

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

FLÁVIA BARBOSA MAGALHÃES ALVARENGA

CO-CULTIVO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS E *Saccharomyces cerevisiae* PARA MELHORIA DO PROCESSO FERMENTATIVO DE PRODUÇÃO DE CACHAÇA

Belo Horizonte

2023

FLÁVIA BARBOSA MAGALHÃES ALVARENGA

CO-CULTIVO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS E *Saccharomyces cerevisiae* PARA MELHORIA DO PROCESSO FERMENTATIVO DE PRODUÇÃO DE CACHAÇA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor de Microbiologia.

Orientador: Carlos Augusto Rosa

Coorientadora: Katharina de Oliveira Barros

Belo Horizonte

2023

043

Alvarenga, Flávia Barbosa Magalhães.

Co-cultivo de bactérias ácido lácticas e *Saccharomyces cerevisiae* para melhoria do processo fermentativo de produção de cachaça [manuscrito] / Flávia Barbosa Magalhães Alvarenga. – 2023.

81 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Carlos Augusto Rosa. Coorientadora: Katharina de Oliveira Barros.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Cachaça. 3. Fermentação. 4. *Saccharomyces cerevisiae*. I. Rosa, Carlos Augusto. II. Barros, Katharina de Oliveira. III. Universidade Federal e Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE DE FLÁVIA BARBOSA MAGALHÃES ALVARENGA
Nº REGISTRO: 2019709141

Às 13:30 horas do dia 01 de setembro de 2023, reuniu-se na sala de Seminários do Instituto de Ciências Biológicas - UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Ary Correa Junior (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Inayara Cristina Alves Lacerda (Departamento de Alimentos/Farmácia /UFMG), Beatriz Martins Borelli (FAMINAS-BH), Fátima de Cassia Oliveira Gomes (Centro Federal de Educação Tecnológica/ CEFET - MG), Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa (Orientador) e a Dra. Katharina de Oliveira Barros (Coorientadora), para julgar o trabalho final "Co-cultivo de bactérias ácido lácticas e *Saccharomyces cerevisiae* para melhoria do processo fermentativo de produção de cachaça" da aluna Flávia Barbosa Magalhães Alvarenga, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 01 de setembro de 2023

Membros da Banca:

Prof. Dr. Ary Correa Junior

Profa. Dra. Inayara Cristina Alves Lacerda

Profa. Dra. Beatriz Martins Borelli

Profa. Dra. Fátima de Cassia Oliveira Gomes

De acordo:

Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa

(Orientador)

Dra. Katharina de Oliveira Barros
(Coorientadora)

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos
(Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por Beatriz Martins Borelli, Usuário Externo, em 05/09/2023, às 10:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Katharina de Oliveira Barros, Usuária Externa, em 05/09/2023, às 11:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Carlos Augusto Rosa, Coordenador(a), em 05/09/2023, às 11:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Daniel de Assis Santos, Coordenador(a) de curso de pós-graduação, em 05/09/2023, às 11:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Ary Correa Junior, Professor do Magistério Superior, em 05/09/2023, às 12:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Fatima de Cassia Oliveira Gomes, Usuário Externo, em 05/09/2023, às 15:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Inayara Cristina Alves Lacerda, Membro de comissão, em 06/09/2023, às 14:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2558351 e o código CRC 876B4BBA.

Dedico este trabalho ao meu saudoso avô Fernando, que ao longo de sua vida se tornou meu grande guia de honra, caráter e dedicação incansável. Seu exemplo inspirador moldou não apenas minha ética de trabalho, mas também minha busca incessante por conhecimento. E, entre todas as lições, até mesmo o gosto pela cachaça, compartilhado com sorrisos e histórias que aqueceram nossos corações. Sua presença permanece viva em mim, guiando-me em cada passo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Jamais poderia imaginar a complexidade de escrever estas palavras de agradecimento, se comparando até mesmo a execução dos experimentos e a própria redação desta tese. Seis anos e alguns meses se passaram desde o meu primeiro dia, ainda no mestrado, dentro deste laboratório. Uma trajetória nada fácil, mas repleta de encontros com pessoas maravilhosas que tornaram tudo mais simples, amizades que serão por toda a vida.

Foram muitos os desafios, noites sem fim planejando e repassando os experimentos na cabeça para que nada saísse fora do esperado. Alguns momentos de desespero e lágrimas, só um chorinho as vezes para aliviar. Incontáveis cafés da tarde e Jaeh com papos jogados fora e risadas daquelas que doem a barriga. Tentar colocar no papel meus sentimentos neste estágio de conclusão é, uma tarefa quase impossível. À medida que o final aproxima, carrego comigo uma sensação complexa de gratidão, saudade e otimismo.

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho e para a minha jornada acadêmica. Sem o apoio e a colaboração de cada um de vocês, nada seria possível.

Gostaria de expressar minha mais profunda gratidão ao meu orientador, Carlos. Sua experiência, paciência e calma infinita, seus insights valiosos e desenhos maravilhosos de experimentos (tenho todos guardados) foram fundamentais para moldar este trabalho e meu crescimento como pesquisadora. Obrigada por mais uma vez confiar em mim e me permitir fazer parte do seu grupo de pesquisa. Te admiro imensamente, e gostaria de um dia me tornar pelo menos um pouquinho do profissional que você é.

À minha coorientadora e amiga, Katharina, agradeço por compartilhar seu tempo e conhecimento, por sempre me incentivar a buscar novos horizontes, por pegar na minha mão e falar “vamos juntas que vou te ajudar no que for preciso”. Sua presença, mesmo em outro país, e apoio constante foram fundamentais ao longo dessa jornada.

Ao CNPq e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia agradeço o apoio financeiro e oportunidade de desenvolvimento acadêmico proporcionados. Essa base sólida permitiu que eu me concentrasse integralmente na pesquisa.

Agradeço de todo meu coração aos meus familiares, especialmente aos meus pais Terêsa e Márcio, e aos meus irmãos Márcio e Pedro, minha avó Tetê e a minha irmã de alma Thamiris. O amor que vocês me deram, o incentivo constante e a compreensão foram impulsionadores para cada passo que dei. Nas situações mais desafiadoras, encontrei refúgio nas palavras de encorajamento vindas de vocês.

Ao meu marido, meu muito obrigada, pelo seu inabalável companheirismo, compreensão e apoio ao longo de toda a minha jornada de doutorado. A sua disposição em tornar as coisas mais fáceis para mim, permitindo que eu me concentrasse plenamente no doutorado, foi um presente imensurável. Além disso, sua valiosa contribuição nas análises dos meus dados foi fundamental. Sua presença e suporte foram a âncora que me permitiu passar de forma mais calma pelas tempestades acadêmicas.

Aos amigos de laboratório, cuja colaboração, troca de ideias e amizade tornaram o ambiente de pesquisa enriquecedor e inspirador, minha gratidão. Compartilhamos não apenas espaços de trabalho, mas também conquistas e obstáculos, construindo laços que perdurarão além desta etapa. Luiza, Bárbara, Thaís, Graci, Nath, Vivi, Amandinha, Fernanda, Ana Raquel e a todos do Lab Fungos, vocês são demais! Um agradecimento mais que especial as minhas amigas Lívia e Gisele, que foram essenciais em minha caminhada, vocês foram meu apoio, meu Norte, meu porto seguro.

Agradeço aos professores Bruno Botelho, Fátima Gomes, Inayara Lacerda e Verônica Alvarenga, por todo o apoio à minha pesquisa. Sua generosidade em disponibilizar espaço em seus laboratórios, emprestar equipamentos essenciais e compartilhar conhecimentos valiosos foi fundamental para o sucesso deste trabalho.

Este momento marca o ápice de anos de dedicação e esforço, e cada um de vocês contribuiu para que esta jornada fosse repleta de aprendizado e realizações. Novamente, a todos que de alguma forma estiveram ao meu lado, o meu mais sincero obrigada.

"Na fermentação, onde a magia da transformação se revela, os microrganismos nos brindam com o sabor da ciência e o aroma da tradição."

RESUMO

A cachaça, um destilado obtido através da fermentação do caldo da cana de açúcar, assume um papel de considerável relevância tanto no contexto cultural quanto na esfera econômica do país. O presente trabalho teve como objetivo estudar a aplicação de linhagens de bactérias ácido lácticas (BAL) em co-fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de cachaça, assim como a utilização destas bactérias em uma etapa de re-fermentação do vinho produzido. Processo similar a esta etapa de re-fermentação é utilizado na produção de vinho e whisky, nos quais a fermentação com bactérias é realizada para confeir uma maior diversidade de aromas e sabores. Um total de vinte e seis isolados de BAL, provenientes das dornas de fermentação da cachaça, foram selecionado para os testes de fermentação. Estes isolados foram identificados por sequenciamento da subunidade menor do gene do rRNA. As BAL foram submetidas a ensaios de crescimento em meio sintético semelhante ao caldo de cana e fermentações em escala de bancada. O consumo dos açúcares e a síntese de etanol e glicerol foram analisados, assim como os parâmetros de rendimento, eficiência e produtividade. Posteriormente, foi então conduzida a produção das cachaças em escala piloto, abrangendo tanto a etapa de fermentação quanto a destilação. Além disso, foram realizadas análises dos compostos secundários gerados durante o processo, bem como da concentração de cobre presente nas amostras. A partir dos testes conduzidos, duas bactérias ácido lácticas foram selecionadas: *Lactocaseibacillus paracasei* CO30547 e, *Lactiplantibacillus plantarum* BALS1.1. Estas mostraram desempenho altamente satisfatório em todas os experimentos realizados. As cachaças obtidas por re-fermentação apresentaram quantidades superiores de acetato de etila, importante composto aromático relacionado ao flavour da bebida, quando comparadas às produzidas por co-fermentação. Os resultados obtidos revelaram que as bactérias escolhidas exerceram uma influência positiva sobre o processo de fermentação da cachaça, promovendo a geração de compostos voláteis desejáveis e mantendo-se em conformidade com os limites legais preestabelecidos.

Palavras- chave: cachaça; bactéria ácido láctica; cultura iniciadora; *Saccharomyces cerevisiae*; co-fermentação; re-fermentação.

ABSTRACT

Cachaça, a distilled spirit obtained through the fermentation of sugarcane juice, plays a significant role both in the cultural context and in the economic sphere of the country. The present study aimed to investigate the application of lactic acid bacteria (LAB) strains in co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for cachaça production, as well as the use of these bacteria in a wine re-fermentation step. A process similar to this re-fermentation step is used in wine and whisky production, where bacterial fermentation is employed to impart a greater diversity of aromas and flavors. A total of twenty-six isolates of LAB, derived from cachaça fermentation vats, were selected for fermentation tests. These isolates were identified through sequencing of the small subunit of the rRNA gene. The LAB were subjected to growth assays in a synthetic medium similar to sugarcane juice and bench-scale fermentations. Sugar consumption, as well as ethanol and glycerol synthesis, were analyzed, along with yield, efficiency, and productivity parameters. Subsequently, the production of cachaça was carried out on a pilot scale, encompassing both the fermentation and distillation stages. Additionally, analyses of secondary compounds generated during the process were performed, along with the concentration of copper present in the samples. From the conducted tests, two lactic acid bacteria were selected: *Lactobacillus paracasei* CO30547 and *Lactiplantibacillus plantarum* BALS1.1. These exhibited highly satisfactory performance in all experiments conducted. Cachaças obtained through re-fermentation showed higher amounts of ethyl acetate, an important aromatic compound related to the beverage's flavor, compared to those produced through co-fermentation. The obtained results revealed that the chosen bacteria had a positive influence on the cachaça fermentation process, promoting the generation of desirable volatile compounds and remaining in compliance with predetermined legal limits.

Keywords: cachaça; lactic acid bacteria; starter culture; *Saccharomyces cerevisiae*; co-fermentation; re-fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de produção de cachaça de alambique (Fonte: adaptada de VILELA, 2005).....	20
Figura 2 - Alambiques de destilação de cachaça. (A) Destilador de cobre para produção de cachaça de alambique/artesanal. (B) Destilador industrial para produção de cachaça de coluna	23
Figura 3 - Colorímetro portátil HI747 Checker® HC	45
Figura 4 - Produção de etanol e glicerol, consumo de açúcares e variação do peso seco (g/L) durante a fermentação realizada pela bactéria <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> BALR 2A1.....	55
Figura 5 - Produção de etanol e glicerol, consumo de açúcares e variação do peso seco (g/L) durante a fermentação realizada pela bactéria <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> BALS 1.1	55
Figura 6 - Produção de etanol e glicerol, consumo de açúcares e variação do peso seco (g/L) durante a fermentação realizada pela bactéria <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> CO30547	56
Figura 7 - Produção de etanol e glicerol, consumo de açúcares e variação do peso seco (g/L) durante a fermentação realizada pela levedura controle <i>S. cerevisiae</i> UFMG-1007.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Limite de concentração de produtos secundários presentes na cachaça, segundo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.....	33
Tabela 2 - Limites dos contaminantes orgânicos e inorgânicos presentes na cachaça, segundo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.....	33
Tabela 3 - Espécies de bactérias utilizadas no presente estudo.....	48
Tabela 4 - Taxa de crescimento máximo dos microrganismos utilizados no presente trabalho.	50
Tabela 5 - Concentração de sacarose, glicose, frutose, etanol e glicerol, em gramas por litro, ao longo de 24 horas de fermentação de caldo de cana, com os microrganismos utilizados no presente trabalho.	54
Tabela 6 - Peso seco em gramas por litros das bactérias e levedura ao longo de 24 horas de fermentação nos tempos 0, 6, 13 e 24 horas	57
Tabela 7 - Parâmetros Fermentativos das bactérias, e da levedura controle avaliado durante 24 horas	59
Tabela 8 - Condições de fermentação e destilação da cachaça produzida com e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG-1007 e a bactéria <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> BALS 1.1	61
Tabela 9 - Condições de fermentação e destilação da cachaça produzida com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG-1007 e <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> CO30547	62
Tabela 10 - Condições de fermentação e destilação da cachaça produzida com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG-1007	63
Tabela 11 - Valores de cobre encontrado nas amostras de cachaça em co-fermentação e re-fermentação produzidas no presente trabalho.....	64
Tabela 12 - Média da concentração de compostos secundários encontrados nas cachaças produzidas com a associação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG-1007 e <i>Lactip. plantarum</i> BALS1.1 (valores expressos em mg/100mL de álcool anidro)65	
Tabela 13 - Média da concentração de compostos secundários encontrados na cachaça produzida com a associação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG-1007 e <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> CO30547 (valores expressos em mg/100mLde álcool anidro)	66

