetaldeído.

Outro aldeído importante em bebidas destiladas é a acroleína (2-propenal), formada pela desidratação do glicerol durante a destilação, a sua presença em aguardente é indesejável devido ao seu forte odor pungente (GUTIERREZ, 1997). Nascimento et al. (1997a) relataram teores médios de acroleína na ordem de  $0,067 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$  de álcool anidro em uísques importados, 0,094 em aguardentes comerciais e 0,364 em aguardentes artesanais.

#### **2.6.4 Ácidos orgânicos**

Os ácidos orgânicos voláteis são os mais comuns em bebidas destiladas, sendo o ácido acético o mais abundante (ROSE, 1977). Os ácidos alifáticos de cadeia não ramificada e seus ésteres de etila constituem o segundo grupo mais abundante de componentes não-álcoois encontrados em bebidas destiladas (GUYMON, 1974).

As leveduras sintetizam praticamente os mesmos ácidos, independentemente da natureza do substrato, sendo que os ácidos caprílico e cáprico são os maiores componentes do rum, uísque escocês e conhaque, em proporções relativas bastante similares, salvo alguma exceção. Portanto as proporções dos compostos no vinho são determinadas em grande extensão pela linhagem da levedura e condições de fermentação e, em menor extensão, pelo substrato (NYKÄNEN et al., 1968; SUOMALAINEN; LEHTONEN, 1979).

Os ácidos sintetizados pelas leveduras no meio de fermentação, são os mesmos da fração lipídica das células de leveduras (SUOMALAINEN, 1971). Esses ácidos podem prontamente passar da célula da levedura para o meio durante a fermentação, onde através de reações de esterificação produzem seus respectivos ésteres de etila (SUOMALAINEN; NURMINEN, 1976; SUOMALAINEN et al., 1974). A composição de ácidos graxos da levedura é influenciada pelas condições de fermentação, como: presença de oxigênio, temperatura de fermentação e suplementação do meio (TAYLOR; KIRSHOP, 1977; SUOMALAINEN; LEHTONEN, 1979).

### **2.6.5 Furfural e hidroximetil-furfural**

O aquecimento do vinho durante a destilação promove a pirogenação da matéria orgânica presente no vinho, principalmente das hexoses e cetoses, gerando aldeídos furânicos como o furfural e o hidroximetil-furfural (LEHNINGER, 1990). A reação ocorre mais em pH ácido e temperatura elevada, como é o caso da destilação de vinhos obtidos pela fermentação do caldo de cana (CHERUBIN, 1998).

Apesar da elevada toxidez, o furfural e o hidroximetil-furfural geralmente não apresentam problemas por causa das reduzidas concentrações verificadas nas aguardentes (CHERUBIN, 1998). Os valores médios de hidroximetil-furfural e furfural disponíveis na literatura são respectivamente 0,321 e 0,148 mg 100mL<sup>-1</sup> de álcool anidro; nos uísques importados, 0,48 e 0,261 mg 100mL<sup>-1</sup> de álcool anidro nas aguardentes artesanais (NASCIMENTO et al., 1997a).

### **2.6.6 Metanol**

O metanol é um constituinte naturalmente presente nas bebidas alcoólicas, em quantidades pequenas em relação aos demais componentes. O aparecimento de metanol aumenta acentuadamente quando se associam ao meio de fermentação polpas ou sucos de frutas ricas em pectina, tais como laranja, limão, maçã, abacaxi, etc (GLICKSMAN, 1976; POTTER, 1980; WINDHOLSZ, 1976).

O metanol é um álcool particularmente indesejável na aguardente. Sua ingestão, mesmo em doses muito pequenas, mas por longos períodos, pode levar à cegueira e a morte (WINDHOLSZ, 1976).

### 2.6.7 Cobre, Arsênio e Chumbo

A cachaça artesanal é, geralmente, produzida em alambiques de cobre. Acredita-se que esse metal confira melhor qualidade ao produto quando comparados aos alambiques confeccionados com outros materiais como o aço inox; porém, podem contaminar o produto quando o manejo (principalmente a higiene) da produção é inadequado (FARIA, 1989; NASCIMENTO et al., 1998).

A contaminação da aguardente brasileira por íons de cobre é considerada um entrave à exportação da bebida (NASCIMENTO et al, 1998). A legislação brasileira limita o teor de cobre em bebidas destiladas em  $5 \text{ mg L}^{-1}$ , entretanto a legislação de outros países não tolera mais que  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de cobre nos destilados alcoólicos (CARDOSO, et al., 2003).

Durante o processo de destilação, forma-se o “azinhavre”  $[\text{CuCO}_3\text{Cu}(\text{OH})_2]$  nas paredes internas dos alambiques de cobre. Esse composto é dissolvido pelos vapores alcoólicos ácidos, contaminando o destilado (LIMA-NETO et al, 1994).

A ausência de cobre no destilador e mesmo em colunas de destilação conduz a um efeito organoléptico no produto, o qual apresenta aroma típico de sulfeto (NASCIMENTO et al., 1998).

Nascimento et al. (1997b), avaliaram a presença de metais nas caninhas brasileiras e concluíram que as amostras que continham teores bastante elevados de íons metálicos eram provenientes de pequenos produtores, geralmente aguardentes artesanais, cujas plantas de produção não possuem qualquer controle químico da qualidade dos seus produtos.

Estudo preliminar constatou presença significativa de metais pesados na aguardente produzida no Jequitinhonha, e isso é conseqüência das precárias condições de higiene e da clandestinidade de muitos alambiques, além da contaminação do solo, da água e do ar decorrente da produção industrial e de atividades mineradoras (UFMG, 2006).

O Chumbo e o Arsênio ocorrem devido a contaminações nos equipamentos, solo e água, os quais se acumulam no organismo do homem, assim como o Cobre, e o Arsênio tem efeito carcinogênico (INMETRO, 2006).

## 2.7 Destilação

Na manufatura de bebidas alcoólicas destiladas, a destilação separa, seleciona e concentra pelo uso do calor a fração dos componentes oriundos da fermentação do mosto; assim, a

composição das bebidas depende em grande extensão da forma pela qual ela é conduzida (SUOMALAINEN; NYKÄNEN, 1966; SUOMALAINEN, 1971).

Os vinhos contêm um grande número de compostos voláteis que destilam segundo três critérios: ponto de ebulição, afinidade com o álcool ou água e teor alcoólico no vapor durante a destilação (LÉAUTÉ, 1990), sendo que em função do grau de volatilidade, o destilado é dividido em três frações: cabeça, coração e cauda (SUOMALAINEN; NYKÄNEN, 1966).

O comportamento das diferentes impurezas (compostos secundários) em relação ao álcool etílico no decorrer de qualquer operação de destilação está relacionado às suas diferentes solubilidades no etanol, segundo Ernesto Sorel, citado por Novaes (1994).

Há um grande número de tipos de aparelhos destilatórios disponíveis, oferecendo uma ampla faixa de flexibilidade para o refinamento das bebidas destiladas, sendo os mais difundidos o alambique e a coluna contínua (BOZA, 1996).

### **2.7.1 Alambique**

No alambique efetuam-se duas destilações do vinho, sendo originalmente realizada no mesmo corpo, porém, com o objetivo de minimizar o nível de impurezas e aumentar a produtividade da operação. O método foi aperfeiçoado utilizando dois corpos, sendo denominado o primeiro corpo, “wash still” ou caldeira de esgotamento e o segundo, “low wines still” ou caldeira de destilação, e a técnica denominada dupla destilação (HIRSCH, 1937).

### **2.7.2 Colunas de destilação**

A coluna consiste em uma forma de alambiques interconectados em série, de operação contínua; é de fácil manejo, consome menos combustível, requer mão-de-obra menos hábil, permite maior produtividade e uniformidade do produto (LIMA, 1964).

Guymon (1949), citado por Amerine et al. (1972) demonstrou que a diferença analítica entre os destilados obtidos em coluna e alambique foi pequena, porém, são prontamente distinguidos por análise sensorial e argumenta que se a lenta destilação em alambique não contribuísse singularmente para o caráter da bebida, provavelmente esse procedimento não teria sobrevivido na região de Cognac.

Segundo Reed e Nagodawithana (1991), o efeito da destilação sobre o flavor e o odor da bebida, pode ser drástico através da remoção quantitativa das frações cauda e cabeça durante a destilação. L'Anson (1971) citado por Reed e Nagodawithana (1991), demonstrou que a coluna contínua tem maior capacidade em mover congêneres de maior e menor ponto de ebulição. Assim, a concentração de congêneres nas bebidas pode ser manipulada pelo tipo e operação do aparelho destilador.

Durante a destilação de vinhos, as impurezas de baixo ponto de ebulição são coletadas na fração conhecida como cabeça. Essa fração tem um volume de 5 a 15 % do produto, dependendo do tipo e condições de destilação, e possui teor alcoólico mínimo de 80 %, além de compostos altamente indesejáveis como acetaldeído, acetato de etila e 1,1-dietoxietano, bem como dióxido de enxofre e seus derivados, caso tenha sido usado na preparação do mosto (WILLIANS; STRAUSS, 1976).

Lucena (1957) recomenda para se obter uma aguardente de boa qualidade, a adoção da seguinte prática: a fração cabeça é separada quando o alcoômetro marcar 80 a 85 °GL em seguida destila o coração de 80 a 85 °GL à 45 °GL, originando um produto com uma riqueza alcoólica média de 55 a 65 °GL, e finalmente a cauda, sendo que os produtos extremos são adicionados na destilação da próxima batelada de vinho. Segundo Léauté (1990), procedimento semelhante é utilizado na região de Cognac, da primeira destilação originam três frações: cauda, coração e cabeça; as frações cabeça e a cauda são redestiladas com a batelada posterior enquanto a fração coração é usada na segunda destilação *bonne chauffe*, que dá origem a 4 frações: cabeça, coração (1) (cognac), coração (2) e a cauda, a cabeça e a cauda são incorporadas à bateladas de vinho subsequentes e a fração coração (2) é redestilada juntamente com o coração proveniente da primeira destilação.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Levando-se em consideração que a safra de cachaça tendo a cana-de-açúcar como matéria-prima tem início por volta de maio com o fim das chuvas e o início das temperaturas mais amenas, cuja consequência na região centro-sul é o início da maturação das variedades mais precoces. Embora seja início da maturação, as variedades conhecidas como precoce, super ou hiper precoce dependendo de condições edafo-climáticas, ainda apresentam parte aérea bem desenvolvida, com palmito quase sem açúcar, mas ainda rico em água, sais minerais e aminoácidos entre outros componentes. O corte alto, manual e mecânico, leva boa parte desse topo do colmo para a indústria ou para processamento. O hábito de corte manual também é na altura do palmito e a maturação é verificada pelo critério de brix do pé, meio e ponta observa-se ainda uma relação normalmente distante de 1.00, ou seja, muito mais próxima de 0.80. A riqueza em aminoácidos pode levar à formação de álcoois superiores como tem sido observado em anos mais chuvosos e de crescimento da cana mais intensos. Há de se observar ainda que dependendo do ano, as temperaturas médias podem estar com mínimas entre 10 e 15 °C e máximas entre 20 e 25 °C ou mais elevadas como tem acontecido em anos próximos passados. Estas variações trazem reflexos no processamento, dependendo da escala, do nível tecnológico e do período trabalhado, principalmente na fermentação.

Em muitas regiões do país ocorre dificuldade na formação do pé-de-cuba inicial, nas rodadas iniciais, na manutenção da fermentação, na completude da fermentação, embora muitas cachaças do início de safra sejam consideradas as de melhor “bouquet”.

Assim pequenas indústrias têm a fermentação retardada pela baixa temperatura e o rendimento pode ser muito baixo não somente pela deficiente extração de caldo frequentemente realizada apenas com 1 ou 2 ternos de moenda mas também pela falta de recursos para manutenção de temperatura compatível nas dornas de fermentação. Observa-se com frequência a parada de fermentação com brix de atenuação de ordem de 3 a 5 °brix. Ainda assim, alguns produtores associam as primeiras rodadas de destilação ou produção como de melhor “bouquet” na safra. Possivelmente pela baixa concentração de fermento no caldo, associada a limpeza das dornas e aparelho de destilação; ao baixo teor de compostos sulfurados e de resíduos decantados no vinho; à época fria que seleciona linhagens mais adaptadas às condições de menor temperatura e provavelmente a produção maior associada à menor evaporação dos compostos mais voláteis.