Tabela 14 - Média da concentração de compostos secundários encontrados na cachaça produzida com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG-1007 (valores expressos em mg/100mL de álcool anidro).....	66
Tabela 15 – Média da acidez volátil das cachaças produzidas no presente trabalho (valores expressos em mg/100mL de álcool anidro).....	69

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Cálculo do rendimento fermentativo:.....	42
Equação 2 - Cálculo da eficiência fermentativa:.....	43
Equação 3 - Cálculo de produtividade da fermentação:.....	43
Equação 4 - Fórmula para determinação de acidez.....	47

SUMÁRIO

1. Justificativa e Relevância.....	18
2. Referencial teórico.....	19
2.1. Produção da cachaça.....	19
2.2. Importância econômica da cachaça.....	23
2.3. Fermento.....	25
2.3.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como cultura iniciadora na produção de cachaça.....	27
2.3.2. Bactérias ácido lácticas.....	29
2.4. Formação de Compostos Secundários.....	32
3. Objetivos.....	38
3.1. Objetivos específicos.....	38
4. Material e métodos.....	39
4.1. Microrganismo.....	39
4.2. Identificação das bactérias ácido lácticas.....	39
4.3. Capacidade de crescimento das bactérias ácido lácticas em meio sintético semelhante a caldo de cana (MSCC).....	40
4.4. Teste de fermentação em escala laboratorial.....	41
4.4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	41
4.4.2. Peso seco.....	41
4.4.3. Cálculo dos parâmetros fermentativos.....	42
4.5. Produção da cachaça em escala piloto.....	43
4.5.1. Produção do inóculo.....	43
4.5.2. Fermentação.....	44
4.5.3. Destilação.....	44
4.6. Análise de Cobre.....	45
4.7. Cromatografia Gasosa.....	45

4.8. Acidez da cachaça	46
5. Resultados e discussões	47
5.1. Identificação das bactérias ácido lácticas	47
5.2. Capacidade de crescimento em MSCC	49
5.3. Produção e análise da cachaça em escala laboratorial	52
5.3.1. Utilização de açúcares e produção de etanol e glicerol.....	52
5.3.2. Peso seco.....	56
5.4. Parâmetros fermentativos	58
5.5. Produção da cachaça em escala piloto	60
5.6. Análise de cobre.....	64
5.7. Cromatografia Gasosa	65
5.8. Acidez da cachaça	69
6. Conclusões	72
7. Referências bibliográficas	73

1. Justificativa e Relevância

A cachaça, uma bebida tradicionalmente brasileira, é obtida por meio da fermentação e destilação do caldo de cana de açúcar. A produção é relatada desde o início da colonização e, a partir da década de 1940, houve um crescimento significativo na produção nacional, impulsionando a melhoria do processo produtivo. Estima-se que existam cerca de 40 mil produtores, gerando aproximadamente 600 mil empregos diretos e indiretos. São Paulo destaca-se como o maior produtor de cachaça de coluna, enquanto Minas Gerais lidera a produção de cachaça de alambique.

A qualidade da cachaça está diretamente relacionada à identidade e ao controle das leveduras e bactérias presentes durante a fermentação, bem como a condições de estresse a que estas são submetidas. Vários estudos têm sido realizados sobre o uso de culturas iniciadoras de leveduras para a fermentação alcoólica. No entanto, a literatura científica ainda é escassa em relação à influência positiva do uso de culturas iniciadoras de bactérias ácido lácticas na produção de cachaça.

Considerando que as bactérias ácido lácticas (BAL) são reconhecidas por sua influência positiva na produção de vinhos e whisky, é possível inferir que estas também podem desempenhar um papel benéfico na produção de cachaça. Portanto, este estudo tem como objetivo testar linhagens de bactérias ácido lácticas como culturas iniciadoras para a produção de cachaça. As linhagens de bactérias ácido lácticas estudadas foram isoladas de dornas de fermentação de cachaça e inicialmente identificadas por meio do sequenciamento do gene 16S do rRNA. Em seguida, as bactérias foram testadas quanto à capacidade de crescimento em meio sintético semelhante ao caldo de cana. O consumo de açúcar e a produção de compostos gerados por essas bactérias durante a fermentação em escala de bancada também foram analisados. Posteriormente, esses microrganismos foram testados em condições de co-fermentação e re-fermentação em escala laboratorial e piloto, e os produtos obtidos a partir dessas fermentações foram submetidos à análise por cromatografia gasosa.

2. Referencial teórico

2.1. Produção da cachaça

Cachaça é a denominação típica e exclusiva da bebida produzida no Brasil a partir da fermentação e destilação do caldo de cana de açúcar, com graduação alcoólica entre 38% e 48% em volume a 20°C, com a possibilidade de ser acrescida de até 6g/L de açúcares, expresso em sacarose (BRASIL, 2021). A produção da cachaça no Brasil data desde o período da colonização, quando as primeiras mudas de cana de açúcar e a técnica de destilação já dominada pelos portugueses chegaram ao país. Até meados de 1940, a produção da cachaça era de natureza doméstica e rudimentar. A partir desse momento, ocorreu um processo de industrialização da produção com o surgimento de grandes alambiques e o aprimoramento das técnicas de preparo, incluindo a utilização de equipamentos adequados. Tal evolução resultou em significativas melhorias nos índices de rendimento, produtividade e qualidade do produto (SOUZA, 2004; A LAVOURA, 2016).

A produção da cachaça artesanal segue um fluxograma, como mostrado na Figura 1. Inicialmente, ocorre a extração do caldo de cana de açúcar por meio de uma moenda que posteriormente é filtrado e decantado para separar resíduos sólidos e bagacilho. Em seguida, o caldo é diluído com água potável não clorada visando obter maior rendimento e melhor eficiência de fermentação (RAMOS & GONÇALVES, 2018).

A fermentação da cachaça ocorre em duas etapas. Na primeira etapa há a propagação do microrganismo que será utilizado como fermento em condições aeróbicas e baixa concentração de açúcar, não superior a 3%. Os ingredientes adicionados a produção do fermento podem variar, como frutas cítricas, farinha de milho, farelo de arroz ou de soja, desde que forneçam os nutrientes necessários para o desenvolvimento adequado das leveduras (PAULO et al., 2016; ROSA et al., 2016). Após um período de preparo do fermento, que varia de 5 a 30 dias dentro da dorna de fermentação, inicia-se a segunda etapa, que é a fermentação propriamente dita. O caldo de cana, com temperatura ambiente e concentração de açúcar entre 14 e 16°B, é adicionado ao fermento, resultando na conversão do açúcar em CO₂ e etanol. O término desse processo é determinado pela redução do gás carbônico, diminuição da temperatura e consumo completo do açúcar pelas leveduras, seguido pela

decantação destas no fundo das dornas (CECATO-ANTONINI, 2010; ROSA et al., 2016).

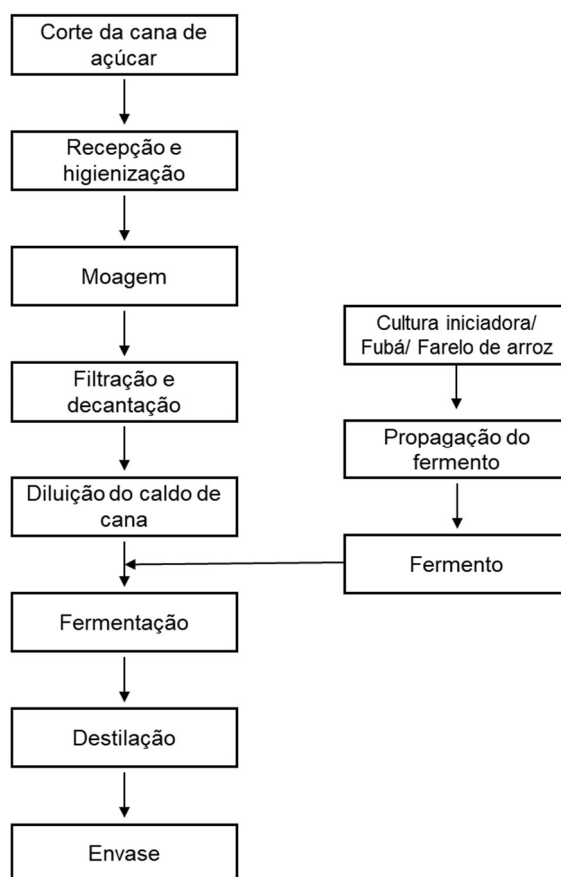


Figura 1 - Fluxograma de produção de cachaça de alambique (Fonte: adaptada de VILELA, 2005)

Tradicionalmente, as cachaças são produzidas por meio de fermentação espontânea, onde microrganismos presentes na moagem da cana e equipamentos utilizados para a produção da bebida são responsáveis pelo processo. No entanto, também é possível utilizar fermentos comerciais. O tempo médio de fermentação do caldo de cana é de 24 horas e existem três sistemas principais para conduzir esse processo: o sistema convencional em batelada, o sistema descontínuo alimentado e o sistema contínuo (ROSA et al., 2016).

No método convencional, o inóculo e o meio de fermentação são colocados juntos na dorna de fermentação, e após 24 horas, o inóculo é descartado, ocorre a destilação e o processo pode ser reiniciado. Nesse sistema, as leveduras são expostas a altas concentrações de etanol, o que pode afetar seu metabolismo. Já no

sistema de bateladas sucessivas, o fermento (inóculo) é reaproveitado em várias fermentações subsequentes. No sistema descontínuo alimentado, o caldo de cana é adicionado gradualmente à dorna para garantir uma concentração de açúcar pré-determinada. Por fim, no processo contínuo, o substrato é continuamente alimentado na dorna, e uma parte do líquido livre de leveduras é retirada de forma contínua para a destilação (SOUZA et al., 2013; LIZ et al., 2016).

Durante o processo fermentativo da cachaça, é fundamental realizar o controle de diversas etapas para assegurar a obtenção de um produto de qualidade. Essas etapas incluem o monitoramento da concentração de açúcares ao longo de todo o processo, utilizando um refratômetro para medir em graus Brix. É necessário verificar se há uma queda na concentração de açúcares, o que indica que eles estão sendo consumidos pelas leveduras. Além disso, a temperatura do mosto deve ser cuidadosamente controlada levando em consideração que a produção de cachaça ocorre em diferentes partes do país e em diferentes épocas do ano. A variação de temperatura pode ser significativa, oscilando entre 15 e 42°C, mas a faixa de temperatura ideal para uma fermentação situa-se entre 20-30°C. O tempo de fermentação também desempenha um papel importante. O período ideal varia de 12 a 24 horas para garantir uma fermentação completa e adequada. É essencial observar a evolução do aroma durante o processo, pois este deve ser característico do substrato fermentado, agradável e frutado. Qualquer alteração com a formação de odores desagradáveis pode indicar contaminação e comprometer a qualidade do produto final. Outro fator a ser considerado é o aspecto da espuma formada durante a fermentação. A espuma deve ser leve e fácil de ser rompida. Se a espuma estiver densa e pesada, o que dificulta a liberação do dióxido de carbono (CO₂), pode ser um indício de contaminação. O pH do caldo de cana também deve ser controlado, mantendo-se entre 5 e 5,5, o que indica um bom estágio de maturação. Por fim, o rendimento da fermentação é crucial, sendo influenciado por todos os fatores mencionados anteriormente. Ao observar de forma efetiva e de acordo com as orientações técnicas todos os parâmetros citados, é possível garantir o máximo de rendimento e qualidade na produção da cachaça (PEREIRA et al., 2006; SOUZA et al., 2013; ROSA et al., 2016).

Após a fermentação completa do mosto, ocorre a formação do vinho, que é composto por constituintes sólidos, líquidos e gasosos. Para separar essas fases, o

vinho passa por um processo de decantação onde as partes sólida e líquida são segregadas. Em seguida, o vinho é submetido à destilação, e resulta em duas frações: a flegma e a vinhaça. O flegma é o produto principal da destilação, constituído por uma mistura impura de natureza hidroalcoólica, cujo teor alcoólico varia dependendo do tipo de equipamento utilizado no processo de destilação. Por outro lado, a vinhaça é o resíduo remanescente da destilação, composto por água, sais, leveduras, bactérias e diversos resíduos (ROSA et al., 2016).

O processo de destilação tem como objetivo separar e concentrar os compostos voláteis presentes no vinho, descartando a fração residual. Nos alambiques, ocorre a destilação simples que separa gradualmente os compostos com base na volatilidade. Assim, os compostos mais voláteis, como metanol e acetaldeído, são destilados primeiro na fração conhecida como "cabeça", correspondendo a cerca de 5-10% do volume. Os compostos menos voláteis, como os álcoois superiores, são destilados nas frações "coração" e "cauda". O "coração" é a parte mais importante do destilado, representando 80 a 85% do volume e contendo aldeídos, ésteres, álcoois superiores e alguns produtos secundários. A "cauda" corresponde a aproximadamente 10% do volume e contém compostos secundários de alto ponto de ebulição (SCHWAN et al., 2001; MAIA & CAMPELLO et al., 2006; ROSA et al., 2016; DE OLIVEIRA, 2022). Um dos principais fatores para obter uma boa destilação da cachaça é a definição precisa do "coração" da bebida, o que requer a determinação e padronização do Brix inicial do mosto e do teor alcoólico do vinho (SORATTO, 2007; OLIVEIRA et al., 2021).