No decorrer da safra, com o progressivo aquecimento da temperatura média ambiental mais a energia térmica liberada pela fermentação leva a média de temperatura da fermentação, gradativamente para 30 a 35 °C ou mais, podendo atingir próximo a 40 °C em final de safra.

Dessa forma, foram escolhidas duas temperaturas fixas para condução dos experimentos: 20 e 32 °C.

A primeira equivalente ao início de safra e que pelos indicativos de qualidade poderia ser mantido toda a safra desde que as dornas fossem devidamente equipadas para manutenção de tal temperatura constante, ainda que com prejuízo da produtividade, mas pela obtenção da qualidade desejada no vinho fermentado.

A segunda temperatura, 32 °C foi fixada tendo em vista ser possível sua manutenção com aquecimento/resfriamento, em qualquer instalação industrial, com um pouco de equipamentos para tal e em processo já bastante explorado para álcool, com alta produtividade.

### **3.1 Local**

O experimento foi realizado no setor de Açúcar e Álcool do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo.

### **3.2 Microrganismos**

Os microrganismos utilizados nesta pesquisa foram duas linhagens de leveduras, da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, Y-904 da AB Brasil e DANSTIL CAT; e uma linhagem da espécie *Saccharomyces bayanus*, EC 1118 da Lalvin, desidratadas, vivas, mantidas sob vácuo e gentilmente cedidas por AB Brasil e LNF respectivamente. Os microrganismos foram escolhidos considerando que as duas primeiras linhagens são comumente utilizadas em destilarias de álcool, enquanto a segunda é utilizada e recomendada pelos próprios produtores para a produção de vinhos e adaptada a baixas temperaturas.

### 3.3 Meios de cultivo para fermentação

Os meios escolhidos para o presente trabalho foram o YEPD (Meio 1), um meio semi-sintético convencional para cultivo e manutenção de leveduras e que tem caráter de comparação de tratamento controle. Já o caldo de cana-de-açúcar (Meio 2), clarificado e padronizado para açúcares tem similaridades com o tratamento de mosto convencional para fermentação alcoólica industrial.

#### 3.3.1 Meio YEPD

As células desidratadas foram inoculadas para fermentação em meio YEPD “Yeast extract peptone dextrose” (Tabela 3) e caldo de cana clarificado e padronizado a aproximadamente 150,0 g L<sup>-1</sup> de ART, para o processo fermentativo.

Tabela 3 - Meio de cultivo YEPD para fermentação.

Meio	Composição
<b>Extrato de levedura</b>	10 g
<b>Peptona</b>	10 g
<b>Dextrose</b>	150 g
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	1.000 mL

Os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave, sob 1 atm (unidade de atmosfera de pressão), a 121 °C e durante 15 minutos.

#### 3.3.2 Meio com caldo de cana-de-açúcar

Para o preparo do meio com caldo de cana, foi utilizada cana-de-açúcar cultivada na referida Instituição. Os colmos foram cortados sem a sua queima no campo, despalhados manualmente e submetidos à moagem, em um terno de moenda, sem embebição. O caldo foi filtrado em peneira de malha fina com algodão e clarificado.

A clarificação foi feita adicionando-se 1,5 g L<sup>-1</sup> de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, seguido por esterilização em autoclave. Após esta etapa o material foi mantido em repouso por 48 horas.

Após a clarificação o sobrenadante foi sifonado e o mosto obtido, isento de impurezas sólidas em suspensão, foi ajustado a 15,2 °brix aproximadamente 150 g L<sup>-1</sup>, convenientemente diluído com água, e novamente seguido por autoclavagem, para posterior uso nos ensaios.

### **3.4 Tratamentos**

Os ensaios foram realizados a 20 °C e a 32 °C para estabelecer uma tecnologia específica para cada temperatura, em busca de um produto diferenciado. Assim, em cada temperatura foram utilizados dois meios, YEPD como controle e caldo de cana clarificado, com ART ajustado, e três leveduras sendo uma *Saccharomyces bayanus* – EC e duas *Saccharomyces cerevisiae* (Y-904 e CAT), em 5 repetições por ensaio.

### **3.5 Condução da fermentação**

Em cada erlenmeyer de 500 mL foram colocados 200 mL de meio, previamente esterilizado em autoclave sob temperatura de 121 °C, durante 20 minutos. Depois foi aguardado o tempo suficiente para o mosto atingir a temperatura ambiente e foi inoculado 1 g de fermento seco para cada 200 mL de mosto. Os frascos foram mantidos em câmara de BOD, estático, até o término da fermentação, para posteriores análises.

#### **3.5.1 Condução da fermentação para análise cromatográfica do destilado**

Devido ao pequeno volume recolhido nos primeiros ensaios não foi possível a detecção dos componentes voláteis dos destilados, por isso foi necessário realizar fermentações para obter um volume maior dos destilados.

Para as análises cromatográficas o preparo do meio foi o mesmo como descrito em 3.3.2. A condução da fermentação foi a mesma como descrita em 3.5, entretanto as fermentações foram realizadas em balões de capacidade de 5 litros e cada balão recebeu 3 litros do meio, a proporção de inóculo permaneceu a mesma, 5 g L<sup>-1</sup> de fermento.

### **3.5.1.1 Destilação do vinho para as análises cromatográficas**

Para a destilação do vinho foi montado em laboratório um destilador feito totalmente de vidro. Foi destilado 1 litro de vinho de cada vez, do qual foram recolhidos os 70,0 mL iniciais do destilado para as análises cromatográficas.

## **3.6 Análises físico-químicas**

A seguir estão descritas as análises realizadas no vinho e no destilado.

### **3.6.1 Concentração de leveduras**

A concentração de leveduras foi determinada por turbidimetria de acordo com TRIBOLI, 1987.

### **3.6.2 Açúcar redutor total**

A concentração de açúcares redutores do mosto e do vinho foi determinada pelo método de Miller (1959), conforme descrito por Triboli (1987).

### **3.6.3 Determinação do teor alcoólico**

A determinação do teor alcoólico do vinho foi realizada através da destilação da amostra em microdestilador Tecnal modelo TE – 012 recolhendo-se 25 mL do destilado em balão volumétrico e determinando-se a densidade relativa da solução em densímetro digital ANTON PAAR (DMA – 45), transformando-se em grau alcoólico ( $v v^{-1}$ ) por tabela apropriada.

### **3.6.4 Análise cromatográfica do vinho**

As amostras foram cromatografadas em cromatógrafo de fase gasosa CG modelo 37 D, equipado com detector de ionização de chama e coluna de aço inoxidável de 3 m x 1/8, contendo Hallcomid M-18 e Carbowax 1500. As condições de operação para determinação de álcoois superiores foram as seguintes: temperatura da coluna 98 °C, temperatura do injetor 140 °C,

temperatura do detector 250 °C; gás de arraste nitrogênio/fluxo 40 mL min<sup>-1</sup> e os volumes injetados de microlitros. As análises cromatográficas foram realizadas pelo Instituto de Tecnologia de Pernambuco-ITEP.

### **3.7 Análise estatística**

#### **3.7.1 Estudo 1: Crescimento celular, açúcar residual e teor alcoólico do vinho**

O experimento foi conduzido utilizando o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2 temperaturas x 2 meios x 3 linhagens) e 5 repetições por tratamento, totalizando 60 unidades experimentais. Foram feitas análises para os dois níveis de temperatura separadamente.

As informações referentes às variáveis dependentes obtidas, ou seja, crescimento celular, açúcar residual e teor alcoólico foram analisadas utilizando o programa SANEST (ZONTA & MACHADO, 1984). De acordo com a análise de variância, foi possível verificar o efeito do meio ou das linhagens isoladamente, bem como a interação entre os fatores. No caso de obtenção de interação significativa a análise dos dados permite avaliar: o efeito do meio para cada linhagem e o efeito das linhagens para cada meio. A comparação de médias foi realizada empregando-se o teste de Tukey, com nível de significância de 5 %.

#### **3.7.2 Estudo 2: Amostras cromatografadas**

O delineamento experimental utilizado no segundo estudo também foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2 temperaturas x 3 linhagens) e três repetições, resultando num total de 18 unidades experimentais.

A análise de variância dos dados referentes às variáveis dependentes obtidas (teor alcoólico; ésteres; aldeídos; acidez volátil; soma dos álcoois isobutílico, isoamílicos e n-propílicos e álcool metílico) foi realizada utilizando o pacote estatístico SANEST (ZONTA & MACHADO, 1984). A análise permitiu verificar a significância de cada fator isoladamente e a existência ou não de interação entre eles. Foi utilizado o teste de Tukey, com nível de significância de 5 %, para comparação das médias de cada tratamento.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As fermentações foram realizadas em experimentos consecutivos, com um meio de referência ou padrão de cultivo, a uma dada temperatura (20 ou 32 °C), comparando as 3 linhagens através de 5 repetições em cultivo estático, em câmara de BOD, conforme descrito em 3.5 na metodologia.

As fermentações foram consideradas terminadas após 120 h a 20 °C tanto no meio de referência como no mosto de caldo de cana-de-açúcar. O tempo final de 120 horas foi estabelecido através de ensaios preliminares de açúcar redutor residual e teor alcoólico do fermentado.

O mesmo critério foi adotado para fermentação a 32 °C para qual foi estabelecido o tempo de 48 horas como o final do ensaio.

### **4.1 Estudo 1: Análise de crescimento celular, açúcar residual e teor alcoólico do vinho**

As variáveis dependentes avaliadas neste estudo (crescimento celular, açúcar residual e teor alcoólico do vinho) foram afetadas de forma significativa pelas variáveis independentes (linhagem e meio) e pela interação entre elas na maioria dos casos (Apêndice L e M).

As Tabelas 4 e 5 trazem os valores médios de crescimento celular encontrado no meio controle (YEPD) e em caldo de cana-de-açúcar clarificado e ajustado para açúcares redutores, nas temperaturas de 20 e 32 °C, para as 3 linhagens ensaiadas.

Na Tabela 4 estão apresentados os valores médios encontrados para crescimento celular, açúcar residual e teor alcoólico no vinho obtido de fermentação conduzida a 20 °C.

Tabela 4 - Valores médios para crescimento celular, açúcar residual e teor alcoólico a 20 °C.

Linhagem <sup>1</sup>	Crescimento celular g L <sup>-1</sup>		Açúcar residual g L <sup>-1</sup>		Teor Alcoólico % v v <sup>-1</sup>	
	Meio 1 <sup>2</sup>	Meio 2 <sup>2</sup>	Meio 1 <sup>2</sup>	Meio 2 <sup>2</sup>	Meio 1 <sup>2</sup>	Meio 2 <sup>2</sup>
<b>Lin 1</b>	7,79 B ab	8,40 A a	1,16 B a	8,50 A a	7,83 B a	9,51 A b
<b>Lin 2</b>	8,00 B a	8,45 A a	1,26 A a	1,73 A b	7,79 B a	8,79 A c
<b>Lin 3</b>	7,75 A b	7,67 A b	1,21 B a	2,21 A b	7,62 B a	10,01 A a

Valores seguidos pela mesma letra (letras maiúsculas, na mesma linha, comparam as linhagens dentro de cada meio; letras minúsculas, na mesma coluna, comparam o efeito do meio entre as linhagens) não são estatisticamente diferentes, pelo teste de Tukey, em nível de 0,05 de probabilidade.

DMS 5 % para o efeito dos meios dentro de cada linhagem: Crescimento celular = 0,18; Açúcar residual = 0,59; Teor alcoólico = 0,28

DMS 5 % para o efeito das linhagens dentro de cada meio: Crescimento celular = 0,22; Açúcar residual = 0,72; Teor alcoólico = 0,33

<sup>1</sup>Linhagem 1: Y-904; Linhagem 2: CAT; Linhagem 3: EC

<sup>2</sup>Meio 1: YEPD; Meio 2: Caldo de cana

Pelos dados apresentados na Tabela 4, foi observado que as linhagens de levedura da espécie *S. cerevisiae*, 1 e 2 apresentaram maior crescimento celular (8,40 e 8,45 g L<sup>-1</sup>, respectivamente) no meio com caldo de cana do que no meio controle (7,79 e 8,0 g L<sup>-1</sup>). A linhagem 3, da espécie *S. bayanus*, não apresentou diferença de crescimento celular nos diferentes meios avaliados.

No meio YEPD e no caldo de cana a linhagem 3 foi aquela que apresentou menor crescimento celular entre todas as linhagens julgadas.

As fermentações realizadas com as linhagens Y-904 e EC foram aquelas que apresentaram os maiores teores de açúcar residual, 8,50 e 2,21 g L<sup>-1</sup>, respectivamente, no meio com caldo de cana em comparação com o meio controle. As fermentações conduzidas com a linhagem CAT não apresentaram diferenças quanto ao teor de açúcar residual encontrado nos dois meios utilizados. No meio YEPD não foram encontradas diferenças estatísticas nas concentrações de açúcar residual remanescente nos vinhos provenientes de fermentações com as três linhagens de leveduras. Por outro lado, nas fermentações utilizando caldo de cana foi observado que a concentração de açúcar residual nos vinhos foi maior quando foi utilizada a linhagem Y-904 do que quando foi empregada a linhagem EC.

De acordo com o item 3.3 de Material e Métodos, para o meio 1 foi ajustado a concentração de ART em  $150,0 \text{ g L}^{-1}$ , e para o meio com caldo de cana, o ajuste foi feito pelo brix, ocorrendo uma variação na concentração inicial de açúcar em cada ensaio, Tabelas E a H do Apêndices. Devido a essa diferença e a mesma quantidade de inóculo, resultou num residual maior de açúcar no meio com caldo de cana.

O teor alcoólico foi maior nas fermentações realizadas pelas três linhagens no caldo de cana do que naquelas realizadas no meio YEPD. Contudo, o valor de teor alcoólico foi maior no caldo de cana fermentado com a linhagem EC ( $10,01 \% \text{ v v}^{-1}$ ) do que nos vinhos obtidos com uso das linhagens Y-904 e CAT ( $9,51$  e  $8,79 \% \text{ v v}^{-1}$ ), respectivamente.

Embora algumas linhagens possam apresentar diferenças quanto a produção de etanol, ela está diretamente relacionada com a concentração de açúcar inicial. Assim sendo as diferentes concentrações encontradas entre os meios e as linhagens podem ser explicadas, não só pelas linhagens utilizadas, bem como, pela variação na concentração inicial de açúcar nos ensaios a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  nos meios 1 e 2.

Younis e Stewart, (1998), estudando a produção de éster e álcoois superiores por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes tipos de açúcares, verificaram que todas as linhagens produziram níveis similares de biomassa, com um aumento no crescimento quando as células foram expostas em meios com maior porcentagem de açúcar. A produção de etanol também foi similar para todas as linhagens quando elas foram cultivadas em glicose, frutose e maltose a  $2 \%$  de açúcar PYN (peptone-yeast, extract-nitrogen). E como esperado, altos níveis de etanol foram obtidos quando as linhagens foram fermentadas em  $4 \%$  de açúcar PYN.

Leguerinel et al. (1988) analisaram o efeito de linhagens de *S. uvarum* na formação de etanol e de componentes voláteis em cidra, e relataram que houve um efeito significativo das linhagens de *S. uvarum* na quantidade de glicose residual e na concentração de etanol para as cidras que continham  $34 \text{ g L}^{-1}$  de frutose; no caso das cidras secas que continham  $17 \text{ g L}^{-1}$  de frutose nenhum efeito das linhagens na formação de etanol foi detectado, mas a concentração de glicose pareceu permanecer influenciada pela linhagem.

Na Tabela 5 estão apresentados os valores médios encontrados para crescimento celular, açúcar residual e teor alcoólico a  $32 \text{ }^\circ\text{C}$ .



Tabela 5 - Valores médios para crescimento celular, açúcar residual e teor alcoólico a 32 °C.

Linhagem <sup>1</sup>	Crescimento celular g L <sup>-1</sup>		Açúcar residual g L <sup>-1</sup>		Teor Alcoólico % v v <sup>-1</sup>	
	Meio 1 <sup>2</sup>	Meio 2 <sup>2</sup>	Meio 1 <sup>2</sup>	Meio 2 <sup>2</sup>	Meio 1 <sup>2</sup>	Meio 2 <sup>2</sup>
<b>Lin 1</b>	6,88 B b	8,13 A b	1,27 B a	2,80 A a	7,60 B a	8,68 A a
<b>Lin 2</b>	7,75 A a	7,35 B c	1,48 B a	2,92 A a	7,25 B b	8,24 A b
<b>Lin 3</b>	6,96 B b	9,74 A a	1,47 B a	2,27 A b	7,56 B a	8,77 A a

Valores seguidos pela mesma letra (letras maiúsculas, na mesma linha, comparam as linhagens dentro de cada meio letras minúsculas na mesma coluna comparam o efeito do meio entre as linhagens) não são estatisticamente diferentes, pelo teste de Tukey, em nível de 0,05 de probabilidade.

DMS 5 % para o efeito dos meios dentro de cada linhagem: Crescimento celular = 0,31; Açúcar residual = 0,42; Teor alcoólico = 0,15;

DMS 5 % para o efeito das linhagens dentro de cada meio: Crescimento celular = 0,38; Açúcar residual = 0,51; Teor alcoólico = 0,18;

<sup>1</sup> Linhagem 1: Y-904; Linhagem 2: CAT; Linhagem 3: EC; Meio 1: YEPD; Meio 2: Caldo de cana.

<sup>2</sup> Meio 1: YEPD; Meio 2: Caldo de cana

Os valores médios apresentados na Tabela 5 para crescimento celular, foram maiores no caldo do que no meio controle. As linhagens Y-904 e EC apresentaram médias maiores no meio de caldo de cana, 8,13 e 9,74 g L<sup>-1</sup>, respectivamente, o que não foi observado em relação a linhagem CAT, a qual obteve maior crescimento celular no meio controle.

O maior crescimento celular encontrado entre as linhagens no meio controle foi da linhagem CAT, enquanto as linhagens Y-904 e EC foram menores e não diferiram estatisticamente entre si. No meio com caldo as três linhagens apresentaram comportamento diferente quanto ao crescimento celular, a linhagem EC apresentou o maior crescimento celular (9,74 g L<sup>-1</sup>), e a linhagem CAT o menor (7,35 g L<sup>-1</sup>). Pelo fato de ter tido crescimento celular diferentes entre as linhagens empregadas para fermentar o caldo de cana, pode ser que o meio tenha interferido no crescimento celular nessa temperatura de fermentação.

Os teores de açúcar residual foram maiores para as três linhagens no meio com caldo de cana do que no meio YEPD. No meio controle não foram observadas diferenças quanto ao teor de açúcar residual nos vinhos obtidos pelo uso das três linhagens. Contudo, no caldo de cana, o material obtido da fermentação conduzida com a linhagem EC foi aquele que apresentou o menor valor de açúcar residual (2,27 g L<sup>-1</sup>) do que as demais linhagens, Y-904 e CAT (2,80 e 2,92 g L<sup>-1</sup>, respectivamente).

Os valores de teor alcoólico foram maiores nos vinhos provenientes do caldo de cana do que naqueles onde foi utilizado o meio YEPD, independente da linhagem utilizada. O produto fermentado do caldo de cana que apresentou menor teor alcoólico foi aquele obtido com o uso da linhagem CAT (8,24 % v v<sup>-1</sup>). Contudo, as outras duas linhagens apresentaram potencial semelhante de produzir álcool a partir de caldo de cana, produzindo 8,68 e 8,77 % v v<sup>-1</sup>, a Y-904 e a EC, respectivamente.

#### 4.2 Estudo 2: Análise cromatográfica do destilado

Os valores de F obtidos na análise de variância para as variáveis teor alcoólico; ésteres; aldeídos; acidez volátil; álcoois superiores e álcool metílico encontram-se nos Apêndices N e O.

Os resultados encontrados nas análises cromatográficas dos destilados estão nas Tabelas 6, 7, 8, 9 e 10.

Na Tabela 6 estão apresentados os valores médios para teor alcoólico, ésteres e aldeídos a 20 e a 32 °C.

Tabela 6 - Valores médios do Teor Alcoólico, Ésteres e Aldeídos.

Linhagem <sup>1</sup>	Teor alcoólico % v v <sup>-1</sup>		Ésteres <sup>2</sup> mg 100 mL <sup>-1</sup> de álcool anidro		Aldeídos <sup>3</sup> mg 100 mL <sup>-1</sup> de álcool anidro	
	20 °C	32 °C	20 °C	32 °C	20 °C	32 °C
	<b>Lin 1</b>	54,40 Aa	53,45 Aa	71,90 Ab	45,90 Aa	13,90 Ab
<b>Lin 2</b>	50,45 Aa	51,60 Aa	52,70 Ab	39,05 Aa	22,05 Aab	25,10 Aa
<b>Lin 3</b>	54,20 Aa	50,10 Ba	115,00 Aa	52,10 Ba	35,80 Aa	29,55 Aa

Valores seguidos pela mesma letra (letras maiúsculas, na mesma linha, comparam as linhagens dentro de cada meio, letras minúsculas, na mesma coluna, comparam o efeito do meio entre as linhagens) não são estatisticamente diferentes, pelo teste de Tukey, em nível de 0,05 de probabilidade.

DMS 5 % para a comparação das temperaturas dentro de cada linhagem: Teor alcoólico = 3,59; Ésteres = 30,41; Aldeídos = 14,64

DMS 5 % para a comparação das Linhagens dentro de cada nível temperatura: Teor alcoólico = 4,50; Ésteres = 38,15; Aldeídos = 18,37

<sup>1</sup> Linhagem 1- Y-904; Linhagem 2- CAT; Linhagem 3- EC

<sup>2</sup> Ésteres expressos em acetato de etila.

<sup>3</sup> Aldeídos expressos em acetaldeído.

Os teores alcoólicos encontrados nos destilados a 20 °C e 32 °C foram um pouco diferentes entre as linhagens em função da técnica de destilação e variáveis incontroláveis, porém resultou praticamente em valores que não diferiram estatisticamente.

Os teores de ésteres encontrados nos destilados a 20 °C e a 32 °C não apresentaram diferenças para as linhagens da espécie *S. cerevisiae*, Y-904 e CAT. A linhagem de *S. bayanus*, foi a única que apresentou diferença em relação às duas temperaturas de condução de fermentação. A 20 °C a linhagem EC promoveu formação de ésteres maior do que a 32 °C (115,0 e 52,10 mg 100 mL<sup>-1</sup> respectivamente); também foi a maior produção entre as linhagens estudadas (Tabela 6).

Killian e Ough (1979) encontraram resultados semelhantes, onde a formação de acetato de etila em vinhos diminuiu em temperaturas elevadas de fermentação.

O valor máximo estabelecido por BRASIL (2005) para os teores de ésteres é de 200 mg 100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro.

Os teores de aldeídos não apresentaram diferenças em função da temperatura de fermentação empregada, porém foi observado influência da linhagem de levedura sobre a formação desse componente. A linhagem EC apresentou maior valor de aldeído, 35,80 mg 100 mL<sup>-1</sup>, enquanto a linhagem Y-904 apresentou menor valor, 13,90 mg 100 mL<sup>-1</sup>.

Os aldeídos, principalmente o acetaldeído, são co-produtos normais da fermentação alcoólica. A formação desse tipo de composto é resultado da ação de leveduras durante estágios iniciais do processo fermentativo, tendendo a desaparecer nas etapas finais. Os demais aldeídos são obtidos, provavelmente, a partir da oxidação de álcoois superiores provenientes da degradação de aminoácidos gerados pela hidrólise de proteínas (NOVAES, 1974; YOKOYA, 1995).

Grande parte da fração aldeídica presente no mosto é separada durante a destilação na fração cabeça. As aguardentes ricas em aldeídos são provenientes de alambiques que não separam os produtos da cabeça (CARDOSO, 2001).