Existem dois tipos de cachaça produzidos no Brasil: a cachaça de coluna, também conhecida como cachaça industrial, e a cachaça de alambique ou artesanal. Legalmente, não há diferenciação entre elas, mas há variação no processo de destilação (SEBRAE-MG, 2013; ROSA et al., 2016). Enquanto a cachaça de coluna é geralmente produzida em larga escala pelas indústrias, com destilação em colunas de aço inoxidável (Figura 2 - B), a cachaça de alambique (Figura 2 - A) é produzida em menor escala, porém possui uma expressividade comercial significativa. Sua formulação varia entre os produtores e a destilação ocorre exclusivamente em alambiques de cobre (ROSA et al., 2016; MARTINS et al., 2018; BRASIL, 2021).

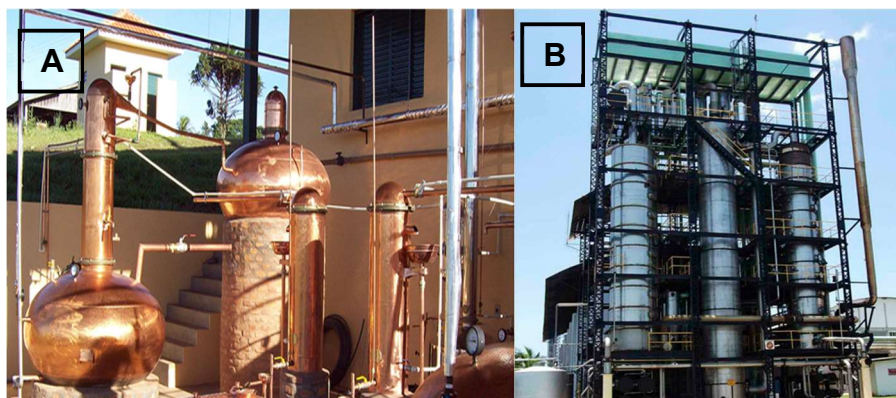


Figura 2 - Alambiques de destilação de cachaça. (A) Destilador de cobre para produção de cachaça de alambique/artesanal. (B) Destilador industrial para produção de cachaça de coluna

2.2. Importância econômica da cachaça

O setor de produção de cachaça revela perspectivas otimistas em relação ao mercado consumidor. Esse cenário promissor deriva do fato de que o produto está sendo cada vez mais reconhecido e valorizado como uma autêntica expressão da cultura brasileira. A cachaça tem perdido a antiga imagem de uma bebida subestimada e de qualidade inferior, sendo agora apreciada e equiparada a destilados renomados como whisky e vodka. Esse redirecionamento da percepção do público contribui para solidificar a posição da cachaça como uma escolha distinta e respeitável no universo das bebidas (SEBRAE, 2014).

Estima-se que no Brasil existam cerca de 40 mil produtores de cachaça em atividade, que geram aproximadamente 600 mil empregos diretos e indiretos. A produção anual nacional é de aproximadamente 1,4 bilhão de litros de cachaça, chegando a 2 bilhões de litros quando levamos em consideração os produtores não registrados. Embora 90% da produção de cachaça seja legalizada, acredita-se que 85% dos produtores, principalmente micro e pequenos produtores, atuem de forma informal. Ademais, 70% da produção está relacionada à cachaça de coluna ou industrial, enquanto o restante corresponde à cachaça de alambique. O consumo anual de cachaça chega perto de 11,5 litros por habitante e movimenta cerca de 7 bilhões de reais (SEBRAE, 2014; FGV, 2018; IBRAC, 2018; MAPA, 2021).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) registra a existência de 4.969 marcas de cachaça em circulação no Brasil, sendo notável o destaque do estado de Minas Gerais, com um total de 1.587 marcas (FGV, 2018;

MAPA, 2021, BRASIL, 2022). São Paulo é reconhecido como o maior produtor de cachaça de coluna, enquanto Minas Gerais lidera na produção de cachaça de alambique. Adicionalmente, outros estados que também se destacam na produção nacional de cachaça incluem Rio de Janeiro, Pernambuco, Ceará e Paraíba. No que diz respeito aos estados de maior consumo, destacam-se São Paulo, Pernambuco, Rio de Janeiro, Ceará, Bahia e Minas Gerais (SEBRAE, 2014; IBRAC, 2018; IBRAC, 2023).

Apesar de grande parte da produção de cachaça ser destinada ao mercado interno, em 2017 houve um aumento de 4,32% nas exportações em comparação a 2016, marcando o segundo ano consecutivo de crescimento das exportações (IBRAC, 2018). No entanto, em 2020, as exportações de cachaça sofreram uma queda devido às dificuldades econômicas enfrentadas por diversos países em decorrência da pandemia de Covid-19 (SALATI, 2021). Em 2022, as exportações do setor alcançaram um marco histórico, registrando o maior valor dos últimos 12 anos. De acordo com os dados do ComexStat (Ministério da Economia), compilados pelo Instituto Brasileiro da Cachaça (Ibrac), o valor exportado atingiu US\$ 20,08 milhões, representando um aumento significativo de 52,38% em relação a 2021. Em termos de volume, houve um acréscimo de 29,03%, totalizando mais de 9,3 milhões de litros. No decorrer do ano, a cachaça foi enviada para mais de 75 países, com destaque para os Estados Unidos, Alemanha, Portugal, França e Itália como os principais destinos em termos de valor (CACHAÇA, 2023).

Embora a cachaça tenha ganhado destaque tanto no Brasil quanto no cenário internacional, ainda há muito a explorar e entender para que ela alcance todo o seu potencial e devido reconhecimento. O estudo conduzido por SALDANHA et al., 2023, teve como objetivo compreender como certos produtos agrícolas brasileiros são reconhecidos por sua origem geográfica. O foco principal foi na produção de cachaça. Os resultados dessa pesquisa revelaram que somente três áreas no Brasil possuem o reconhecimento oficial para produzir cachaça com características únicas, com indicação geográfica (IG): Paraty (RJ), a região de Salinas (MG) e a microrregião de Abaíra (BA). Isso indica que esses lugares têm métodos especiais de produção de cachaça que os diferenciam.

A Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Cachaça estabeleceu diretrizes estratégicas, incluindo um "Plano ofensivo" focado no mercado e um "Plano defensivo" para fortalecer o setor. O Plano ofensivo visa aderir a padrões de qualidade, promover a cachaça como Indicação Geográfica e expandir a inteligência competitiva por meio da inovação e exploração de áreas como gastronomia e turismo. No Plano defensivo, destaca-se a adoção de novos modelos de negócios, reorganização da cadeia de valor e uso de tecnologias adequadas. Um programa de capacitação também é proposto para micro e pequenas empresas, com foco em qualidade e sustentabilidade financeira. Essas estratégias visam promover a cachaça competitivamente no mercado, com destaque para o uso dos Direitos de Propriedade Intelectual (DPI) como ferramentas auxiliares para impulsionar o processo, garantindo a exclusividade de comercialização e uso nos mercados-alvo (MARTINS & BRITES, 2023).

2.3. Fermento

A população microbiana encontrada naturalmente no caldo de cana é composta, principalmente, por leveduras e bactérias, mas as primeiras são as grandes responsáveis pelo consumo do açúcar e consequente produção do etanol. Elas também são capazes de produzir compostos secundários. Já foram isoladas diferentes espécies de leveduras nas dornas de fermentação de cachaça, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii*, *Hanseniaspora uvarum*, *H. guilliermondii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Lachancea thermotolerans*, *Pichia kluyveri*, *P. manshurica*, *P. fermentans*, *Rhodotorula mucilanginosa*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida parapsilosis*, *Torulaspota delbrueckii*, *Wickerhamiella cachassae*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Meyerozyma guilliermondii* e *Zygosaccharomyces rouxii* (GUERRA et al., 2001; PORTUGAL et al., 2016; ROSA et al., 2016; BREXÓ et al., 2020). As bactérias mais comumente encontradas são as bactérias do ácido láctico, e as principais espécies são *Lactobacillus casei*, *L. fermentans* e *L. plantarum* (GOMES et al., 2010).

Vários fatores podem influenciar a qualidade das bebidas alcoólicas destiladas, mas a espécie de levedura e as condições de fermentação são determinantes para o sabor (PEREIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2005). *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura muito utilizada em indústrias de fermentação alcoólica e é a principal responsável pelo processo fermentativo. Além de ser predominante na fermentação

espontânea da cachaça e se destacar pela alta produção e tolerância a concentrações elevadas de etanol (GOMES et al., 2007; VALÉRIO JÚNIOR et al., 2018).

A maioria das cachaçarias tradicionais utiliza a fermentação natural (espontânea), no entanto há aquelas que utilizam fermento prensado, misto, seco (granulado) e selecionado. O fermento natural ou selvagem é composto por leveduras naturalmente presentes na cana, mosto e equipamentos, que podem variar de acordo com cada produtor e com a região (ROSA et al., 2016). O fermento natural pode ser preparado apenas com o caldo de cana ou adicionando a este farelo de arroz, fubá de milho e frutas cítricas. Esta mistura fica em repouso por até 24 horas para então ser adicionado mais caldo de cana diluído em uma proporção de (1:1) por 24 horas (CARDOSO, 2001). Diferentes linhagens indígenas de *S. cerevisiae* podem ser encontradas nas dornas durante a produção (PATARO et al. 2000; GUERRA et al. 2001; ARAÚJO et al. 2007; CONCEIÇÃO, 2015; BARBOSA, 2016; ROSA et al., 2016), e estas podem contribuir diferentemente para a qualidade da cachaça. A falta de controle sobre a microbiota responsável pela fermentação é um dos aspectos que pode levar a variações organolépticas na bebida. Ao utilizar este fermento deve-se atentar ao grande número de microrganismos contaminantes presentes no meio (OLIVEIRA FILHO et al., 2016; ALVES et al., 2018).

O fermento prensado é o mesmo utilizado na fabricação de pães. Apesar de ser necessário o seu armazenamento sob refrigeração, é considerado um método simples e rápido. Para sua preparação é necessário de 20 a 50 gramas de fermento para cada litro de caldo de cana. O Brix inicial deve ser baixo, entre 8 e 10°Brix a fim de facilitar o desenvolvimento das leveduras ali presentes. Quando o Brix inicial cair à metade, é adicionado mais caldo de cana, dobrando o volume; esse processo é repetido até atingir o volume desejado de fermento. Com o fermento pronto, este deve ser transferido para a dorna de fermentação, e corresponder de 20 a 30% de sua capacidade (SOUZA et al., 2013; MUTTON & MUTTON, 2016; MUTTON et al., 2020).

O fermento misto é largamente utilizado em diversas cachaçarias e consiste na mistura do fermento natural com o fermento prensado. No entanto, utiliza-se uma concentração menor de fermento prensado, que não ultrapassa 20 g L⁻¹ de mosto. O fermento granulado ou seco, não necessita de refrigeração e apresenta uma

contagem de celular três vezes maior do que o prensado, o que possibilita o início mais rápido da fermentação (SOUZA et al., 2013; MUTTON & MUTTON, 2016).

O fermento selecionado, também chamado de culturas iniciadoras, vem ganhando espaço nas destilarias tradicionais. HOLZAPFEL (1997) define culturas iniciadoras como um preparado contendo um grande número de microrganismos viáveis que pode ser utilizado em processos fermentativos com o intuito de acelerá-lo. A utilização de culturas iniciadoras selecionadas na produção de cachaça vem sendo estudada com o intuito de melhorar a qualidade das cachaças produzidas, por meio do aumento do rendimento da fermentação, redução da contaminação do meio e menor competitividade por nutrientes causada por microrganismos indesejados na fermentação (STROPPA et., 2009; SOARES, SILVA, SCHWAN, 2011; ROSA et al. 2016).

As leveduras selecionadas devem ser: adaptadas ao substrato no qual serão utilizadas, o que propicia maior controle e aprimoramento da fermentação, garantindo a qualidade e padronização do produto; facilmente multiplicável o que simplifica e acelera o preparo do inóculo e garante uma alta concentração celular, além de serem mais resistentes que as culturas não selecionadas, implicando em maior reutilização. Normalmente apresentam características floculantes – ao longo da fermentação as leveduras se agregam, formando flocos que devido ao seu peso, sedimentam e se depositam no fundo da dorna - o que facilita a separação do vinho do fermento (BERNARDI et al., 2008; GOMES et al., 2010; CANUTO et al., 2013; MUTTON et al., 2020). O uso de linhagens de *S. cerevisiae* selecionadas constitui um meio alternativo de controle mais eficiente ao processo fermentativo (VALERO et al. 2005; SILVA et al. 2006; ROSA et al., 2016; TORRES-GUARDADO et al., 2022).

2.3.1. *Saccharomyces cerevisiae* como cultura iniciadora na produção de cachaça

Saccharomyces cerevisiae é a principal levedura com funcionalidade biotecnológica devido a sua fisiologia única e grande aplicabilidade em processos fermentativos tanto de alimentos quanto de bebidas. É conhecida por apresentar uma fermentação vigorosa ao favorecer a fermentação em detrimento da respiração, quando em meios ricos em açúcares, e incapaz de se desenvolver na presença apenas de lisina como fonte de nitrogênio. Além disso, apresenta resistência a

concentrações elevadas de etanol, produto resultante da fermentação, o que proporciona a estas leveduras uma grande prevalência em meios açucarados (GOMES et al., 2007; JOHNSON & ECHAVARRI-ERASUN, 2011).

A qualidade sensorial da cachaça está diretamente relacionada aos tipos de microrganismos utilizados durante a fase de fermentação, sendo estes, determinantes do rendimento de etanol, da produção e proporção dos compostos secundários formados (GOMES et al., 2007; AMORIM et al., 2016). Vários pesquisadores têm estudado as populações de leveduras utilizadas no processo de fermentação da cachaça, e observaram que existe um predomínio de *S. cerevisiae* (PATARO et al., 2000; GUERRA et al., 2001; GOMES et al., 2007; BARBOSA et al., 2018; MARCOS STEFENON et al., 2021).

Quando utilizada a fermentação espontânea, as linhagens de *S. cerevisiae* presentes nas dornas de fermentação costumam diferir entre si e ao longo das safras de produção. Isto pode causar alterações organolépticas e de qualidade e a não padronização do produto final ao longo das várias produções do ano (GONÇALVEZ, 2015; ROSA et al. 2016). Desta forma, a utilização de culturas iniciadoras vem sendo um grande aliado na produção de cachaça, pois, além da padronização, pode reduzir as contaminações, a competição por nutrientes essenciais e o tempo de fermentação, além de aumentar o rendimento e a qualidade sensorial da bebida (GOMES et al. 2007; SILVA et al. 2009).

As linhagens de *S. cerevisiae* empregadas como culturas iniciadoras do processo fermentativo devem apresentar algumas características fisiológicas, tais como: rápido início da fermentação, tolerância às condições estressantes, alto consumo de açúcar presente no meio, ausência de produção de ácido sulfídrico, formação de compostos aromáticos desejáveis, alto rendimento, baixa produção de ácido acético (SILVA et al., 2006; GOMES et al., 2007; VIANNA et al., 2008). Já é possível encontrar no mercado, culturas iniciadoras de *S. cerevisiae* específicas para a produção de cachaça. São elas, a DestilaMax-CN licenciada pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para a empresa Danstar Ethanol Technology, e a UFLA-CA11 licenciada pela Universidade Federal de Lavras (UFLA) para a empresa LNF. As culturas iniciadoras são capazes de dominar o processo fermentativo, pois são adicionadas ao caldo de cana em grandes concentrações, já são adaptados às

condições estressantes ali presentes e prevalecem sobre os microrganismos selvagens (STROPPA et. al, 2009).

2.3.2. Bactérias ácido lácticas

As bactérias ácido lácticas têm uma ampla utilização na indústria alimentícia devido à sua capacidade de agregar atributos sensoriais. Essas bactérias são classificadas como Gram-positivas, não esporogênicas, não móveis e possuem uma morfologia característica de cocos ou bacilos. Além disso, são catalase negativas, exigentes em relação à disponibilidade de nutrientes e tolerantes a ambientes ácidos (GOMES, 2009; HEREDIA-CASTRO et al., 2017). Os principais gêneros de bactérias ácido lácticas incluem *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Weissella* e *Vagococcus* (SANADA, 2009).

Essas bactérias estão associadas a cereais, plantas, carnes, leites e derivados, e apresentam efeitos positivos no desenvolvimento de compostos secundários de aroma e sabor. No entanto, quando presentes em altas concentrações, também podem estar associadas à contaminação em indústrias de produção de combustíveis, alimentos e bebidas fermentadas, como algumas bebidas alcoólicas (CAMPOS, 2017).

As bactérias ácido lácticas podem ser classificadas em diferentes grupos com base no seu metabolismo e capacidade de fermentação. Existem as bactérias ácido lácticas homofermentativas obrigatórias, que fermentam principalmente a glicose através da via da glicólise homolática, resultando na produção de ácido láctico como principal produto metabólico (HAMMES & HERTEL, 2011). Por outro lado, as bactérias ácido lácticas heterofermentativas obrigatórias possuem a capacidade de metabolizar tanto a glicose pela via da glicólise homolática quanto outras hexoses pela via da pentose fosfato. Como resultado, essas bactérias produzem uma combinação de ácido láctico, dióxido de carbono e álcool etílico como produtos finais (MCLEOD et al., 2014). Por fim, as bactérias ácido lácticas heterofermentativas facultativas, que são capazes de utilizar tanto a via da glicólise homolática quanto a via da pentose fosfato, dependendo das condições ambientais. Essas bactérias podem produzir ácido láctico, dióxido de carbono, álcool etílico e outros subprodutos metabólicos, como ácido acético e ácido fórmico (HAMMES & HERTEL, 2011; DALIA, 2017).

Sendo assim, o metabolismo das bactérias ácido lácticas pode ser definido de modo geral, com base no produto final produzido por elas. Quando há predominância de ácido láctico, pode-se deduzir que a fermentação foi realizada por bactérias homofermentativas. No entanto, quando há principalmente ácido láctico, etanol e/ou ácido acético, a fermentação foi conduzida por bactérias heterofermentativas (GOMES, 2009; CAMPOS, 2017).

Durante a fermentação alcoólica, as bactérias ácido lácticas têm a capacidade de converter a glicose em ácido láctico, o que pode afetar negativamente o rendimento do processo fermentativo. No entanto, quando associadas a outras bactérias presentes nos mostos fermentados para a produção de bebidas alcoólicas, desempenham um papel crucial na formação de compostos secundários, como álcoois superiores, aldeídos, ácidos orgânicos e ésteres. A presença desses compostos, em concentrações apropriadas, exerce uma influência significativa na criação do aroma e sabor característicos dessas bebidas (CARVALHO-NETTO et al., 2008). O lactato de etila, por exemplo, possui um limiar de percepção sensorial em torno de 110 mg/L^{-1} e está associado a aromas como nozes, manteiga e baunilha. Mesmo em quantidades reduzidas, desempenha uma função importante ao atenuar e equilibrar o aroma indesejado causado pelo excesso de acetato de etila (KNOLL et al., 2011; LASIK-KURDYŚ, MAJCHER, NOWAK, 2018).

Nos vinhos, as bactérias ácido lácticas são responsáveis por uma fermentação secundária à fermentação alcoólica. Essa fermentação é baseada na desacidificação do vinho por meio da conversão do ácido málico em ácido láctico e dióxido de carbono. Isso contribui para a melhoria da qualidade sensorial, estabilização do vinho e enriquecimento do buquê aromático. As bactérias ácido lácticas estimulam a produção de ésteres, responsáveis pela formação do aroma frutado característico de vinhos que passam por essa fermentação secundária. Além disso, algumas espécies podem catabolizar o acetaldeído, o que resulta na redução do seu aroma característico de folhas verdes. O maior impacto na formação do sabor é a produção de compostos carbonílicos ou acetônicos, que aumentam significativamente o sabor amanteigado dos vinhos. No entanto, o papel dessas bactérias na formação de aroma e sabor dos vinhos pode ser específico das linhagens avaliadas e pode variar consideravelmente (STYGER et al., 2011; WLAKER, 2014).

A produção de whisky envolve duas etapas principais de fermentação. Na primeira etapa, conhecida como fermentação alcoólica, leveduras são adicionadas aos grãos maltados para converter o amido em açúcares fermentáveis e produzir álcool. Nessa fase, ocorre a formação dos sabores primários do whisky. No entanto, durante o processo de fermentação alcoólica, também pode ocorrer uma fermentação secundária, realizada por bactérias lácticas, desempenhando um papel crucial na produção de whisky (WANIKAWA, 2020). As bactérias reduzem o pH da fermentação através da produção de ácido acético e láctico, resultando em um aumento geral de ésteres após a destilação. Além disso, são responsáveis pelo aumento das concentrações de damascenona nos destilados não envelhecidos, conferindo aroma floral, herbal e semelhante ao tabaco, componente importante do sabor do whisky (PRIEST, 2004).

PORTUGAL et al. (2016) estudaram o impacto da fermentação espontânea na produção da cachaça e avaliaram a dinâmica das principais populações microbianas presentes. Os autores observaram que há uma grande concentração de bactérias ácido lácticas e acéticas durante o preparo do inóculo. Além disso, as bactérias lácticas são predominantes também na fermentação alcoólica, mas somente quando as leveduras não são capazes de dominar o meio, ou seja, no final da fermentação.

Na produção de cachaça, as bactérias ácido lácticas podem ser responsáveis pela contaminação do meio, principalmente as pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* (com maior incidência), *Streptococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc* (NOBRE et al., 2007; CARVALHO-NETTO et al., 2008; SILVA, 2015). Essas bactérias são capazes de aumentar a acidez do mosto e diminuir o desenvolvimento de espuma, o que não favorece a atuação das leveduras. Para reduzir os prejuízos causados pela contaminação nas cachaçarias, além dos cuidados com a matéria-prima, é necessário controlar o desenvolvimento bacteriano antes que ele se torne crítico (TEIXEIRA, 2016).

Embora na literatura as bactérias sejam frequentemente vistas como contaminantes no processo de produção da cachaça, alguns estudos, como o de DUARTE et al. (2011), avaliaram a presença das bactérias, principalmente ácido lácticas, como benéficas para a fermentação, no que diz respeito ao desenvolvimento de características sensoriais diferenciadas. Esses estudos constataram um aumento

nas concentrações de 2,3-butanodiona, acetato de etila, ácido propiônico, ácido isobutírico e ácido butírico em fermentações mistas com *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus fermentum*. CARVALHO e colaboradores (2015), em um estudo onde avaliaram os efeitos da fermentação da cachaça com culturas de *S. cerevisiae* e *Lactococcus lacti*, observaram alterações no perfil de compostos voláteis, com aumento de álcool isoamílico, isobutanol e propanol.

AZZOLINI et al. (2010), CAÑAS et al. (2014) e LEGRAS et al. (2017) destacam a importância das fermentações mistas, nas quais há interação entre bactérias e leveduras, para a produção de bebidas fermentadas com qualidade e perfil aromático superiores às fermentações puras.

2.4. Formação de Compostos Secundários

Os compostos voláteis da cachaça são formados ao longo do processo de fermentação, destilação e envelhecimento. No estágio inicial da fermentação, as leveduras consomem o açúcar presente no meio e há a formação, principalmente, de etanol e gás carbônico, e em menor quantidade, de ácido carboxílico, metanol, ésteres, aldeídos, álcoois superiores, dentre outros, chamados de compostos secundários (CARDOSO, 2006; RIBEIRO, 2017). Durante a destilação ocorrem diversas reações, tais como hidrólise e esterificação, que são responsáveis também pela formação de compostos secundários. A quantidade e o tipo de compostos formados variam de acordo com a fração (cabeça, coração ou cauda) do destilado a ser analisada e pode ser influenciada por fatores como composição do caldo de cana, boa separação das frações da cachaça, o tipo e a capacidade do destilador utilizado, o tempo e a temperatura da destilação e o material (cobre ou alumínio) do destilador (CARDOSO, 2006).

A identificação e determinação da concentração de compostos secundários presentes na cachaça é de extrema importância, pois estes irão influenciar no aroma e sabor da bebida. Os compostos secundários (Tabela 1) e os contaminantes orgânicos e inorgânicos (Tabela 2) são regulamentados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio da portaria nº 339 de 28 de junho de 2021 conforme descrito abaixo.

Tabela 1 - Limite de concentração de produtos secundários presentes na cachaça, segundo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Parâmetros	Min	Max
Acidez volátil, expressa em ácido acético (mg/100 mL de álcool anidro)	-	130
Ésteres totais, expresso em acetato de etila (mg/100 mL de álcool anidro)	-	150
Aldeídos totais, em acetaldeído (mg/100 mL de álcool anidro)	-	30
Soma de Furfural e Hidroximetilfurfural (mg/100 mL de álcool anidro)	-	5
Soma dos álcoois isobutílico (2-metil propanol), isoamílicos (2-metil-1-butanol +3 metil-1-butanol) e n-propílico (1-propanol) (mg/100 mL de álcool anidro)	-	360
Coefficiente de congêneres (mg/100 mL de álcool anidro)	180	500
Compostos fenólicos totais (para bebida envelhecida)	presente	

Apesar de não haver na legislação uma regulamentação sobre a presença e quantidade de glicerol na cachaça, a análise deste composto é necessária devido a este participar da formação do *flavor* e corpo das bebidas. O glicerol em elevadas concentrações pode conferir sabor adocicado. Ele é formado na mesma via metabólica do etanol a fim de reestabelecer o equilíbrio redox e compete pela utilização de NADH (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009; RIBEIRO, 2017). Devido a sua capacidade de agregar características sensoriais positivas, algumas indústrias acrescentam o glicerol a suas bebidas a fim de camuflar possíveis problemas de sabor (GERVASIO et al., 2002; MORO et al., 2007).

Tabela 2 - Limites dos contaminantes orgânicos e inorgânicos presentes na cachaça, segundo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Parâmetros	Max
Álcool metílico (metanol) (mg/100 mL de álcool anidro)	20
Carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$)	210
Acroleína (2-propenal) (mg/100 mL de álcool anidro)	5
Álcool sec-butílico (2-butanol) (mg/100 mL de álcool anidro)	10
Álcool n-butílico (1-butanol) (mg/100 mL de álcool anidro)	3
Cobre (mg/L)	5

Os álcoois superiores são aqueles com mais de dois átomos de carbono, também chamados de óleo ou álcool fúsel. Eles são formados durante a fermentação devido a degradação de aminoácidos (OLIVEIRA, 2016). Apresentam aroma característico de queimado que pode interferir no sabor das bebidas destiladas (NYKANEN, 1986). Quando em altas concentrações, podem reduzir a qualidade e o valor comercial das cachaças (PEREIRA et al., 2015). Os níveis de álcoois superiores podem sofrer influência de inúmeros fatores como aeração e pH do mosto, altas temperaturas ao longo da fermentação, a levedura utilizada e a concentração do inóculo. É necessário evitar a formação de álcoois superiores em excesso durante a fermentação, pois para reduzi-los é necessário aumentar a fração da cabeça no momento da destilação, o que gera uma redução do rendimento além de perdas de outros compostos secundários desejáveis para a composição do aroma e sabor da cachaça (OLIVEIRA et al., 2005; MAIA & CAMPELO, 2006)

Os ésteres são ácidos carboxílicos com alterações do grupamento OH por OR com odores agradáveis de flores e frutas, que podem ser percebidos em baixas concentrações (OLIVEIRA, 2016). A principal origem dos ésteres nas bebidas alcoólicas está relacionada ao metabolismo das leveduras e, em menor proporção, é originário das reações de esterificação química (BERRY & SLAUGHTER, 2003). O acetato de etila é o éster predominante das bebidas destiladas. Quando em pequenas concentrações confere aroma suave de fruta e quando em elevadas concentrações, pode formar um aroma desagradável e enjoativo (RIBEIRO, 2016). Nas bebidas alcoólicas também é possível encontrar éster etílico derivados de ácidos graxos de baixa massa molecular, como isobutílicos, 3-metilbutílicos; éster etílico de alta massa molecular como ácido caprílico, cáprico, láurico e palmítico. Os ésteres são componentes que se destacam na análise sensorial devido a suas características aromáticas (BELITZ et al., 1999; AQUINO, 2013).