O valor máximo permitido por Brasil (2005) para a concentração de aldeídos nas aguardentes, expressos em acetaldeído, é de 30,0 mg 100 mL<sup>-1</sup>. Apenas o destilado obtido da fermentação realizada pela linhagem EC sob a 20 °C apresentou quantidade de aldeído superior ao permitido, 35,80 mg 100 mL<sup>-1</sup>, provavelmente pode ter sido em função do tipo de destilação, em laboratório e com total recuperação do destilado, conforme item 3.5.1.1 de Material e

Métodos. Por não se tratar de produto acabado, este valor acima da legislação não apresenta qualquer problema.

Tabela 7 - Valores médios de Acidez Volátil.

Linhagem <sup>1</sup>	Acidez Volátil <sup>2</sup> mg 100 mL <sup>-1</sup> de álcool anidro	
	20 °C	32 °C
<b>Lin 1</b>	40,70 B a	54,20 A b
<b>Lin 2</b>	50,25 A a	58,15 A b
<b>Lin 3</b>	54,40 B a	83,55 A a

Valores seguidos pela mesma letra (letras maiúsculas, na mesma linha, comparam as linhagens dentro de cada meio, letras minúsculas, na mesma coluna, comparam o efeito do meio entre as linhagens) não são estatisticamente diferentes, pelo teste de Tukey, em nível de 0,05 de probabilidade.

DMS 5 % para a comparação das temperaturas dentro de cada linhagem: 13,03

DMS 5 % para a comparação das Linhagens dentro de cada nível temperatura: 16,33

<sup>1</sup> Linhagem 1: Y-904; Linhagem 2: CAT; Linhagem 3: EC.

<sup>2</sup> Acidez volátil expressa em ácido acético.

Na Tabela 7, pode-se observar que o destilado obtido da fermentação realizada pela linhagem Y-904, sob a 32 °C, apresentou maior teor de acidez volátil 54,20 mg 100 mL<sup>-1</sup> do que aquele obtido de fermentação realizada sob temperatura a 20 °C, 40,70 mg 100 mL<sup>-1</sup>. Isso significa que para esta linhagem a temperatura contribuiu na formação de ácido acético. Para a linhagem CAT, não foi observado influência da temperatura sobre a acidez volátil, ou seja, na temperatura de 32 °C foi observado que a acidez volátil média 58,15 mg 100 mL<sup>-1</sup> não diferiu estatisticamente daquela encontrada a 20 °C (50,25 mg 100 mL<sup>-1</sup>). A linhagem EC também foi influenciada pela temperatura de fermentação, a 32 °C apresentou média de 83,54 mg 100 mL<sup>-1</sup>, que foi maior do que a encontrada a 20 °C, 50,40 mg 100 mL<sup>-1</sup>.

Na temperatura de 20 °C não houve diferença significativa nas médias dos valores de acidez volátil para as 3 linhagens estudadas. Na temperatura de 32 °C o produto obtido com o uso da linhagem EC, foi aquele que apresentou a maior média de acidez volátil entre as 3 linhagens. Neste caso houve influência da temperatura sobre o metabolismo da linhagem para produzir acidez volátil.

Mallouchos et al. (2003) obtiveram resultados semelhantes em fermentações de vinho em diferentes temperaturas e o efeito da temperatura na formação de compostos voláteis. Eles relataram que o conteúdo total de ácidos diminuiu com a queda da temperatura, em ambos os sistemas em células livres e imobilizadas.

Llauradó et al. (2002) analisando o efeito das baixas temperaturas na fermentação alcoólica de mostos de uvas com altas concentrações de açúcar, concluíram que entre os efeitos positivos das baixas temperaturas de fermentação, os mais consistentes e significantes são: a redução dos níveis de ácido acético, acetaldeído, e de acetato de etila.

A alta acidez em aguardentes pode ser atribuída à contaminação da cana pela presença de bactérias acéticas e outras (CARDOSO, 2001), assim como a aeração do mosto fermentado, que pode contribuir na conversão de até 30 % do açúcar em ácido acético, mesmo que não haja contaminação por bactérias acéticas (MAIA, 1994). Porém mesmo nas melhores fermentações, uma pequena parte do açúcar se converte em ácido acético, o qual pode aparecer no mosto fermentado em níveis de até  $0,8 \text{ g L}^{-1}$  ou um pouco mais, pois este é um produto normal da fermentação alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae* (PIGGOTT; PATERSON, 1989).

Tabela 8 - Valores médios de álcoois superiores.

Linhagem <sup>1</sup>	Álcoois superiores <sup>2</sup> mg 100 mL <sup>-1</sup> de álcool anidro	
	20 °C	32 °C
<b>Lin 1</b>	760,85 A a	692,60 A a
<b>Lin 2</b>	529,55 B b	649,50 A a
<b>Lin 3</b>	455,65 B b	537,50 A b

Valores seguidos pela mesma letra (letras maiúsculas, na mesma linha, comparam as linhagens dentro de cada meio, letras minúsculas, na mesma coluna, comparam o efeito do meio entre as linhagens) não são estatisticamente diferentes, pelo teste de Tukey, em nível de 0,05 de probabilidade.

DMS 5 % para a comparação das temperaturas dentro de cada linhagem: 81,16

DMS 5 % para a comparação das Linhagens dentro de cada nível temperatura: 101,80

1 Linhagem 1: Y-904; Linhagem 2: CAT; Linhagem 3: EC.

<sup>2</sup> Álcoois superiores expressos na soma dos álcoois isobutílico, isoamílicos e n-propílico.

Na Tabela 8, observou-se que o destilado produzido com a linhagem Y-904 não apresentou diferença significativa quanto ao teor de álcoois superiores, soma dos álcoois

isobutílico, isoamílico e n-propílico, nas temperaturas de 20 °C e 32 °C. Isso significa que para esta linhagem a temperatura não contribuiu na formação dos álcoois isobutílico, isoamílicos e n-propílico. Para a linhagem CAT houve influência da temperatura na formação desses álcoois. O teor médio dos álcoois superiores a 20 °C foi menor, 529,55 mg 100 mL<sup>-1</sup>, do que a 32 °C, 649,50 mg 100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro. Também foi observado influência da temperatura de fermentação para a linhagem EC, onde o teor médio de álcoois superiores a 20 °C foi menor, 455,65 mg 100 mL<sup>-1</sup> do que a média a 32 °C de 537,50 mg 100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro.

A 20 °C a linhagem Y-904 foi a linhagem mais influenciada pela temperatura na produção de álcoois superiores, apresentou maior média de 760,85 mg 100 mL<sup>-1</sup>, enquanto que as linhagens CAT e EC produziram menor quantidade desses álcoois, 529,55 e 455,65 mg 100 mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Já a 32 °C observou-se que a linhagem EC apresentou menor teor de álcoois superiores comparadas com as linhagens Y-904 e CAT.

A produção de álcoois superiores durante a fermentação é influenciada por alguns fatores como a matéria-prima, a linhagem de levedura, o pH do meio de fermentação, a concentração inicial do inóculo, a temperatura de fermentação, aeração, a matéria suspensa, a quantidade e a natureza dos nutrientes presentes no mosto e a presença de contaminantes (MARGALITH; SCHWARTZ, 1970; GUYMON, 1974; GUTIERREZ, 1993).

Os resultados apresentados na Tabela 8 estão de acordo com GUTIERREZ (1993), que estudando a produção de álcoois superiores por linhagens de *Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica, verificou aumento nos teores de álcoois propílico, isobutílico e isoamílicos em temperaturas mais elevadas de fermentação. O que pode ser observado na Tabela 8, onde as maiores médias nos teores de álcoois superiores encontram-se a 32 °C. Embora a linhagem 1 tenha produzido mais álcoois superiores nas duas temperaturas e a linhagem 3 apresentou menor média entre as linhagens a 32 °C, essas diferenças provavelmente seriam características intrínsecas das próprias linhagens.

Os valores encontrados para os teores dos álcoois isobutílico, isoamílico e propílico foram muito elevados se comparamos com o valor máximo permitido pela legislação para as aguardentes, que é de 360,00 em mg 100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro. Entretanto estes são valores absolutos obtidos da destilação em laboratório onde não se procedeu a separação da fração cabeça, onde se encontra a maior concentração destes álcoois.

O mecanismo de formação de álcoois superiores se dá pela desaminação dos aminoácidos com produção de cetoácidos, os quais são descarboxilados e reduzidos, produzindo álcoois superiores em cadeia carbônica com um carbono a menos que o correspondente aminoácido de origem (WEBB; INGRAHAM, 1963; YOKOYA, 1995).

Os altos teores de álcoois superiores produzidos provavelmente foram devido à matéria-prima utilizada. Embora a cana-de-açúcar utilizada apresentasse teor de brix adequado para as fermentações, não estava em estágio de maturação adequada, apresentando grandes quantidades de aminoácidos, os quais são fundamentais na formação dos álcoois superiores.

Tabela 9 - Valores médios de Álcool Metílico.

Linhagem <sup>1</sup>	Álcool Metílico mg 100 mL <sup>-1</sup> de álcool anidro	
	20 °C	32 °C
<b>Lin 1</b>	2,45 B a	3,00 A a
<b>Lin 2</b>	2,35 A a	2,00 A b
<b>Lin 3</b>	1,95 A a	2,40 A b

Valores seguidos pela mesma letra (letras maiúsculas, na mesma linha, comparam as linhagens dentro de cada meio, letras minúsculas, na mesma coluna, comparam o efeito do meio entre as linhagens) não são estatisticamente diferentes, pelo teste de Tukey, em nível de 0,05 de probabilidade.

DMS 5 % para a comparação das temperaturas dentro de cada linhagem: 0,46

DMS 5 % para a comparação das Linhagens dentro de cada nível temperatura: 0,58

<sup>1</sup> Linhagem 1: Y-904; Linhagem 2: CAT; Linhagem 3: EC.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 9, foi observado que para a linhagem Y-904 houve influência da temperatura nas médias de álcool metílico. A linhagem Y-904 apresentou média menor a 20 °C, 2,45 mg 100 mL<sup>-1</sup> do que a 32 °C, 3,00 mg 100 mL<sup>-1</sup>. Porém não se observou influência da temperatura nas linhagens CAT e EC. A 20 °C, as linhagens não

por associações de centenas de moléculas de ácido galacturônico, parte das quais acham-se ligadas a moléculas de metanol. Durante a fermentação do mosto essas moléculas de metanol podem ser liberadas através de reação de hidr



polissacarídeos do bagacilho seguido da desidratação dos monômeros de hexoses e pentoses, originando furfural e hidroximetilfurfural (HMF), respectivamente (MAIA, 1994).

Para evitar o aumento de furfural na aguardente, recomenda-se destilar o vinho o mais limpo possível, livre de substâncias orgânicas em suspensão (LIMA, 1964).

O limite máximo estabelecido por Brasil (2005) para a concentração de furfural em aguardente é de  $5 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ , era esperado que as amostras dos destilados não apresentassem maiores concentrações de furfural, pois devido ao tipo de destilador utilizado, em vidro, e meio de caldo clarificado não deveria mesmo apresentar tais formações.

Na Tabela 10 pode-se observar que os valores de carbamato de etila encontrados nos destilados foram menores que  $52 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , valor mínimo para detecção no método utilizado, para todas as linhagens. Não houve diferença nos valores médios entre as temperaturas nem entre as linhagens.

Embora não exista uma explicação satisfatória para as cachaças sobre a influência dos fatores importantes na formação de carbamato de etila CE em bebidas destiladas (ANDRADE-SOBRINHO, 2002), estudos de Riffikin et al.a (1989) sobre a formação de CE durante a destilação de uísques em alambiques de cobre e de vidro, verificaram que a formação de CE ocorreu somente quando a destilação foi realizada em presença de cobre. No fermentado destilado em equipamento de vidro, nenhuma formação significativa de CE ocorreu, ficando abaixo de  $5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .

Os teores de acroleína apresentados na Tabela 10 não apresentaram diferença significativa, os valores encontrados foram menores que  $0,7 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$  de álcool anidro.