Os aldeídos, em especial o acetaldeído, são subprodutos da fermentação alcoólica, apresentam alta volatilidade o que justifica sua presença nas porções mais voláteis, no caso da cachaça, na cabeça. Estes compostos apresentam odor marcante de amêndoas amargas que influencia no aroma das bebidas alcoólicas. O controle das concentrações de aldeídos é de suma importância, não apenas para a qualidade

do produto mas também por questões de saúde pública, já que há toxicidade associada à ingestão de altas concentrações destes compostos (OLIVEIRA, 2016).

O furfural, apesar de ser um aldeído raro na cachaça, pode ser formado a partir da decomposição de carboidratos e, em cachaças envelhecidas, a partir da ação de ácidos sobre as pentoses e seus polímeros. No entanto, pode estar previamente presente no caldo de cana, quando a colheita da cana for precedida de queima das folhas, o que gera a desidratação de alguns açúcares (PEREIRA et al., 2003).

O cobre apesar de ser um metal essencial para o bom funcionamento do corpo humano, quando em altas concentrações, apresenta toxicidade devido a sua grande afinidade com os grupamentos S-H de enzimas e proteínas. Podendo desencadear diversas doenças como artrite reumatoide, epilepsia e melanomas. Sendo assim, a análise da concentração de cobre nas cachaças é de grande importância, não podendo ultrapassar 5 mg/L segundo o estabelecido pelo MAPA. Nas paredes internas dos destiladores de cobre pode haver a formação de carbamato básico de cobre, popularmente conhecido com azinhavre, que quando em contato com o vapor alcoólico é dissolvido e contamina a cachaça. A fim de evitar esse tipo de contaminação o indicado que se faça uma destilação prévia com solução de água e ou suco de limão para que haja o arraste dessa substância indesejada. Outra forma de evitar altas quantidades de cobre na cachaça é por meio da utilização de filtro de resina de troca iônica ou de carvão ativado (AZEVEDO et al., 2003; LIMA et al., 2006)

Os ácidos orgânicos, como os demais compostos secundários, também são importantes para a composição do aroma e sabor das bebidas destiladas, o seu conteúdo é expresso por meio da acidez volátil, e são subprodutos da fermentação. Os ácidos orgânicos voláteis são os mais encontrados em bebidas destiladas, com destaque para ácido acético e láctico. No entanto, também podem ser encontrados em menor quantidade, o ácido fórmico, butírico e propiônico (NYKÄNEN & NYKÄNEN 1991; TEIXEIRA, 2016).

Os principais ácidos orgânicos presentes nas bebidas destiladas são os ácidos graxos voláteis que quando são formados, reagem com álcoois presentes no meio e propiciam a formação de ésteres, responsáveis pela composição do aroma das bebidas destiladas (LIMA et al., 2001; CORNIANI, 2017). A presença de determinados ácidos orgânicos nas bebidas pode estar relacionada à falta de cuidados durante o

preparo. Altas concentrações de ácidos acético e láctico podem significar contaminação do mosto principalmente por *Acetobacter* e *Lactobacillus*. Portanto, estes podem ser utilizados como indicadores de pureza da matéria prima utilizada (SCHWAN et al., 2001; CARVALHO-NETTO et al., 2008).

Ao analisar a formação de compostos aromáticos diferenciados em bebidas como o vinho, é possível inferir que estes compostos são formados devido a uma segunda fermentação a qual o produto fermentado é submetido, denominada fermentação malolática. Este processo é baseado na descarboxilação do ácido málico a ácido láctico por meio da enzima malolática, é predominado por bactérias lácticas e favorece o desenvolvimento do buquê de aromas e sabores da bebida (FLEET, 2003).

O uísque é uma bebida fermentada e destilada, a partir de grãos de cereais, principalmente trigo, cevada, milho e centeio. A sua fermentação é feita em duas etapas, sendo a primeira a fermentação alcoólica que dura cerca de 48 horas e a segunda etapa, como nos vinhos, é a fermentação malolática, onde as bactérias são responsáveis pela produção de ácido láctico que reduz o pH do mosto fermentado e propicia o desenvolvimento de novos compostos secundários como ácidos e ésteres que conferem características florais ao mosto (ADAM & DALLAGO, 2018, WANIKAWA & SUGIMOTO, 2022).

Ao analisar 136 amostras de cachaças de diferentes cachaçarias, NASCIMENTO et al. (2008) observaram a presença de 9 ésteres, sendo o principal o acetato de etila, seguido do lactato de etila. O lactato de etila tem sua formação relacionada a contaminações bacterianas por *Lactobacillus* spp. que podem ser provenientes da cana, do fermento, da água ou mesmo do destilador. Além disso, esses *Lactobacillus* são responsáveis pela fermentação bacteriana que ocorre concomitantemente à fermentação alcoólica promovida pelas leveduras. Tal fermentação secundária ocorre em pH inferior a 4, em temperaturas superiores a 30°C, não apresenta impacto negativo na produção de etanol, e pode contribuir para a formação de aroma e sabor da cachaça.

GABRIEL et al. (2012) estudaram o efeito da utilização da fermentação espontânea e do envelhecimento de cachaças. Estes autores observaram que a utilização apenas de culturas iniciadoras de leveduras ou da fermentação espontânea é capaz de gerar alterações significativas em parâmetros físico-químicos das bebidas

produzidas. Sendo assim, faz-se necessário realizar outras mudanças no processo de fermentação das cachaças, tais como envelhecimento ou mesmo uma co-fermentação com bactérias ácido lácticas para promover alterações substanciais na formação de compostos secundários, ou mesmo deixar o vinho produzido fermentando a baixas temperaturas por alguns dias (DUARTE et., 2011; GABRIEL et al., 2012).

Levando em consideração o exposto sobre a produção da cachaça e os microrganismos envolvidos nesse processo o estudo da utilização de bactérias ácido lácticas associadas a leveduras na produção de cachaça é de grande importância, pois a interação destes microrganismos pode influenciar positivamente a composição química e microbiológica da cachaça, resultando em sabores e aromas mais complexos e distintos. Além disso, essa combinação pode contribuir para a redução de compostos indesejáveis e aprimorar a estabilidade do destilado. Compreender os efeitos dessa associação microbiana na produção de cachaça não apenas proporciona uma oportunidade de inovação na indústria, mas também pode preservar a tradição artesanal, elevando a qualidade do produto e enriquecendo a diversidade de opções para os consumidores.

3. Objetivos

Avaliar a influência de bactérias ácido lácticas na fermentação da cachaça, em cultivos puro e misto com *S. cerevisiae*.

3.1. Objetivos específicos

- Selecionar bactérias ácido lácticas isoladas de fermentação de cachaça e confirmar sua identificação por meio do sequenciamento de regiões do gene do rRNA.
- Testar as linhagens de bactérias ácido lácticas quanto a capacidade de crescimento e de tolerância em condições adversas no processo de produção da cachaça.
- Determinar o perfil de consumo de açúcares e produção de etanol e glicerol produzidos por linhagens selecionadas de bactérias do ácido láctico por cromatografia líquida de alta eficiência.
- Utilizar e avaliar o efeito da linhagem *S. cerevisiae* UFMG-1007 e as linhagens de bactérias selecionadas para produzir cachaça em escala piloto por meio de co-cultivo.
- Avaliar o efeito das linhagens de bactérias lácticas selecionadas na re-fermentação do vinho obtido.
- Mensurar os compostos secundários nas cachaças produzidas.

4. Material e métodos

4.1. Microrganismo

No processo de fermentação alcoólica foram empregados diversos microrganismos para avaliação. Além da *S. cerevisiae* 1007 utilizada como controle, incorporaram-se bactérias ácido lácticas previamente isoladas por GOMES et al. (2010), assim como linhagens obtidas em colaboração prévia com a cachaçaria Nega Fulô. Todos os microrganismos selecionados fazem parte da Coleção de Microrganismos e Células da UFMG, originalmente isolados de dornas de fermentação de cachaça sob distintas condições. Para reativar as bactérias, retirou-se os microrganismos do ultra freezer a -80°C e os transferiu para placas de petri contendo meio de cultura MRS (Man, Rogosa e Sharpe). Em seguida, foram incubados em jarra de anaerobiose a 37°C por cerca de 48 horas. Quanto à levedura 1007, ela foi inoculada em placas de Petri contendo meio de cultura YM (Yeast Manitol) e incubada a 30°C por um período de 48 horas.

4.2. Identificação das bactérias ácido lácticas

A fim de identificar as bactérias empregadas no estudo, foi realizado o sequenciamento do gene 16S do rRNA. As colônias de bactérias ácido lácticas foram inoculadas em meio MRS (Man, Rogosa e Sharpe) acrescido de 0,1g/L de ciclohexamida e incubadas a 37°C. Após 48 horas, realizou-se a extração de DNA de acordo com o protocolo utilizado por PENIDO, 2018.

A amplificação por PCR do DNA extraído das bactérias ácido lácticas do gene 16S do rRNA foi realizada utilizando os *primers* 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). As bactérias ácido lácticas foram agrupadas por Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição por digestão utilizando três enzimas de restrição (*Msp I*, *Hinf I* e *Hae III*).

Para a digestão utilizou-se 2 µl de tampão 10x, 2 µl de BSA (albumina sérica bovina) apenas para a enzima *Msp I*, 1 µL de enzima, cerca de 1500ng/µL de DNA e água na quantidade suficiente para completar o volume a 20 µL. Os microtubos tipo Eppendorf foram incubados por 3 horas a 37°C. Os fragmentos de restrição foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE 0,5% a 100V.

Os géis foram corados com GelRed e observados em luz UV. Os isolados foram agrupados por semelhança de perfil molecular e selecionou-se apenas um de cada grupo para realizar o sequenciamento 16S do rRNA. Os isolados foram sequenciados por eletroforese capilar no equipamento ABI3130 utilizando polímero POP7 e BigDye v3.1. As sequências obtidas foram comparadas com as sequências já depositadas no GenBank a fim de realizar a identificação (PENIDO, 2018).

4.3. Capacidade de crescimento das bactérias ácido lácticas em meio sintético semelhante a caldo de cana (MSCC)

As linhagens de bactérias ácido lácticas foram avaliadas quanto a capacidade de se desenvolver em meio sintético semelhante a caldo de cana de açúcar (MSCC) composto por sacarose, fosfato diácido de potássio, cloreto de amônio, sulfato de magnésio heptahidratado, cloreto de potássio e extrato de leveduras. Optou-se pelo emprego do meio de cultura MSCC devido à sua coloração não turva, uma vez que o caldo de cana exibe tonalidades entre o amarelo e o verde. Ademais, o caldo de cana frequentemente contém considerável turbidez, originada por resíduos da cana que não são de fácil remoção e podem interferir na precisão da leitura da densidade ótica. As bactérias foram inicialmente crescidas em placas de MRS a 37°C. Posteriormente, uma colônia de cada bactéria foi passada para o caldo MRS e incubada até o crescimento a 37°C para o preparo do pré-inóculo. A partir dele, foi preparado o inóculo em uma concentração equivalente a densidade ótica, DO (DO₆₀₀), de 0,2 em comprimento de onda de 600nm. Este inóculo foi adicionado, em triplicata, a microplacas de 96 poços contendo 250 µL de meio. Utilizou-se como controle negativo o próprio meio de cultura sem adição de bactérias. As microplacas foram incubadas por 3 dias a 28°C. As leituras de densidade ótica foram feitas a cada 30 minutos ao longo do tempo de incubação (LUCIO et al., 2017).

Após a obtenção dos resultados, foi feita a curva de crescimento destes microrganismos e calculada a taxa de crescimento máximo para então selecionar aqueles que apresentaram melhor crescimento. A fim de determinar uma ordem de relevância, foi definido o critério coeficiente de variação, levando em consideração os fatores de crescimento das bactérias comparados com a levedura controle 1007 (*S. cerevisiae*), reconhecida como boa produtora de cachaça. O coeficiente de variação (CV) foi calculado a partir da divisão do desvio padrão pela média. Este fator é utilizado

com o intuito de analisar a dispersão dos dados obtidos sem levar em consideração as ordens de grandeza e os resultados são expressos em porcentagem. Sendo assim, quanto menor o resultado obtido no CV, menor é a dispersão e mais homogêneo são os dados

O test t utiliza conceitos estatísticos para rejeitar ou não uma hipótese, neste caso, foi realizado pra indicar se há alguma diferença significativa entre a taxa de crescimento máximo das bactérias quando comparadas com *S. cerevisiae* UFMG-1007. O resultado é FALSO quando não há diferença e VERDADEIRO quando existe diferença.