Os valores de cobre ficaram todos abaixo de  $1,0 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ . Era esperado que as amostras não apresentassem teores desse elemento. O cobre na aguardente provém do material dos destiladores fabricados com este material, quando parte do destilador é confeccionada em aço inox e parte em cobre, como a serpentina, ou do tipo de coluna em aço inox contendo revestimento em cobre ou telas, tipo filtro de fios de cobre (MASSON, 2005).

## 5 CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos neste trabalho concluiu-se que:

*Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Y-904, em fermentações conduzidas a 20 °C promoveu o menor esgotamento dos açúcares presentes no caldo de cana. Além disso, produziu maiores teores de álcoois superiores em fermentações realizadas a 20 °C e a 32 °C produziu maior teor de álcool metílico dentre as linhagens.

A linhagem CAT, da espécie *S. cerevisiae*, em fermentação de caldo de cana realizada a 32 °C obteve menor crescimento celular do que a Y-904 e EC. Essa mesma linhagem também promoveu menor síntese de etanol do que as outras duas linhagens, tanto em temperatura de 20 °C como em 32 °C. Contudo, no meio YEPD, em cultivo realizado a 32 °C promoveu maior formação de biomassa do que as demais, apesar de promover menor formação de etanol que as outras linhagens.

*Saccharomyces bayanus*, linhagem EC, cultivada em mosto de cana sob temperatura de 20 °C apresentou menor formação de células e maior síntese de álcool etílico do que as linhagens de *S. cerevisiae*. Por outro lado, em caldo de cana fermentado a 32 °C, essa linhagem conseguiu atingir maior crescimento celular e melhor aproveitamento dos açúcares fermentescíveis do que as linhagens Y-904 e CAT. Além disso, apresentou elevada produção de etanol. Também foi observado que o destilado obtido do cultivo dessa linhagem em caldo de cana sob 32 °C apresentou maior teor de acidez volátil e menor teor de álcoois superiores do que as duas linhagens de *S. cerevisiae*.

As duas metodologias de processamento são factíveis de serem conduzidas, tanto a 20 °C como a 32 °C e com estas espécies e linhagens de leveduras. A escolha do processo só poderá ser concluída após análise sensorial e de custo dos produtos finais.

## REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BEBIDAS-ABRABE. **Mercado**. Disponível em: <http://www.abrabe.org.br/mercado.php>. Acesso em: 3 mar. 2005.

ALCARDE, V.E.; YOKOYA, F. Efeito da população de bactérias na floculação de leveduras isoladas de processos industriais de fermentação alcoólica. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 21, n. 4, p. 40-43, 2003.

ALEXANDER, A. G. **Sugarcane physiology: a comprehensive study of the Saccharum source-to-sink system**. Amsterdam: Elsevier, 1973. 725 p.

ALMEIDA, M.E.W. de; BARRETO, H.H.C. Determinação de álcoois superiores em aguardente de frutas por cromatografia de fase gasosa. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 33, p. 73-84, 1973.

ALTERTHUM, F.; CRUZ, M.R.M.; VAIRO, M.L.R.; GAMBASSI, D.M. Efeito dos microrganismos contaminantes na fermentação alcoólica nas microdestilarias. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 3, n. 1, p. 42-49, set./out. 1984.

AMERINE, M.A.; BERG, H.W.; CRUESS, W.V. **The technology of wine making**. 3 rd. ed, Westpot: The AVI Publi, 1972. chap. 17, p. 535-576.

AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J. Infecção na fermentação; como evita-la. **Álcool e Açúcar**, São Paulo, v. 5, p. 12-18, 1982.

ANDRADE, L. A. B. Cultura da cana-de-açúcar. In: CARDOSO, M. das G. **Produção de aguardente**. Lavras: Ed. UFLA, 2001. cap. 1, p. 19-50.

ANDRADE-SOBRINHO, L.G. de; BOSCOLO, M.; LIMA-NETO, B. dos S.; FRANCO, D.W. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa). **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6b, p. 1074-1077, nov./dez. 2002.

AYESTARAN, B.M.; ANCIN, M.C.; GARCIA, A.M.; GONZÁLEZ, A.; GARRIDO, J.J. Influence of prefermentation clarification on nitrogenous contents of musts and wines. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, n. 2, p. 476-482, 1995.

AYLOTT, R.I.; COCHRANE, G.C.; LEONARD, M.J.; McDONALD, L.; MacKENZIE, W.M.; Mc NEISH, A.S.; WALKER, D.A. Ethyl carbamate formation in grain based spirits. Part I: Post-distillation ethyl carbamate formation in a maturing grain whisky. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 96, n. 4, p. 213-221, Jul./Ago. 1990.

AYRRAPÄÄ, T. Formation of higher alcohols from amino acids derived from yeast proteins. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 73, p. 30-33, 1967.

BAUER, F. F.; PRETORIUS, I. S. Yeast stress response and fermentation efficiency: How to survive the making wine. **South African Journal of Enology and Viticulture**, New York, v. 21 (special issue), p. 27-25, 2000.

BARDI, E.; KOUTINAS, A.A.; PSARIANOS, C.; KANELLAKI, M. Volatile by-products formed in low-temperature wine-making using immobilized yeast cells. **Process Biochemistry**, v. 32, n. 7, p. 579-584, 1997.

BEATTIE, J.K.; POLYBLNK, G.A. Copper-catalyzed oxidation of cyanide by peroxide in alkaline aqueous solution. **Australian Journal of Chemistry**, Melbourne, v.48, n. 4, p.861-868, 1995.

BERTOLINI, L.; ZAMBONELLI, C.; GIUDICI, P.; CASTELLARI, L. Higher alcohol production by cryotolerant *Saccharomyces strains*. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 47, p. 343-345, 1996.

BERRY, D.R.; SLAUGHTER, J.C. Alcoholic beverage fermentations. In: LEA, A.G.H.; PIGGOTT, J.R. **Fermented beverage production**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. chap.2, p.25-58.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. **Decreto nº 2314, de 4 de setembro de 1997 que regulamenta a Lei 8918 de 14 de julho de 1994. 1997.** Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/page/mapa/legislacao/publicacoes\\_dou/publicacoes\\_dou\\_2005/publicacoes\\_dou\\_junho\\_2005/do1\\_2005\\_06\\_30-mapa\\_mapa.pdf](http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/page/mapa/legislacao/publicacoes_dou/publicacoes_dou_2005/publicacoes_dou_junho_2005/do1_2005_06_30-mapa_mapa.pdf). Acesso em: 02 mar. de 2006.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Disponível em: [http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/consulta\\_nova/consulta.asp?tip\\_consulta=ImpNCM&titulo\\_p=Importação%20Brasileira&titulos=1996%20a%202005](http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/consulta_nova/consulta.asp?tip_consulta=ImpNCM&titulo_p=Importação%20Brasileira&titulos=1996%20a%202005). Acesso em: 12 jul. 2005a.

BRIEGER, F.O. Início da safra. Como determinar a maturação. **Boletim Informativo Copereste**, Ribeirão Preto, n. 4, p. 1-3, abr., 1968. Único.

BRIEGER, F. O.; PARANHOS, S.B. Técnica cultural. **Cultura e adubação da cana-de-açúcar**. São Paulo: Instituto Brasileiro da Potassa, 1964. p. 138-190.

CABRERA, M.J.; MORENO, J.; ORTEGA, J.M.; MEDINA, M. Formation of ethanol, higher alcohols, esters, and terpenes by five yeast strains in musts from Pedro Ximénez grapes in various degrees of ripeness. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.39, n. 4, p. 283-287, 1998.

CABRINI, K.T.; GALLO, C.R. Identificação de leveduras contaminantes no processo de fermentação alcoólica na Usina Santa Elisa. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 17, n. 4, p. 48-50, mar./abr. 1999.

CAMOLEZ, M.A.; MUTTON, M.J.R.. Influência de microorganismos contaminantes sobre o processo fermentativo. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 23, n. 5, p. 42-47, 2005.

CARDOSO, M. das G. Análises físico-químicas de aguardente. In: \_\_\_\_\_. **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001.

CARDOSO, R.C.; LIMA-NETO, B.S.; FRANCO, D.W.; NASCIMENTO, R.F. Influência do material do destilador na composição química das aguardentes de cana. Parte II. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 2. p. 165-169, 2003.

CARIDI, A.; CORTE, V. Inhibition of malolatic fermentation by cryotolerant yeasts. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 19, n. 8, p. 723-729, Aug. 1997.

CASTELLARI, L.; FERRUZI, M.; MAGRINI, A.; GIUDICI, P.; PASSARELLI, P.; ZAMBONELLI, C. Unbalanced wine fermentation by cryotolerant vs. non-cryotolerant *Saccharomyces strains*. **Vitis**, Landau, v. 33, p 49-52, 1994.

CASTELLARI, L.; MAGRINI, P.; PASSARELLI, P.; ZAMBONELLI, C. Effect of must

COOPERATIVA CENTRAL DOS PRODUTORES DE AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Amostragem e análise da cana-de-açúcar**. São Paulo, 1980. 37 p.

\_\_\_\_\_. **Variedades SP**: recomendações e manejo. In: REUNIÃO TÉCNICA COPERSUCAR: Variedades de cana-de-açúcar e suas implicações na lavoura canavieira. São Paulo, 1983. p. 44-56.

DRINKS INTERNATIONAL. **Major export drive for world's "biggest Brand"**. London: 1994. 40 p.

DRYSDALE, G.S.; FLEET, G.H. Acetic acid bacteria in wine-making: a review. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 39, p. 143-154, 1988.

DRYSDALE, G.S.; FLEET, G.H. The effect of acetic acid bacteria upon the growth and metabolism of yeasts during the fermentation of grape juice. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 67, n. 5, p. 471-481, Nov. 1989.

ETIEVANT, X.P. Wine. In: H. MAARSE (Ed.). *Volatile compounds in foods and beverages*. New York: Marcel Dekker. 1991, p. 490-507.

FARIA, J.B. **A influência do cobre nas aguardentes da cana (*Saccharum officinarum*, L)**. 1989. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.

FARIA, J.B.; DELIZA, R.; ROSSI, E.A. Compostos sulfurados e a qualidade das aguardentes de cana (*Saccharum officinarum*, L). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 13, n. 1, p. 89-93, 1993.

FEUILLAT, M.; CHARPENTIER, C.; MASSOUTIER, C. Intérêt oenologique des souche des levures *Saccharomyces cryotolérantes*. **Revue Oenologues**, Chaintré, v. 85, p.18-21, 1997.



FLEET, G.H., HEARD, G.M. Yeasts: Growth during fermentations. In: FLEET, G.M. (Ed.). **Wine Microbiology and Biotechnology**. Chur: Harwood Academic, 1993. p. 27-54.

GIUDICI, P.; ROMANO, P.; ZAMONELLI, C. A biometric study of higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 36, n. 1, p. 61-64, 1990.

GLICKSMAN, M. **Gum technology**. New York: Academic Press, 1969.

GONZÁLEZ, A.; HIERRO, N.; POBLET, M.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J.M. Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 102, n. 3, p. 295-304, July. 2005.

GUTIERREZ, L.E. **Bioquímica de leveduras**. Piracicaba: ESALQ, Depto. Química, 1977. 270 p.

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

GUYMON, J.F. Chemical aspects of distilling wines into brandy. In: WEBB, A.D. (Ed.). **Chemistry of winemaking**. Washington: American Chemical Society, 1974. chap. 11, p. 232-253.

HASHIZUME, T. Considerações sobre ésteres nas bebidas alcoólicas. **Instruções Técnicas**, Campinas, n. 9, p. 109-21, 1976.

HIRSCH, I. **Manufacture of whiskey, brandy and cordials**. Newark: Sherman Eng., 1937, 183 p.

HUNTER, K.; ROSE, A. H. Lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* as influenced by growth temperature. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 260, p. 639-653, 1972.

INGLEDW, M.; KUNKEE, R.E. Factors influencing sluggish fermentations of grape juice. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 36, p. 65-76, 1985.

INSTITUTO DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL-INMETRO. **Notícias e eventos: Expocachaça em Minas Gerais**. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/inmetro/oque.asp>. Acesso em: 5 set. 2006.

JACKSON, S.R. **Wine science: Principles and applications**. San Diego: Academic Press. 1994. 475 p.

KILLIAN, E.; OUGH, C.S. Fermentation esters produced in wine: formation and retention as affected by fermentation temperature. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 30, n. 4, p. 301-305, 1979.

KORHOLA, M.; HARJU, K.; LEHTONEN, M. Fermentation. In: PIGGOTT, J.R.; SHARP, R.; DUNCAN, R.E.B. (Ed.). **The science and technology of whiskies**. London: Longman Scientific Technical, 1989. chap. 4, p. 89-117.

LAMBRECHATS, M. G.; PRETORIUS, I. S. Yeast and its importance in wine aroma: A review. **South African Journal of Enology Viticulture**, New York, v. 21 (Special Issue), p. 97-129, 2000.

LEA, A.G.H. Cidermaking. In: LEA, A.G.H.; PIGGOTT, J.R. **Fermented beverage production**. London; New York: Blakie, 1995. chap. 4, p 66-96.

LEA, A.G.H, DRILLEAU, J.F. Cidermaking. In: LEA, A.G.H.; PIGGOTT, J.R. (2 nd ed.). **Fermented beverage production**. New York: Kluwer Academic, 2003. chap. 4, p. 59-87.

LEGUERINEL, I.; MAFART, P.; CLERET, J.J.; BOURGEOIS, C. Yeast strain and kinetic aspects of the formation of flavour components in cider. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 95, p. 405-409, 1989.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Saniei. 1990. 725 p.

LEHTONEN, M.; JOUNELA-ERIKSON, P. Volatile and non-volatile compounds in the flavour of alcoholic beverages. In: PIGGOTT, J.R. (Ed.). **Flavour of distilled beverages: origin and development**. Flórida: Verlag Chemie International., 1983. chap. 2, p. 64-78.

LÉAUTÉ, R. Distillation in alambic. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.41, n. 1, p. 90-103, 1990.

LIMA, U. de A. **Estudos dos principais fatores que afetam os componentes do coeficiente não álcool das aguardentes de cana**. 1964. 141 p. (Cátedra). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1964.

\_\_\_\_\_. Preparo do mosto. In: \_\_\_\_\_. **Aguardente**. Piracicaba: Piracicaba: FEALQ, 1999. cap. 4, p. 59-68a.

\_\_\_\_\_. Agentes da fermentação alcoólica. In: \_\_\_\_\_. **Aguardente**. Piracicaba: FEALQ, 1999. cap. 5, p. 69-88b.

LIMA-NETO, B.S.; BEZERRA, C.W.B.; POLASTRO, L.R.; CAMPOS, P.; NASCIMENTO, R.F.; FURUYA, S.M.B.; FRANCO, D.W. O cobre em aguardentes brasileiras: sua quantificação e controle. **Química Nova**, São Paulo, v. 17, n. 3, 1994.

LLAURADÓ, J. **Avaluacio dels condicionants del most en el desenvolupament de la fermentacio alcoholica a baixes temperatures**. Thesis (PhD), Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, 2002.

LLAURADÓ, J.; ROZÈS, N.; BOBET, R.; MAS, A.; CONSTANTÍ, M. Low-temperature alcoholic fermentations in high sugar concentration grape musts. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n. 1, p, 268-273, Jan./Feb. 2002.

LONGO, E.; VELÁZQUEZ, J.B.; SIEIRO, C.; CANSADO, J.; CALO, P.; VILLA, T.G. Production of higher alcohols, ethyl acetate, acetaldehyde and other compounds by 14 *Saccharomyces cerevisiae* wine strains isolated from the same region (Salnés, N.W. Spain). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 8, n. 5, p. 539-541, Sept.1992.

LOWE, D.P.; ARENDT, E.K.; SORIANO, A.M.; ULMER, H.M. The influence of lactic acid bacteria on the quality of malt. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 111, n. 1, p. 42-50, 2005.

LUCENA, V.G. de. Componentes secundários das aguardentes. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 49, n. 2, p. 2-4, 1957.

LURTON, L.; SNAKKERS, G.; ROULLAND, C.; GALY, B. Influence of the fermentations yeast strain on the composition of wine spirits. **Journal of the Science and Food and Agriculture**, London, v. 67, p. 485-491, 1995.

MacKENZIE, W.M.; CLYNE, A.H.; MacDONALD, L.S. Ethyl carbamate formation in grain based spirits. Part II: The identification and determination of cyanide related species involved in ethyl carbamate formation in scotch grain whisky. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 96, n. 4, p. 223-232, Jul./Aug. 1990.

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

MALLOUCHOS, A.; KOMAITIS, M.; KOUTINAS, A.; KANELLAKI, M. Wine fermentations by immobilized and free cells at different temperatures. Effect of immobilization and temperature on volatile by-products. **Food Chemistry**, Easton, v. 80, p. 109-113, 2003.

MARGALITH, P.; SCHWARTZ, Y. Flavour and microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, v. 12, p. 35-88, 1970.

MATEO, J.J., JIMENEZ, M.; HUERTA, T.; PASTOR, A. Contribution of different yeasts isolated from musts of monastrell grapes to the aroma of wine. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 14, n. 2, p. 153-160, June. 1991.

\_\_\_\_\_. Comparison of volatiles produced by four *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from monastrell musts. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.43, n. 2, p. 206-209, 1992.

MERCADO dos EUA não aceitam o nome cachaça. Gazeta Mercantil/Sul. Disponível em: <http://www.nuca.ie.ufrj.br/infrosucro>. Acesso em 08 abr. 2002.

MEURGUES, O. La valorisation del arômes du Chardonnay en Bourgogne par les techniques de vinification. **Les arômes du vin, caractérisation et genèse**. E. Lallemand, Toulouse, p. 43-45, 1996.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, Whashington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORAES, F.V. Como controlar a qualidade da cachaça. **Engarrafador Moderno**, São Paulo, v. 10, n. 85, p. 24-29, maio. 2001.

MUTTON, M.J.R.; MUTTON, M.A. Aguardente. In: VENTURUNI FILHO, W.G. **Tecnologia de bebidas**. São Paulo: Edgard Blücher, 2005. cap. 20, p. 485-524.

NASCIMENTO, R.F.; LIMA-NETO, B.S.; FRANCO, D.W. Aldeídos em bebidas alcoólicas fermento-destiladas. **O Engarrafador Moderno**, São Paulo, v. 49, p. 75-77, 1997a.

NASCIMENTO, R.F.; BEZERRA, C.W.B.; FUTUYA, S.M.B.; DE SANTÍ, I.A.A.; CAMPO, P.; POLASTRO, L.R.; SCULTZ, M.S.; LIMA-NETO, B.S.; FRANCO, D.W. A presença de metais nas caninhas brasileiras. **O Engarrafador Moderno**, São Paulo, v. 52, p. 70-76, mar. 1997b.

NASCIMENTO, R.F.; CARDOSO, D.R.; LIMA-NETO, B.S.; FRANCO, D.W.; FARIA, J.B. Influência do alambique na composição química das aguardentes de cana-de-açúcar. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 735-739, 1998.

NORDSTRÖM, K. Formation of esters, acids and alcohols from alfa-keti acids by brewer's yeast. **Journal of the Institute of Breweing**, London, v. 69, p. 483-495, 1963.

NOVAES, F.V.; OLIVEIRA, E.R.; STUPIELLO, J.P.; VASSECCHI, O. **Curso de extensão em tecnologia de aguardente de cana**: apontamentos. Piracicaba, ESALQ/Depto. de Ciência e Tecnologia Agro-Industrial, 1974. 140 p.

NOVAES, F.V. **Noções básicas sobre a teoria da destilação**. Piracicaba: ESALQ/Depto de Ciência e Tecnologia de Agroindustrial, 1994. 22p.

NOVO, M.; BELTRAN, G.; TORIJA, M. J.; POBLETT, M.; ROZES, N.; GUILLAMON, J. M.; MAS, A. Changes in wine yeast storage carbohydrate concentrations during preadaptation, rehydration and low-temperature fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, n. 1-2, p. 153-161, Sept. 2003.

NYKÄNEN, L., NYKÄNEN, I. Production of esters by different strains in sugar fermentations. **Journal of the Institute of Breweing**, London, v. 83, p. 30-31, Jan./Feb. 1977.

\_\_\_\_\_. Distilled beverages. In: MAARSE, H. (Ed.). **Volatile compounds in foods and beverages**. New York: Marcell Dekker, 1991. chap. 15, 764 p.

NYKÄNEN, L.; PUPUTTI, E.; SUOMALAINEN, H. Volatile fatty acids in some brands of whisky, cognac and rum. **Journal of Food Science**, Chicago, v.33, p. 88-92, 1968

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 25-31, jan./mar. 1997.

OLIVEIRA, A.F.; ANEFALOS, L.C.; GARCIA, L.A.; ISTAKE, M.; BURNQUIST, H.L. Caracterização do sistema agroindustrial da cachaça e seus principais desafios frente a expansão de seus mercados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 40, Passo Fundo, 2002. **Anais...** Passo Fundo: Ed. Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural, 2002. 1 CD ROM.

OLIVEIRA-FREGUGLIA, R.M.; HORII, J. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura mista com *Lactobacillus fermentum*. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 55, n. 3, p. 520-527, set./dez. 1998.

OUGH, C.S.; SCROWELL, E.A.; MOONEY, L.A. Formation of ethyl carbamate precursors during grape juice (Chardonnay) fermentation. I. Addition of amino acids, urea, and ammonia: Effects of fortification on intracellular and extracellular precursors. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 39, n. 3, p. 243-249, 1988.

PARAZZI, C. **Influência do desponte do colmo na qualidade tecnológica da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 1988. 131 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.

PARFAIT, A.; JOURET, C. Formation of higher alcohols in rum. **Annales de Technologie Agricole**, Paris, v.24, p.421-36, 1975.

PROGRAMA BRASILEIRO DE DESENVOLVIMENTO DA CACHAÇA-PBDAC. **Mercado externo**. Disponível em: <http://www.cachacadobrasil.com.br/br/index.htm>. Acesso em: 5 jun. 2006.

PEDDIE, H.A.B. Ester formation in brewery fermentations. **Journal of the Institute of Breweing**, London, v. 96, p. 327-331, Sept./Oct. 1990.

PIGOTT, J.R.; PATERSON, A. **Distilled beverage flavour**. New York: VCH, 1989. 352 p.

PIGGOTT, J.R; SHARP, R.; DUNCAN, R. E. B. **The science and technology of whiskies**. London: Longman Scientific & Technical, 1989. 410 p.

POTTER, N.N. **Food science**. Westport: AVI Publ., 1980. 653 p.

PRETORIUS, I.S. Tailoring wine yeast for the new millenium: novel approaches to the ancient art winemaking. **Yeast**, Davis, v.16, n. 8, p. 675-729, June. 2000.

PUECH, J.L. et al. Vieillissement du cognac. **Sciences des Aliments**, Paris, v. 4, n. 1, p. 66-80, 1983.

RAINIERI, S.; ZAMBONELLI, C.; TINI, V.; CASTELLARI, L.; GIUDICI, P. The enological traits of thermotolerant *Saccharomyces strains*. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 49, p. 319-324, 1998.

RAMSAY, C.M.; BERRY, D.R. Effect of temperature and pH on the formation of higher alcohols, fatty acids and esters in the malt whisky fermentation. **Food Microbiology**, London, v. 1, n. 2, p. 117-121, Apr. 1984.

RANKINE, B.C.; BRIDSON, D.A. Glycerol in Australian wines and factors influencing its formation. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 22, p. 6-12, 1971.

RATLEDGE, C.; EVANS, C. T. Lipids and their metabolism. In: ROSE, A. H., HARRISON, J. S. **The yeasts**. (2 nd. ed.). London: Academic Press, 1989. v. 3, chap.10, p. 367-455.



REED, G.; NAGODAWITHANA, T.W. Distiller's yeasts. In: REED, G.; PEPPLER, H.J. (Ed.). **Yeast technology**. (2 nd. ed.) New York: AVI Book, 1991. chap. 5, p. 304-316.