4.4. Teste de fermentação em escala laboratorial

A levedura e as bactérias foram crescidas meio sintético semelhante a caldo de cana de açúcar (MSCC) por 48 horas a 25°C e 37°C respectivamente. Mensurou-se a DO₆₀₀ e foi então determinado o volume necessário de cada inóculo para que a fermentação fosse iniciada com uma concentração de 1.3. As células foram lavadas com água destilada esterilizada e ressuspensas em caldo de cana a 13° Brix em temperatura ambiente. A fermentação foi conduzida em Erlenmeyer de 125mL contendo 50mL de caldo de cana estéril, a 30°C por 24 horas. Foram retiradas alíquotas com 0, 6, 13, 24 horas de experimento. As alíquotas foram centrifugadas por 20 minutos a 14800rpm; o sobrenadante foi utilizado para análise no HPLC e a massa celular foi utilizada para mensurar peso seco.

4.4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi utilizada para a determinação da concentração de etanol, glicerol, glicose, sacarose e frutose provenientes da fermentação em escala laboratorial. As amostras foram inicialmente diluídas e filtradas em membrana de acetato de celulose com 13mm de diâmetro e porosidade de 0.2 µm. Utilizou-se cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão) e coluna Sulcogel 610H 6% "Crosslinked" 30cm x 7.8 mm (Sigma-Aldrich), mantida à temperatura de 45° C; com volume de injeção de 20 µL; detector de índice de refração RID 10A; fase móvel H₂SO₄ 0.01 N e fluxo de 0.6 mL/min (CADETE et al., 2012).

4.4.2. Peso seco

As alíquotas das fermentações foram submetidas ao processo de secagem em SpeedVac da marca Thermo Scientific, modelo RVT 400, a uma temperatura de 60°C por um período de 1 hora. Em sequência, foram colocadas em estufa a 42°C até que a completa desidratação fosse alcançada. Em seguida, procedeu-se à pesagem das amostras secas, permitindo a determinação do peso seco correspondente a cada alíquota da fermentação.

4.4.3. Cálculo dos parâmetros fermentativos

O cálculo dos parâmetros fermentativos em uma fermentação desempenha um papel essencial na compreensão e avaliação do processo. Esses cálculos proporcionam informações importantes sobre a eficiência e o progresso da fermentação, permitindo monitorar a conversão dos substratos em produtos desejados, como álcool e compostos secundários. Além disso, os parâmetros fermentativos oferecem dados cruciais para a otimização das condições de produção para maximizar o rendimento e a qualidade do produto final.

4.4.3.1. Rendimento da fermentação

O rendimento da fermentação, R (%), foi calculado a partir da proporção entre o etanol produzido e o total dos açúcares consumidos, Equação 1. O valor de etanol produzido é referente a diferença entre a concentração, em gramas por litros, de etanol obtida ao final da fermentação e o etanol no início da fermentação. O valor dos açúcares consumidos g/L é obtido através da diferença entre o açúcar no início da fermentação e ao final da fermentação (GONÇALVES et., 2021).

Equação 1 - Cálculo do rendimento fermentativo:

$$R(\%) = \left(\frac{\text{etanol produzido (g/L)}}{\text{açúcares consumidos (g/L)}} \right) \times 100$$

4.4.3.2. Eficiência fermentativa

A partir da relação, em porcentagem, entre a quantidade de etanol produzido e o etanol teórico foi calculado o valor de eficiência da fermentação E (%), Equação 2.

O valor de etanol teórico foi obtido baseado no proposto por Bortolini, Santanna e Torres (2001), pela multiplicação entre a quantidade dos açúcares consumidos por 0.5111 (GONÇALVES et., 2021).

Equação 2 - Cálculo da eficiência fermentativa:

$$E (\%) = \left(\frac{\text{etanol produzido (g/L)}}{\text{etanol teórico (g/L)}} \right) \times 100$$

4.4.3.3. Produtividade da Fermentação

A produtividade da fermentação, P ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$), Equação 3, se refere a quantidade de etanol, em litros, que é produzida por hora durante a fermentação. Sendo assim, o cálculo é realizado a partir da divisão do valor etanol produzido, pelo tempo total da fermentação (GONÇALVES et., 2021).

Equação 3 - Cálculo de produtividade da fermentação:

$$P (\text{g/L/h}) = \left(\frac{\text{etanol produzido (g/L)}}{\text{tempo total de fermentação (h)}} \right)$$

4.5. Produção da cachaça em escala piloto

Das três bactérias utilizadas no processo de fermentação em escala de bancada, *Lactip. plantarum* BALS 1.1, *Lacticaseibacillus paracasei* BALR 2A1 e *Lacticaseibacillus paracasei* CO30547, apenas duas foram selecionadas para a produção em escala piloto, uma vez que as bactérias BALR 2A1 e CO30547 pertencem a mesma espécie e apresentaram o mesmo perfil de parâmetros fermentativos. Dessa forma, optou-se por trabalhar com as duas bactérias distintas, *Lactip. plantarum* BALS 1.1 e *Lacticaseibacillus paracasei* CO30547, para garantir maior diversidade no processo e obter resultados mais representativos durante a produção em escala piloto.

4.5.1. Produção do inóculo

A levedura UFMG-1007 e as bactérias *Lactip. plantarum* BALS 1.1 e *Lacticaseibacillus paracasei* CO30547 foram cultivadas em duplicata em placas de Petri contendo meios de cultura YM e MRS, respectivamente. As placas foram

incubadas a 25°C e 37°C, durante um período de 48 horas. Após esse período, a massa celular obtida foi adicionada a 1,5 litros de caldo de cana, previamente autoclavado a 7°Brix por 10 minutos a 0,5 atm. e incubada nas mesmas temperaturas indicadas acima até que a contagem de células atingisse 10^8 células/mL para as leveduras e 10^4 células/mL para as bactérias.

A contagem de células viáveis das leveduras foi realizada utilizando azul de metileno e câmara de Neubauer, conforme proposto por LEE, ROBINSON & WONG (1981) e aplicada à fermentação alcoólica conforme método de CECCATO-ANTONINI em 2017. Para quantificar as bactérias, foi utilizada uma curva de crescimento em unidades formadoras de colônias (UFC) por DO (VAN ALST et al. 2016), com adaptação para o plaqueamento de microgotas (PARREIRAS et al. 2019).

4.5.2. Fermentação

A fermentação foi realizada em dornas de inox com capacidade de 20L contendo 15 litros de caldo de cana a 12° brix, em temperatura entre 25°C e 30°C. Foram utilizadas as bactérias *Lactip. plantarum* BALS 1.1 e *Lacticaseibacillus paracasei* CO30547 juntamente com a levedura UFMG-1007 em processo de co-fermentação e re-fermentação. Na co-fermentação, tanto o inóculo de levedura quanto o de bactéria foram adicionados ao caldo de cana simultaneamente, o que permitiu que ambos os microrganismos realizassem a fermentação até que o teor de brix do meio se estabilizasse, durando cerca de 48 horas. Na re-fermentação o inóculo de levedura foi acrescentado ao caldo de cana no início da fermentação (tempo zero) e, após 48 horas, o inóculo de bactéria foi introduzido, dando continuidade ao processo fermentativo por mais 96 horas.

Na condução dos dois processos de fermentação, a levedura UFMG-1007 foi empregada como controle em cultura pura. O inóculo da levedura, com uma contagem de 10^8 cel/mL, foi adicionado ao caldo de cana. A co-fermentação foi realizada por um período de 48 horas, enquanto a re-fermentação ocorreu ao longo de 144 horas, ambas sem a adição de qualquer outro microrganismo.

4.5.3. Destilação

Após o término da fermentação, procedeu-se a quantificação do teor de álcool formado e grau brix final, utilizando-se um alcoômetro e um refratômetro,

respectivamente. Essas informações foram essenciais para calcular o rendimento da fermentação para obter uma cachaça com teor alcoólico de 40% após a destilação. Foram retirados 13 litros de vinho fermentado das dornas de fermentação, tomando o devido cuidado para não misturar o vinho com as células de leveduras e bactérias que haviam decantado no fundo da dorna. O vinho coletado foi transferido para o destilador utilizado, um equipamento de cobre com capacidade para até 15 litros. Cada destilação de vinho fermentado levou aproximadamente uma hora e meia para ser concluída, garantindo um processo eficiente e seguro de obtenção do produto final. Durante a destilação foram separadas as frações cabeça, coração e cauda da cachaça. A primeira e a última foram descartadas e o coração foi armazenado em garrafas de vidro.

4.6. Análise de Cobre

A concentração de cobre nas amostras de cachaça foi determinada utilizando o colorímetro portátil HI747 Checker® HC, representado na Figura 3 com algumas adaptações para a amostra proposta por FIGUEREDO, 2023. Para realizar os testes, 100µL de cada cachaça foi diluído em água destilada e acrescido de bicinconinato, um reagente específico do equipamento. A reação entre o cobre e o bicinconinato produz uma coloração púrpura na amostra que é detectada pelo colorímetro e fornece então a concentração de cobre em cada amostra em mg/ L⁻¹.



Figura 3 - Colorímetro portátil HI747 Checker® HC

4.7. Cromatografia Gasosa

Para a determinação dos compostos voláteis presentes nas cachaças produzidas utilizou-se o Cromatógrafo Gasoso GG17A com a coluna supelcowax10 de 30 metros de comprimento a qual possui diâmetro interno de 0,53 mm e espessura do filme de 2 micrômetros. O gás de arraste empregado foi o hidrogênio. Os compostos voláteis quantificados nesse processo foram: acetato de etila, acetaldeído, álcool isobutilico, álcool isoamílico, álcool Propílico, metanol, acroleína, 2-butanol, 1-butanol e furfural.

A fim de estabelecer as concentrações desses compostos e atender a Portaria nº 339 de 28 de junho de 2021 (MAPA, 2021), foram elaboradas curvas padrão em seis diferentes concentrações. Antes da injeção das amostras no cromatógrafo, realizou-se a adição de 100µL de pentanol, como padrão interno, a 1000 microlitros de cada amostra. Esse procedimento visou garantir a precisão e acurácia dos resultados obtidos, permitindo a quantificação confiável dos compostos presentes nas cachaças analisadas, tendo em vista que a injeção das amostras foi feita de forma manual. Com essas informações, foi possível obter dados sólidos sobre a composição dos compostos voláteis nas cachaças em estudo, contribuindo significativamente para o conhecimento e controle de sua qualidade e características organolépticas.

O procedimento de análise envolveu a seguinte metodologia de temperatura do forno: uma fase inicial isotérmica a 35°C por 5 minutos, seguida por um aumento para 60°C a uma taxa de 5°C por minuto, posteriormente elevada para 90°C a uma taxa de 10°C por minuto e, por fim, aquecida para 220°C a uma taxa de 8°C por minuto, mantendo-se nessa temperatura isotérmica por 10 minutos. O fluxo constante utilizado foi de 0,8 mL/min. Outras condições adotadas foram: temperatura do injetor de 260°C, temperatura do detector de 275°C, volume de injeção de 1 µL e taxa de divisão de 1/3 (MADRERA & VALLES, 2007)

4.8. Acidez da cachaça

A determinação da acidez na cachaça foi realizada com o auxílio de um kit quantitativo específico para esse fim, desenvolvido pelo Laboratório Amazile Biagioni Maia - LABM. Para tal análise, foi adotada a metodologia descrita no protocolo de procedimento fornecido junto com o kit. Além dos reagentes fornecidos no kit, como o NaOH 0,5 N e a fenolftaleína, também foram necessários uma bureta e um erlenmeyer.

O procedimento teve início com a adição de 100 mL da amostra de cachaça ao erlenmeyer, seguido da incorporação de 3 gotas de fenolftaleína. Em seguida, o NaOH 0,5 N foi disposto na bureta, e a titulação foi iniciada adicionando o reagente gota a gota até ocorrer a viragem característica. A amostra de cachaça, que inicialmente se apresentava transparente, passou a adquirir uma coloração rosa após a viragem.

A etapa crucial da análise consistiu em observar o volume de NaOH 0,5 N gasto durante a titulação. Esse valor foi aplicado na fórmula específica, Equação 4, para calcular a acidez presente na cachaça em questão.

Equação 4 - Fórmula para determinação de acidez

$$\text{Acidez} \left(\text{mg} \frac{\text{ác. acético}}{100\text{mL}} \text{ e. t.} \right) = \frac{3000 \times \text{volume gasto de NaOH}}{\text{teor alcólico}}$$

5. Resultados e discussões

5.1. Identificação das bactérias ácido lácticas

Todas as bactérias estudadas foram identificadas a nível de espécie e são apresentadas na Tabela 3. Observa-se uma predominância significativa de *Lactocaseibacillus paracasei*, que corresponde a 45,8% do total. Além disso, foram detectadas espécies como *Lactiplantibacillus plantarum*, *Weissella paramesenteroides*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus farraginis*. Uma análise comparativa com o estudo de LACERDA et al. (2011), que identificou as bactérias envolvidas na fermentação da cachaça, demonstra uma grande semelhança entre os microrganismos descritos por eles e as espécies encontradas no presente trabalho. GOMES et al. (2010), ao investigar a diversidade bacteriana na fermentação da cachaça, identificaram predominantemente *Lactobacillus plantarum* e *L. casei*, além de *L. ferintoshensis*, *L. fermentum*, *L. jensenii*, *L. murinus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus sp.* e *Weissella confusa*. Diversos estudos descrevem as bactérias ácido lácticas como o grupo de bactérias com a maior prevalência em processos de fermentação alcoólica. Isso é relacionado à capacidade destes microrganismos de

suportar as condições estressantes da fermentação, tais como resistência a altas concentrações de etanol, temperatura elevada e acidez do meio. No caso da cachaça, esses microrganismos chegam até as dornas de fermentação por meio da matéria prima utilizada, o caldo de cana (GOMES et al., 2010; BECKNER et al., 2011; LACERDA et al., 2011; CARVALHO et a., 2015).

Tabela 3 - Espécies de bactérias utilizadas no presente estudo.