REED, G.; PEPPLER, H.J. **Yeast technology**. Westport: The AVI Publ., 1973. 378 p.

RIBEIRO, C.A.F.; HORII, J. Efeito de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* na tecnologia de aguardente de cana. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 16., Rio de Janeiro, 1998. Rio de Janeiro: SBCTA, 1998.

RIBEIRO, F.J.; LOPES, J.J.C.; FERRARI, S.E. Complementação de nitrogênio de forma contínua no processo de fermentação alcoólica. **Brasil Açucareiro**, v.105, n.1, p.26-30, 1987.

RIBEIRO, J.C.G.M. Matéria-prima. In: \_\_\_\_\_. **Fabricação artesanal da cachaça mineira**. Belo Horizonte: Ed. O Lutador, 2002. cap. 3, p. 9-29a.

\_\_\_\_\_. Preparo do mosto. In: \_\_\_\_\_. **Fabricação artesanal da cachaça mineira**. Belo Horizonte: Ed. O Lutador, 2002. cap. 7, p. 59-68b.

\_\_\_\_\_. Fermento. In: \_\_\_\_\_.

ROSE, A.H. **Alcoholic beverages**. New York: Academic Press, 1977. 760 p.

SANTOS, J.P.; FONTES, R.A.; MANTOVANI, B.H.M.; MANTOVANI, E.C.; PEREIRA FILHO, I.A.; BORBA, C.S.; ANDRADE, R.V.; AZEVEDO, J.T.; ANDREOLI, C. Perdas de grãos na cultura do milho. In: EMBRAPA - CNPMS. **Relatório técnico anual do Centro Nacional de Pesquisa de milho e sorgo 11192-1993**. Sete Lagoas, 1994. v. 6, p. 122-124.

SCHWAN, R.F.; CASTRO, H.A. Fermentação. IN: CARDOSO, M.G. **Produção de aguardente de cana de açúcar**. Lavras: Ed. UFLA, 2001. cap. 3, p. 113-128.

SERRA, A.; STREHAIANO, P.; TAILLANDIER, P. Influence of the temperatura and pH on *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* growth; impact of a wine yeast interspecific hybridization on these parameters. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 104, n. 3, p. 257-265, Oct. 2005.

SILVA, F.C.; CESAR, M.A.A.; SILVA, C.A.B. **Pequenas indústrias rurais de cana-de-açúcar**: melado, rapadura e açúcar mascavo. Brasil: EMBRAPA, 2003. 155 p.

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

SIMPSON, A.C. Manufacture of brandy. **Process Biochemistry**, Oxford, v.6, n. 2, p. 25-27, 1971.

SMEDT, P; LIDDLE, P. Identification of 1,1-diethoxy propa-2-one in spirits aged in wood. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 29, n. 4, p. 286-8, 1978.

SOLES, R.M.; OUGH, C.S.; KUNKEE, R.E. Ester concentration differences in wine fermented by various species and strains of yeasts. **American of Journal Enology and Viticulture**, Davis, v. 33, n. 2, p. 94-98, 1982.

SOUSA, M.V.F. **Interação de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus fermentum* na produção de cachaça artesanal.** 2005. 69 p. Dissertação (M. S.) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005

STEVENS, D.F.; OUGH, C.S. Ethyl carbamate formation: Reaction of urea and citrulline with ethanol in wine under low to normal temperature conditions. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 44, n. 3, p. 309-312, 1993.

STUPIELLO, J.P. Destilação do vinho. In: MUTTON, M.J.R.; MUTTON, M.A. (Ed.). **Aguardente de cana: produção e qualidade.** Jaboticabal: Ed. FUNEP, 1992. p. 67-78.

SUOMALAINEN, H. Yeast and its effect on the flavour of alcoholic beverages. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 77, n. 2, p. 164-177, 1971.

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

\_\_\_\_\_. The production of aroma compounds by yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v.85, n.3, p.149-56, May./June. 1978.

SUOMALAINEN, H.; KAHANPÄÄ, H. Formation of fusel alcohols from amino acids with branched chains. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 69, p. 473-478, 1963.

SUOMALAINEN, H.; NURMINEN, T. Some aspects of the structure and function of the yeast plasma membrane. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 82, n. 4, p. 218-225, July./Aug. 1976.

SUOMALAINEN, H.; NYKÄNEN, L. The aroma components produced by yeast in nitrogen-free sugar solution. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v.72, p.469-474, 1966.

SUOMALAINEN, H.; NYKÄNEN, L.; ERIKSON, K. Composition and consumption of alcoholic beverages. A review. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 25, n. 4, p. 179-187, 1974.

SUUTARI, M.; LIUKKONEN, K.; LAAKSO, S. Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids. **Journal of General Microbiology**, Reading, v.136, p.1469-1474, 1990.

TAYLOR, G.T.; KIRSHOP, B.H. The origin of the medium chain length fatty acids present in beer. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 83, p. 241-243, Jan./Feb. 1977.

TEGMO-LARSSON, I.M.; SPITTLER, T.D. Temperature and light effects on ethyl carbamate formation in wine during storage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 4, p. 1166-1169, 1990.

TEIXEIRA, C.G. Produção de álcool de milho. In: MORGENTHALER, J. (Ed.). **Cultura e adubação do milho**. São Paulo: Instituto Brasileiro de Potassa, 1966. cap.16, p. 488-505.

THEVELEIN, J. M. Regulation of trehalose metabolism and its relevance to cell growth and function. In: ESSER, K.; LEMKE, P.A (Ed.). **The Mycota: 3**. Biochemistry and molecular biology. Berlin: Springer-Verlag, 1998. cap. 4, p. 154-173.

TORIJA, M. J.; BELTRAN, G.; NOVO, M.; POBLET, M.; GUILLAMON, J. M.; MAS, A.; ROZES, N. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 1-2, p.127-136, Aug. 2003.

TRIBOLI, E.P.R. **Métodos analíticos para o acompanhamento da fermentação alcoólica**. São Caetano do Sul: Instituto Mauá de Tecnologia, 1987. 40 p.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG. Disponível em: <http://www.ufmg.br/boletim/bol1478/quarta.shtml>. Acesso em: 03 set. 2006.

Van DILLEWJN, C. **Botany of sugarcane**. Waltham: The Chronica Botanica, 1952. 371 p.

WATSON, D.C. The development of specialized yeast strain for use in Scotch malt whisky fermentation. In: STEWART, G.G.; RUSSELL, I. **Current developments in yeasts research**. Oxford: Pergamon, 1981. chap. 2, p. 57-62.

\_\_\_\_\_. Distilling yeast. In: Developments in industrial microbiology. Arlington: Society of Industrial Microbiology, 1984. v. 25, p.213-220

\_\_\_\_\_. Yeasts in distilled alcoholic-beverage production. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. 2<sup>nd</sup> ed. **The yeasts**. London: Academic Press, 1989. vol 5 chap. 6, p.215-244.

WATSON, K. Temperature relations. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. **The yeasts**. London: Academic Press, 1987. chap. 3, p. 41-71.

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

WEBB, A.D.; KEPNER, R.E. Fusel oil analysis by means of gas-liquid partition chromatography. **American Journal Enology Viticulture**, Davis, v.12, p. 51-59, 1961.

WHITE, J.B. **Yeast technology**, London: Chapman & Hall, 1954. 431 p.

WILLIAMS, P.J.; STRAUSS, C.R. A treatment of grape wine distillation heads. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 27, n. 6, p. 487-498, 1976.

WINDHOLSZ, M. (Ed.). **The merk index**: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Rahway: Merk, 1976.

YOKOYA, F. **Fabricação de aguardente de cana**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1995. 87 p. (Série Fermentações Industriais).

YOUNIS, O.S.; STEWART, G.G. Sugar uptake and subsequent ester and higher alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Institute of Brewing**, Davis, v. 104, p. 255-264, 1998.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **SANEST**: sistema de análises para microcomputadores. Pelotas: UFPel, 1984. 75p.

**APÊNDICES**

Apêndice A - Médias das linhagens para crescimento celular no meio YEPD a 20 °C.

Meio	Temperatura °C	Linhagem	Repetição	Crescimento celular g/L	
				Inicial	Final
YEPD	20	Y-904	1	5,15	7,76
YEPD	20	Y-904	2	5,15	7,61
YEPD	20	Y-904	3	5,15	7,89
YEPD	20	Y-904	4	5,15	7,65
YEPD	20	Y-904	5	5,15	8,06
<b>Média</b>					<b>7,79</b>
YEPD	20	CAT	1	5,15	7,96
YEPD	20	CAT	2	5,15	7,99
YEPD	20	CAT	3	5,15	7,93
YEPD	20	CAT	4	5,15	8,12
YEPD	20	CAT	5	5,15	8,01
<b>Média</b>					<b>8,00</b>
YEPD	20	EC	1	5,15	7,72
YEPD	20	EC	2	5,15	7,90
YEPD	20	EC	3	5,15	7,65
YEPD	20	EC	4	5,15	7,71
YEPD	20	EC	5	5,15	7,79
<b>Média</b>					<b>7,75</b>



Apêndice B - Médias das linhagens para crescimento celular YEPD a 32 °C.

Meio	Temperatura °C	Linhagem	Repetição	Crescimento celular g L <sup>-1</sup>	
				Inicial	Final
YEPD	32	Y-904	1	5,15	6,81
YEPD	32	Y-904	2	5,15	6,70
YEPD	32	Y-904	3	5,15	6,95
YEPD	32	Y-904	4	5,15	6,96
YEPD	32	Y-904	5	5,15	6,96
<b>Média</b>					<b>6,88</b>
YEPD	32	CAT	1	5,15	7,87
YEPD	32	CAT	2	5,15	7,73
YEPD	32	CAT	3	5,15	7,56
YEPD	32	CAT	4	5,15	7,69
YEPD	32	CAT	5	5,15	7,92
<b>Média</b>					<b>7,75</b>
YEPD	32	EC	1	5,15	6,86
YEPD	32	EC	2	5,15	6,83
YEPD	32	EC	3	5,15	6,94
YEPD	32	EC	4	5,15	7,13
YEPD	32	EC	5	5,15	7,04
<b>Média</b>					<b>6,96</b>

Apêndice C - Médias das linhagens para crescimento celular no meio com caldo de cana a 20 °C

Meio	Temperatura °C	Linhagem	Repetição	Crescimento celular g L <sup>-1</sup>	
				Inicial	Final
Caldo	20	Y-904	1	5,15	8,46
Caldo	20	Y-904	2	5,15	8,27
Caldo	20	Y-904	3	5,15	8,71
Caldo	20	Y-904	4	5,15	8,32
Caldo	20	Y-904	5	5,15	8,22
<b>Média</b>					<b>8,40</b>
Caldo	20	CAT	1	5,15	8,42
Caldo	20	CAT	2	5,15	8,31
Caldo	20	CAT	3	5,15	8,47
Caldo	20	CAT	4	5,15	8,54
Caldo	20	CAT	5	5,15	8,51
<b>Média</b>					<b>8,45</b>
Caldo	20	EC	1	5,15	7,63
Caldo	20	EC	2	5,15	7,47
Caldo	20	EC	3	5,15	7,79
Caldo	20	EC	4	5,15	7,59
Caldo	20	EC	5	5,15	7,86
<b>Média</b>					<b>7,67</b>

Apêndice D - Médias das linhagens para crescimento celular no meio com caldo de cana a 32 °C

Meio	Temperatura °C	Linhagem	Repetição	Crescimento celular g L <sup>-1</sup>	
				Inicial	Final
Caldo	32	Y-904	1	5,15	8,24
Caldo	32	Y-904	2	5,15	8,47
Caldo	32	Y-904	3	5,15	8,23
Caldo	32	Y-904	4	5,15	7,95
Caldo	32	Y-904	5	5,15	7,75
<b>Média</b>					<b>8,13</b>
Caldo	32	CAT	1	5,15	7,34
Caldo	32	CAT	2	5,15	7,06
Caldo	32	CAT	3	5,15	7,42
Caldo	32	CAT	4	5,15	7,08
Caldo	32	CAT	5	5,15	7,83
<b>Média</b>					<b>7,35</b>
Caldo	32	EC	1	5,15	9,97
Caldo	32	EC	2	5,15	9,78
Caldo	32	EC	3	5,15	9,17
Caldo	32	EC	4	5,15	9,75
Caldo	32	EC	5	5,15	10,04
<b>Média</b>					<b>9,74</b>

Apêndice E - Médias das linhagens para açúcar residual no meio YEPD a 20 °C.

Meio	Temperatura °C	Linhagem	Repetição	Concentração de açúcar g L <sup>-1</sup>		Açúcar consumido g L <sup>-1</sup>
				Inicial	Final	
YEPD	20	Y-904	1	142,68	1,30	141,38
YEPD	20	Y-904	2	142,68	1,08	141,60
YEPD	20	Y-904	3	142,68	1,04	141,64
YEPD	20	Y-904	4	142,68	1,05	141,63
YEPD	20	Y-904	5	142,68	1,39	141,29
<b>Média</b>					<b>1,17</b>	<b>141,51</b>
YEPD	20	CAT	1	142,68	1,39	141,28
YEPD	20	CAT	2	142,68	1,36	141,32
YEPD	20	CAT	3	142,68	1,21	141,47
YEPD	20	CAT	4	142,68	1,16	141,52
YEPD	20	CAT	5	142,68	1,19	141,48
<b>Média</b>					<b>1,26</b>	<b>141,41</b>
YEPD	20	EC	1	142,68	1,21	141,46
YEPD	20	EC	2	142,68	1,26	141,42
YEPD	20	EC	3	142,68	1,27	141,40
YEPD	20	EC	4	142,68	1,10	141,58
YEPD	20	EC	5	142,68	1,22	141,46
<b>Média</b>					<b>1,21</b>	<b>141,46</b>

Apêndice F - Médias das linhagens para açúcar residual no meio YEPD a 32 °C.

Meio	Temperatura °C	Linhagem	Repetição	Concentração de açúcar g L <sup>-1</sup>		Açúcar consumido g L <sup>-1</sup>
				Inicial	Final	
YEPD	32	Y-904	1	145,98	1,45	144,53
YEPD	32	Y-904	2	145,98	0,97	145,01
YEPD	32	Y-904	3	145,98	1,30	144,68
YEPD	32	Y-904	4	145,98	1,39	144,59
YEPD	32	Y-904	5	145,98	1,23	144,75
<b>Média</b>					<b>1,27</b>	
YEPD	32	CAT	1	145,98	1,58	144,39
YEPD	32	CAT	2	145,98	1,22	144,75
YEPD	32	CAT	3	145,98	1,54	144,43
YEPD	32	CAT	4	145,98	1,53	144,45
YEPD	32	CAT	5	145,98	1,54	144,44
<b>Média</b>					<b>1,49</b>	
YEPD	32	EC	1	145,98	1,44	144,54
YEPD	32	EC	2	145,98	1,31	144,67
YEPD	32	EC	3	145,98	1,44	144,54
YEPD	32	EC	4	145,98	1,73	144,25
YEPD	32	EC	5	145,98	1,41	144,57
<b>Média</b>					<b>1,47</b>	

Apêndice G - Médias das linhagens para açúcar residual no meio com caldo de cana a 20 °C.

Meio	Temperatura °C	Linhagem	Repetição	Concentração de açúcar g L <sup>-1</sup>		Açúcar consumido g L <sup>-1</sup>
				Inicial	Final	
Caldo	20	Y-904	1	168,04	9,03	159,01
Caldo	20	Y-904	2	168,04	7,19	160,85
Caldo	20	Y-904	3	168,04	8,20	159,84
Caldo	20	Y-904	4	168,04	10,05	157,99
Caldo	20	Y-904	5	168,04	8,05	159,99
<b>Média</b>					<b>8,50</b>	<b>159,53</b>
Caldo	20	CAT	1	168,04	1,65	166,39
Caldo	20	CAT	2	168,04	1,85	166,19
Caldo	20	CAT	3	168,04	1,61	166,43
Caldo	20	CAT	4	168,04	1,89	166,15
Caldo	20	CAT	5	168,04	1,64	166,40
<b>Média</b>					<b>1,72</b>	<b>166,31</b>
Caldo	20	EC	1	168,04	2,34	165,70
Caldo	20	EC	2	168,04	2,19	165,85
Caldo	20	EC	3	168,04	2,31	165,73
Caldo	20	EC	4	168,04	2,21	165,83
Caldo	20	EC	5	168,04	2,02	166,02
<b>Média</b>					<b>2,21</b>	<b>165,83</b>

Apêndice H - Médias das linhagens para açúcar residual no meio com caldo de cana a 32 °C.

Meio	Temperatura	Linhagem	Repetição	Concentração de açúcar g L <sup>-1</sup>		Açúcar consumido g L <sup>-1</sup>
				Inicial	Final	
Caldo	32	Y-904	1	158,04	2,46	155,58
Caldo	32	Y-904	2	158,04	2,10	155,94
Caldo	32	Y-904	3	158,04	3,48	154,56
Caldo	32	Y-904	4	158,04	2,88	155,16
Caldo	32	Y-904	5	158,04	3,09	154,95
<b>Média</b>					<b>2,80</b>	<b>155,24</b>
Caldo	32	CAT	1	158,04	2,56	155,48
Caldo	32	CAT	2	158,04	3,02	155,02
Caldo	32	CAT	3	158,04	2,83	155,21
Caldo	32	CAT	4	158,04	3,22	154,82
Caldo	32	CAT	5	158,04	2,97	155,07
<b>Média</b>					<b>2,92</b>	<b>155,12</b>
Caldo	32	EC	1	158,04	2,88	155,16
Caldo	32	EC	2	158,04	2,01	156,03
Caldo	32	EC	3	158,04	2,00	156,04
Caldo	32	EC	4	158,04	2,60	155,44
Caldo	32	EC	5	158,04	1,86	156,18
<b>Média</b>					<b>2,27</b>	<b>155,77</b>

Apêndice I - Médias das linhagens para teor alcoólico no meio YEPD a 20 °C.

<b>Meio</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>Linhagem</b>	<b>Repetição</b>	<b>Teor Alcoólico</b>
YEPD	20	Y-904	1	7,75
YEPD	20	Y-904	2	7,97
YEPD	20	Y-904	3	7,83
YEPD	20	Y-904	4	7,99
YEPD	20	Y-904	5	7,61
<b>Média</b>				<b>7,83</b>
YEPD	20	CAT	1	7,91
YEPD	20	CAT	2	7,75
YEPD	20	CAT	3	7,77
YEPD	20	CAT	4	7,77
YEPD	20	CAT	5	7,77
<b>Média</b>				<b>7,79</b>
YEPD	20	EC	1	7,75
YEPD	20	EC	2	7,56
YEPD	20	EC	3	7,56
YEPD	20	EC	4	7,59
YEPD	20	EC	5	7,64
<b>Média</b>				<b>7,62</b>



Apêndice J - Médias das linhagens para teor alcoólico no meio YEPD a 32 °C.

<b>Meio</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>Linhagem</b>	<b>Repetição</b>	<b>Teor Alcoólico</b>
YEPD	32	Y-904	1	7,48
YEPD	32	Y-904	2	7,59
YEPD	32	Y-904	3	7,61
YEPD	32	Y-904	4	7,67
YEPD	32	Y-904	5	7,67
<b>Média</b>				<b>7,60</b>
YEPD	32	CAT	1	7,06
YEPD	32	CAT	2	7,01
YEPD	32	CAT	3	7,22
YEPD	32	CAT	4	7,43
YEPD	32	CAT	5	7,53
<b>Média</b>				<b>7,25</b>
YEPD	32	EC	1	7,48
YEPD	32	EC	2	7,53
YEPD	32	EC	3	7,51
YEPD	32	EC	4	7,59
YEPD	32	EC	5	7,69
<b>Média</b>				<b>7,56</b>

Apêndice J - Médias das linhagens para teor alcoólico no meio com caldo de cana a 20 °C.

<b>Meio</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>Linhagem</b>	<b>Repetição</b>	<b>Teor Alcoólico</b>
Caldo	20	Y-904	1	9,91
Caldo	20	Y-904	2	9,19
Caldo	20	Y-904	3	9,55
Caldo	20	Y-904	4	9,58
Caldo	20	Y-904	5	9,30
<b>Média</b>				<b>9,50</b>
Caldo	20	CAT	1	8,29
Caldo	20	CAT	2	8,67
Caldo	20	CAT	3	8,94
Caldo	20	CAT	4	9,02
Caldo	20	CAT	5	9,02
<b>Média</b>				<b>8,79</b>
Caldo	20	EC	1	10,24
Caldo	20	EC	2	9,63
Caldo	20	EC	3	10,10
Caldo	20	EC	4	10,13
Caldo	20	EC	5	9,96
<b>Média</b>				<b>10,01</b>

Apêndice K - Médias das linhagens para teor alcoólico no meio com caldo de cana a 32 °C.

<b>Meio</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>Linhagem</b>	<b>Repetição</b>	<b>Teor Alcoólico</b>
Caldo	32	Y-904	1	8,69
Caldo	32	Y-904	2	8,77
Caldo	32	Y-904	3	8,72
Caldo	32	Y-904	4	8,66
Caldo	32	Y-904	5	8,56
<b>Média</b>				<b>8,68</b>
Caldo	32	CAT	1	8,31
Caldo	32	CAT	2	8,15
Caldo	32	CAT	3	8,26
Caldo	32	CAT	4	8,24
Caldo	32	CAT	5	8,23
<b>Média</b>				<b>8,24</b>
Caldo	32	EC	1	8,77
Caldo	32	EC	2	8,75
Caldo	32	EC	3	8,67
Caldo	32	EC	4	8,88
Caldo	32	EC	5	8,80
<b>Média</b>				<b>8,77</b>

Apêndice L - Valores de F e coeficiente de variação (C.V.) obtidos com a análise de variância dos dados de Crescimento Celular, Açúcar Residual e Teor Alcoólico a 20 °C.

Fonte de variação	G.L.	Crescimento celular	Açúcar residual	Teor Alcoólico
Meio	1	38,74*	321,15*	478,68*
Linhagem (Lin)	2	35,84*	167,94*	16,42*
Meio*Lin	2	16,30*	176,53*	27,38*
C.V. (%)		1,76	16,99	2,45

Apêndice M - Valores de F e coeficiente de variação (C.V.) obtidos com a análise de variância dos dados de Crescimento Celular, Açúcar Residual e Teor Alcoólico a 32 °C.

Fonte de variação	G.L.	Crescimento celular	Açúcar residual	Teor Alcoólico
Meio	1	190,94*	113,45*	674,29*
Linhagem (Lin)	2	39,63*	2,64 <sup>ns</sup>	42,41*
Meio*Lin	2	110,90*	3,75*	2,44 <sup>ns</sup>
C.V. (%)		3,07	15,90	1,43

Apêndice N - Valores de F e coeficiente de variação (C.V.) obtidos com a análise de variância dos dados de Teor Alcoólico, Ésteres e Aldeídos.

Fonte de variação	G.L.	Teor alcoólico	Ésteres	Aldeídos
Temperatura (Temp)	1	2,36 <sup>ns</sup>	22,69*	0,43 <sup>ns</sup>
Linhagem (Lin)	2	0,08 <sup>ns</sup>	9,48*	5,48*
Temp*Lin	2	3,24 <sup>ns</sup>	4,24 <sup>ns</sup>	1,85 <sup>ns</sup>
C.V. (%)		2,80	19,80	23,89

Apêndice O- Valores de F e coeficiente de variação (C.V.) obtidos com a análise de variância dos dados de Acidez volátil, Álcoois superiores e Álcool metílico.

Fonte de variação	G.L.	Acidez volátil	Álcoois superiores	Álcool metílico
Temperatura (Temp)	1	35,02*	5,40 <sup>ns</sup>	3,93 <sup>ns</sup>
Linhagem (Lin)	2	13,89*	48,73*	11,26*
Temp*Lin	2	6,21*	8,99*	6,79*
C.V. (%)		9,47	5,49	8,02

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)