Código de coleta	Espécie de Referência	Nº de acesso da espécie de referência utilizada para comparação (Genbank)	% de identidade
BAC06WL	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	CP072181.1	100%
BALR10A1	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	CP072181.1	100%
BALR2A1	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	CP072181.1	100%
BALR5A1	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	CP072181.1	99%
BALR5B2	<i>Lactobacillus farraginis</i>	AB690214.1	99%
BALR6A2	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	CP072181.1	100%
BALR7A1	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	CP072181.1	100%
BALR7A2	<i>Lactobacillus farraginis</i>	MK193870.1	100%
BALR9A	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	CP072181.1	99%
BALR9B1	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	CP072181.1	100%
BALS1.1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	MW811200.1	99%
BALS1.2	<i>Weissella paramesenteroides</i>	MT613634.1	100%
BALS2.2	<i>Weissella paramesenteroides</i>	MT613634.1	100%
BALS2.3	<i>Weissella paramesenteroides</i>	MT613634.1	100%
BALS3.2	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	W795693.1	100%
BALS4.1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MT613627.1	100%

BALS4.2	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	CP059168.1	100%
BALS4.3	<i>Lactobacillus brevis</i>	MT640328.1	100%
BALS4.4	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	CP059168.1	100%
BALS5.2	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	MW811200.1	99%
BALS9.2	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	MW811200.1	100%
CO30110P	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	CP072181.1	100%
CO30216P	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	CP072181.1	100%
CO30547	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	CP072181.1	100%

5.2. Capacidade de crescimento em MSCC

Na Tabela 4 estão listados os microrganismos e as suas respectivas taxas de crescimento máximo quando em meio rico em açúcar. A partir dos resultados obtidos, calculou-se suas respectivas médias e desvios padrões. Também se encontra na mesma tabela os critérios utilizados para determinar a ordem de importância das bactérias levando em consideração os fatores de crescimento comparados com a levedura controle UFMG-1007 (*S. cerevisiae*), reconhecida como boa produtora de cachaça.

Ao analisar os valores de coeficiente de variação expostos na Tabela 4 e tendo em vista que quanto menor o resultado obtido no CV, mais homogêneo são os dados, as bactérias que apresentaram melhores resultados foram a *Lactip. plantarum* BALS4.2, seguida da *Lactip. plantarum* BALS4.4 e da *Lactobacillus plantarum* BALS 4.1. A aplicação do teste t teve como objetivo avaliar a presença de diferenças significativas na taxa máxima de crescimento das bactérias em comparação com *S. cerevisiae* UFMG-1007. Os resultados indicaram que todas as bactérias exibiram um crescimento estatisticamente distinto da levedura de controle.

A proporção de crescimento corresponde a porcentagem de crescimento das bactérias em relação à levedura controle (UFMG-1007), sendo que a última representa um crescimento de 100%. Ao analisar os valores de “proporção de crescimento” os resultados mostraram que a levedura UFMG-1007 apresenta um

crescimento superior aos demais microrganismos, o que é esperado tendo em vista que *S. cerevisiae* é bem adaptada a meios ricos em açúcares, predominante em dornas de fermentação de cachaça e suporta bem as condições estressantes de fermentação (GONÇALVES et al., 2021).

Tabela 4 - Taxa de crescimento máximo dos microrganismos utilizados no presente trabalho.

Microrganismo	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de variação (%)	Proporção de crescimento (%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG-1007	0.0034	0.0005	14.75	100
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> CO30547	0.0021	0.0007	34.73	62.13
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> BALR 2A1	0.0018	0.0007	39.87	54.2
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> BALS 1.1	0.0017	0.0008	46.75	51.83
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> BAC06WL	0.0014	0.0005	38.09	42.77
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> CO30216P	0.0014	0.0005	35.45	40.46
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> BALR7A1	0.0012	0.0008	69.84	35.73

<i>Weissella paramesenteroides</i> BALS1.2	0.0011	0.0004	31.62	33.76
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> BALS9.2	0.0011	0.0003	25.15	33.45
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> BALS5.2	0.0011	0.0002	15.3	33.33
<i>Weissella paramesenteroides</i> BALS 2.3	0.0011	0.0007	68.15	31.84
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> BALS4.2	0.0009	0.0000	7.23	27.82
<i>Weissella paramesenteroides</i> BALS2.2	0.0009	0.0005	59.54	27.1
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> BALS4.4	0.0009	0.0001	12.69	25.92
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> BALS3.2	0.0008	0.0003	34.86	24.68
<i>Lactobacillus plantarum</i> BALS 4.1	0.0008	0.0001	13.1	22.99
<i>Lactobacillus brevis</i> BALS4.3	0.0006	0.0000	15.17	18.51
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> CO30110P	0.0006	0.0005	85.78	17.73
<i>Lactobacillus farraginis</i> BALR5B2	0.0005	0.0003	61.58	14.7
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> BALR10A1	0.0005	0.0004	92.91	13.72
<i>Lactobacillus farraginis</i> BALS7A2	0.0004	0.0002	45.44	12.37
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	0.0003	0.0001	40.71	10.37

BALR6A2				
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> BALR9A	0.0003	0.0002	68.93	9.72
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> BALR9B1	0.0002	0.0001	55.31	7.27
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> BALR5A1	0.0002	0.0000	37.02	4.91

A fim de selecionar as bactérias com melhores resultados, foi estabelecido que seriam consideradas apenas aquelas que alcançaram um crescimento, obtido por meio da comparação dos valores de densidade óptica, igual ou superior a 50% da levedura controle. Esse valor arbitrário foi determinado para que as bactérias sejam capazes de se desenvolver e obter crescimento significativo durante a fermentação do caldo de cana para que haja a interação esperada entre elas e a levedura controle (UFMG-1007). Sendo assim, as melhores proporções de crescimento foram observadas em *Lacticaseibacillus paracasei* CO30547, com 62.13%, *Lacticaseibacillus paracasei* BALR2A1 com 54.2% e *Lactiplantibacillus plantarum* BALS1.1 com 51.83%.

Apesar de todos os microrganismos serem bactérias ácido lácticas, é relevante analisar o comportamento de cada linhagem durante o processo de fermentação. Isso se deve ao fato de que distintas linhagens de uma mesma espécie podem manifestar respostas divergentes (TORRES-GUARDADO et al., 2021).

5.3. Produção e análise da cachaça em escala laboratorial

5.3.1. Utilização de açúcares e produção de etanol e glicerol

A Tabela 5 apresenta os valores de sacarose, glicose, frutose, etanol e glicerol, obtidos durante a fermentação do caldo de cana, conforme o inóculo de microrganismo utilizado. Foram coletadas amostras das fermentações nos intervalos de tempo 0, 6, 13 e 24 horas. No instante inicial (tempo 0), destaca-se a presença de sacarose, seguida por glicose e frutose. Os níveis de etanol e glicerol, neste estágio, permanecem mínimos, devido à sua produção gradual ao longo da fermentação, decorrente da conversão dos açúcares presentes no caldo de cana por parte das

populações de leveduras e bactérias. À medida que a fermentação prossegue, os microrganismos enfrentam condições estressantes, incluindo as concentrações de açúcares e etanol, além de variações de pH, resultando em desequilíbrios em suas funções. Para restabelecer o equilíbrio redox e osmótico, as leveduras e bactérias sintetizam glicerol o que justifica a formação do mesmo ao longo das 24 horas de fermentação (REMIZE, BARNAVON & DEQUIN, 2001; LI et al., 2009).

Ao analisar a formação de glicerol e etanol ao longo das 24 horas de fermentação do caldo de cana, pode-se constatar que a levedura controle UFMG-1007 foi a que apresentou maior produção de etanol, 43.33 ± 0.60 g/ L-1. No entanto, foi a que obteve a segunda menor concentração de glicerol 1.95 ± 0.01 g/ L-1, produzindo mais apenas que a bactérias *Lacticaseibacillus paracasei* BALR 2A1 que obteve um desempenho fermentativo bem inferior às demais, com 9.29 ± 1.83 g/ L-1 de etanol e 1.56 ± 0.02 g/ L-1 de glicerol. Este resultado sugere que esta pode não ser uma bactéria interessante para ser utilizada como cultura iniciadora na produção de cachaça. Já as bactérias *Lactip. plantarum* BALS 1.1 e *Lacticaseibacillus paracasei* CO30547 se comportaram de forma bem semelhante à levedura controle, com produção de etanol de 40.28 ± 4.18 g/L-1 e 37.53 ± 3.04 g/L-1, e glicerol de 2.29 ± 0.21 g/ L-1 e 2.91 ± 0.32 g/ L-1 respectivamente.

Em relação aos açúcares, no tempo zero, existe maior concentração de sacarose, que logo é hidrolisada em glicose e frutose, seja pela ação da enzima invertase ou pela ação do calor aplicado ao mosto que causa a hidrólise espontânea da sacarose. Após a hidrólise deste dissacarídeo, a glicose é consumida quase totalmente em cerca de 12 horas pelas leveduras fermentadoras (FREITAS SCHWAN et al., 2001). O que corrobora com os resultados alcançados pela levedura controle, UFMG-1007, apresentados na Tabela 5 onde observamos que no início da fermentação a concentração de sacarose era de 106.15 ± 5.15 g/L-1, com 13 horas chegou a 4.90 ± 0.15 g/L-1 e ao final das 24 horas não ultrapassou 3.02 ± 0.10 g/L-1. Perfil de consumo de sacarose semelhante também foi encontrado para as bactérias ácido lácticas *Lacticaseibacillus paracasei* BALR 2A1, *Lactip. plantarum* BALS 1.1 e *Lacticaseibacillus paracasei* CO30547.

Tabela 5 - Concentração de sacarose, glicose, frutose, etanol e glicerol, em gramas por litro, ao longo de 24 horas de fermentação de caldo de cana, com os microrganismos utilizados no presente trabalho.

Microrganismos	Tempo	Compostos (g/ L)				
		Sacarose	Glicose	Frutose	Etanol	Glicerol
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> BALR 2A1	0	106.15 ± 5.15	31.25 ± 0.75	11.53 ± 1.58	2.15 ± 1.22	0.24 ± 0.00
	6	95.59 ± 0.87	29.79 ± 1.28	15.85 ± 2.42	1.30 ± 0.04	1.09 ± 0.25
	13	9.28 ± 2.13	13.37 ± 5.32	44.96 ± 0.78	7.78 ± 1.14	1.86 ± 0.16
	24	5.55 ± 1.92	20.73 ± 4.45	44.81 ± 1.10	9.29 ± 1.83	1.56 ± 0.02
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> BALS 1.1	0	106.15 ± 5.15	31.25 ± 0.75	11.53 ± 1.58	2.15 ± 1.22	0.24 ± 0.00
	6	87.21 ± 11.80	26.75 ± 1.51	20.10 ± 1.68	3.86 ± 0.05	1.39 ± 0.08
	13	8.40 ± 1.14	9.18 ± 2.15	32.38 ± 4.46	27.98 ± 4.03	2.20 ± 0.26
	24	3.26 ± 0.16	3.15 ± 0.75	22.77 ± 3.17	40.28 ± 4.18	2.29 ± 0.21
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> CO30547	0	106.15 ± 5.15	31.25 ± 0.75	11.53 ± 1.58	2.15 ± 1.22	0.24 ± 0.00
	6	100.58 ± 8.02	32.78 ± 0.56	20.53 ± 1.57	1.26 ± 0.15	1.01 ± 0.02
	13	17.85 ± 8.75	19.25 ± 3.09	30.49 ± 2.43	24.70 ± 3.00	2.67 ± 0.31
	24	6.40 ± 1.96	6.14 ± 2.37	29.59 ± 3.94	37.53 ± 3.04	2.91 ± 0.32
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG-1007	0	106.15 ± 5.15	31.25 ± 0.75	11.53 ± 1.58	2.15 ± 1.22	0.24 ± 0.00
	6	68.89 ± 2.40	26.31 ± 0.23	27.00 ± 0.98	3.83 ± 0.06	1.51 ± 0.00
	13	4.90 ± 0.15	7.46 ± 1.51	50.88 ± 3.54	31.38 ± 0.27	1.83 ± 0.14
	24	3.02 ± 0.10	3.45 ± 0.74	30.15 ± 2.04	43.33 ± 0.60	1.95 ± 0.01

As Figuras 4, 5, 6 e 7 correspondem dados mostrados nas Tabelas 5 e 6, a fim de facilitar a visualização do comportamento de cada uma das bactérias e da levedura controle ao longo de todo o tempo da fermentação. No eixo Y primário encontra-se a concentração em gramas por litros de todos os açúcares (sacarose, frutose e glicose), etanol e peso seco. No eixo Y secundário, observa-se a concentração em gramas por litros do glicerol, em uma escala menor do que a utilizada do eixo Y primário. No eixo X está disposto o tempo da fermentação, em horas, referente a formação e ou consumo dos compostos analisados.

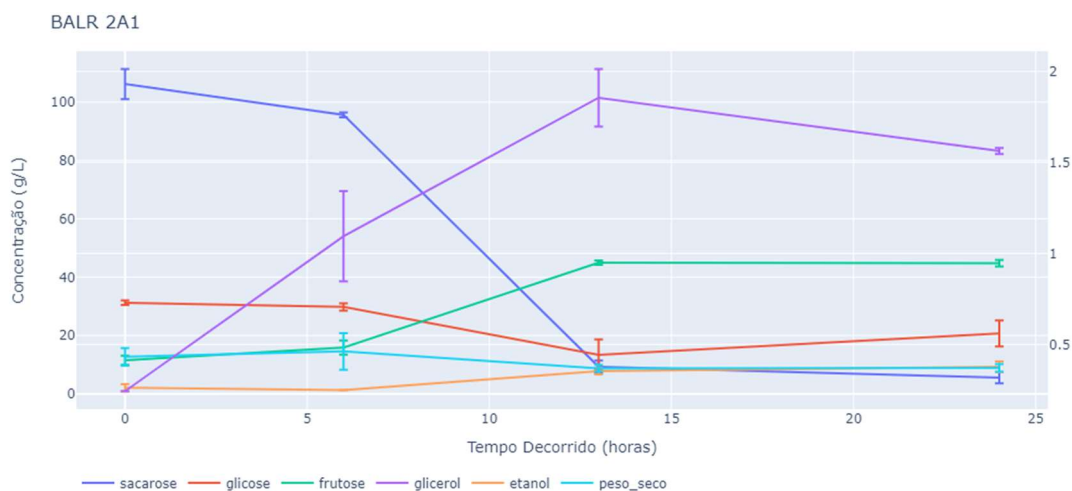


Figura 4 - Produção de etanol e glicerol, consumo de açúcares e variação do peso seco (g/L) durante a fermentação realizada pela bactéria *Lacticaseibacillus paracasei* BALR 2A1

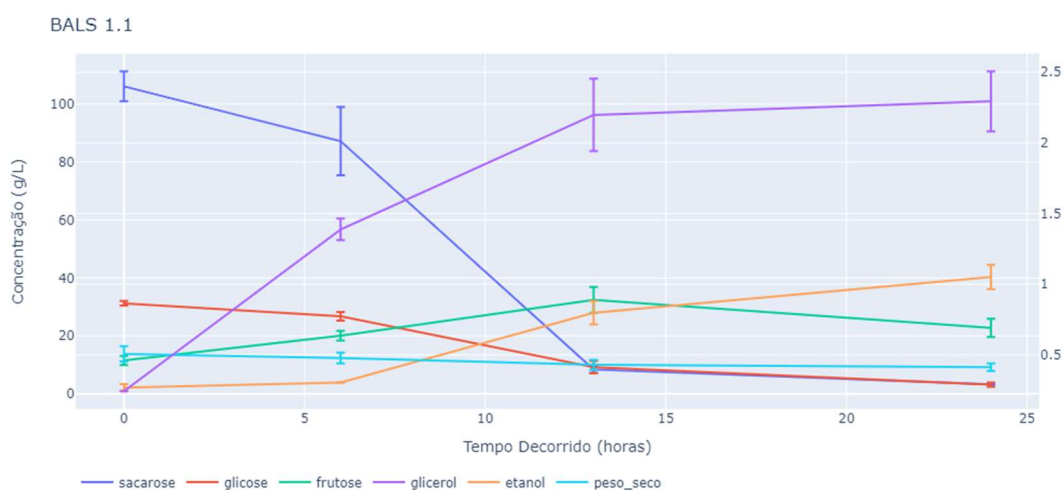


Figura 5 - Produção de etanol e glicerol, consumo de açúcares e variação do peso seco (g/L) durante a fermentação realizada pela bactéria *Lactiplantibacillus plantarum* BALS 1.1

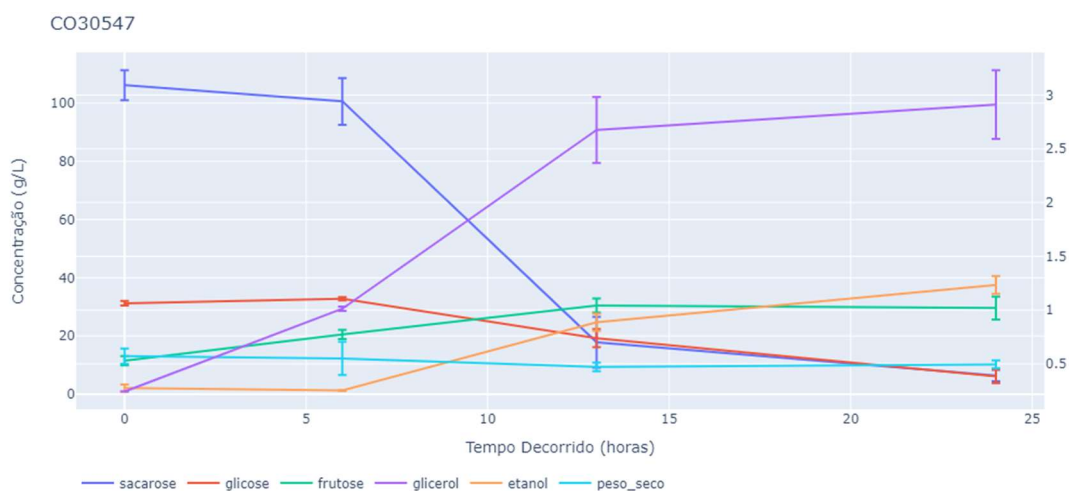


Figura 6 - Produção de etanol e glicerol, consumo de açúcares e variação do peso seco (g/L) durante a fermentação realizada pela bactéria *Lacticaseibacillus paracasei* CO30547



Figura 7 - Produção de etanol e glicerol, consumo de açúcares e variação do peso seco (g/L) durante a fermentação realizada pela levedura controle *S. cerevisiae* UFMG-1007

5.3.2. Peso seco

O peso seco da levedura e das bactérias estudadas foram avaliados nas alíquotas retidas da fermentação nos tempos 0, 6, 13 e 24 horas. Como descrito na Tabela 6, e nas Figuras Figura 4, Figura 5, Figura 6 e Figura 7, o peso seco, em gramas por litros, correspondente à DO preestabelecida para o início da fermentação foram 13.75 ± 3.75 g/L para a bactéria *Lactip. plantarum* BALS 1.1, 12.7 ± 4.24 g/L para a

bactéria *Lacticaseibacillus paracasei* BALR 2A1, 13.05 ± 3.75 g/L para a bactéria *Lacticaseibacillus paracasei* CO30547 e 13.05 ± 3.75 g/L para a levedura controle 1007.

Houve uma redução da massa celular da bactéria *Lactip. plantarum* BALS 1.1 a partir do tempo zero, chegando a 9.2 ± 1.84 g/L em 24 horas de fermentação. Já as bactérias *Lacticaseibacillus paracasei* BALR 2A1, *Lacticaseibacillus paracasei* CO30547 e a levedura *S. cerevisiae* UFMG-1007 aumentaram o peso seco do tempo zero para o tempo 6 horas e com redução ao final de 24 horas. De acordo com Freitas Schwan e colaboradores, em 2001, apesar das bactérias ácido lácticas serem mais abundantes em fermentações espontâneas de cachaça, estas não conseguem se propagar ao longo do processo o que poderia então, justificar a redução do peso seco das bactérias estudadas ao final da fermentação.

Tabela 6 - Peso seco em gramas por litros das bactérias e levedura ao longo de 24 horas de fermentação nos tempos 0, 6, 13 e 24 horas

Amostra	T0	T6	T13	T24
	Média \pm DP	Média \pm DP	Média \pm DP	Média \pm DP
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> BALR 2A1	12.7 ± 4.24	14.55 ± 8.84	8.75 ± 1.63	8.9 ± 1.84
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> BALS 1.1	13.75 ± 3.75	12.35 ± 2.62	10 ± 2.4	9.2 ± 1.84
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> CO30547	13.05 ± 3.75	12.3 ± 8.06	9.4 ± 2.12	10.25 ± 1.91
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG-1007	13.05 ± 3.75	14.4 ± 5.66	10.35 ± 3.32	8.95 ± 0.49

Duarte e colaboradores em 2011, ao analisar o crescimento celular de *L. fermentum* isolados e em co-cultivo com *S. cerevisiae* para a produção de cachaça, observaram que, quando inoculado em cultura pura, a população de *L. fermentum* apresentou picos de crescimento entre 5 e 10 horas e entre 12 e 15 horas de fermentação. Após esse período houve estabilização. No entanto, no geral, houve aumento da população dos lactobacillus, o que difere dos resultados do presente trabalho, onde as bactérias tiveram um decréscimo populacional ao longo de 24 horas

de fermentação. Podendo indicar que o comportamento das bactérias pode diferir, mesmo quando em um mesmo meio de propagação, de acordo com a espécie e com as cepas utilizadas.

5.4. Parâmetros fermentativos

Os parâmetros fermentativos foram calculados a fim de avaliar e comparar o desempenho das bactérias ácido lácticas e da levedura controle, nos quesitos eficiência, produtividade e rendimento, em caldo de cana, nos tempos 0, 6, 13 e 24 horas. Como pode-se observar na Tabela 7, a levedura controle 1007 e as bactérias *Lacticaseibacillus paracasei* CO30547 e *Lactipl. plantarum* BALS 1.1 apresentaram parâmetros fermentativos semelhantes. Os melhores valores de eficiência e produtividade foram obtidos ao final da fermentação, 24 horas, enquanto o maior rendimento foi observado após 13 horas. Para a bactéria *Lacticaseibacillus paracasei* BALR 2A1, os melhores resultados de eficiência, produtividade e rendimento ocorreram com 13 horas de fermentação, sugerindo que, possivelmente, para este isolado, o ideal é que a fermentação seja encerrada antes de 24 horas.

Foi realizado o teste-t para verificar se houve diferença entre a levedura controle e as bactérias, nos parâmetros fermentativos, nos diferentes horários de coleta de amostras. Após 24 horas de fermentação, a eficiência alcançada pela levedura UFMG-1007 e pelas bactérias *Lacticaseibacillus paracasei* CO30547 e *Lactip. plantarum* BALS 1.1, foram respectivamente $68.16 \pm 0.55\%$, $66.84 \pm 6.53\%$ e $65.52 \pm 0.75\%$, indicando que não houve diferença significativa entre estes valores. No entanto, estes valores se diferiram estatisticamente e são superiores a eficiência fermentativa da bactéria *Lacticaseibacillus paracasei* BALR 2A1, cujo resultado foi $18.68 \pm 4.39\%$.

Em relação ao parâmetro produtividade, na fermentação conduzida com a bactéria *Lacticaseibacillus paracasei* BALR 2A1, observa-se um padrão diferente das demais. Verifica-se que o valor mais elevado foi alcançado após 13 horas de fermentação, diferenciando-se das fermentações realizadas com as bactérias *Lactip. plantarum* BALS 1.1, *Lacticaseibacillus paracasei* CO30547e com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFMG-1007 em que a máxima produtividade foi obtida no término da fermentação, após 24 horas.

Ao analisar o rendimento das fermentações nos diferentes horários de coleta, verifica-se que em 13 horas de fermentação houve o maior rendimento para todos os microrganismos analisados. A levedura UFMG-1007 apresentou rendimento de $50.88 \pm 3.54\%$, superior a todas as bactérias, que obtiveram $21.95 \pm 1.64\%$, $32.38 \pm 4.46\%$ e $30.49 \pm 2.43\%$, respectivamente, para *Lacticaseibacillus paracasei* CO30547, *Lactip. plantarum* BALS 1.1 e *Lacticaseibacillus paracasei* BALR 2A1.

Tabela 7 - Parâmetros Fermentativos das bactérias, e da levedura controle avaliado durante 24 horas

Microrganismos	Tempo de fermentação (horas)	Parâmetros Fermentativos		
		Eficiência (%)	Produtividade (g/L/h)	Rendimento (%)
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> BALR 2A1	0	0.00 ± 0.00	2.15 ± 1.22	11.53 ± 1.58
	6	34.98 ± 25.71	26.99 ± 4.73	17.87 ± 13.14
	13	42.96 ± 3.22	43.31 ± 18.19	21.95 ± 1.64
	24	18.68 ± 4.39	29.74 ± 12.75	9.54 ± 2.24
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> BALS 1.1	0	0.00 ± 0.00	2.15 ± 1.22	11.53 ± 1.58
	6	36.42 ± 7.42	3.86 ± 0.05	20.10 ± 1.68
	13	55.01 ± 0.59	27.98 ± 4.03	32.38 ± 4.46
	24	65.52 ± 0.75	40.28 ± 4.18	22.77 ± 3.17
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> CO30547	0	0.00 ± 0.00	2.15 ± 1.22	11.53 ± 1.58
	6	121.08 ± 10.35	1.26 ± 0.15	20.53 ± 1.57
	13	55.31 ± 4.47	24.70 ± 3.00	30.49 ± 2.43
	24	66.84 ± 6.53	37.53 ± 3.04	29.59 ± 3.94
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG-1007	0	0.00 ± 0.00	2.15 ± 1.22	11.53 ± 1.58
	6	21.91 ± 2.67	3.83 ± 0.06	27.00 ± 0.98
	13	53.71 ± 2.25	31.38 ± 0.27	50.88 ± 3.54
	24	68.16 ± 0.55	43.33 ± 0.60	30.15 ± 2.04

Os valores de produtividade e rendimento obtidos no instante inicial (tempo 0) tanto para a leveduras quanto para as bactérias foram $2,15 \pm 1,22$ g/L/h e $11,53 \pm$

1,58%, respectivamente. Esses resultados sugerem a possibilidade de um processo prévio de fermentação ocorrendo no caldo de cana mesmo antes da introdução dos inóculos. Esse fenômeno pode ser atribuído à natureza não estéril do caldo de cana, que abriga diversos microrganismos. Esses microrganismos podem originar-se tanto da cana em si, do equipamento de extração do caldo, quanto do manipulador envolvido no processo.

5.5. Produção da cachaça em escala piloto

Tendo em vista que as duas bactérias *Lacticaseibacillus paracasei* CO30547 e BALR 2A1 obtiveram desempenho semelhante nos testes anteriores, e visando uma otimização para a produção em escala piloto, apenas as bactérias *Lacticaseibacillus paracasei* CO30547 e *Lactip. plantarum* BALS 1.1 foram utilizadas. Os dados referentes às condições de fermentação e destilação às quais as leveduras e bactérias foram submetidas estão apresentados nas tabelas Tabela 8, Tabela 9 e Tabela 10. Nessas tabelas são apresentados os dados das duas replicatas da co-fermentação e da re-fermentação.

O processo de co-fermentação teve duração aproximada de 48 horas. Para a re-fermentação, a linhagem de *S. cerevisiae* UFMG-1007 foi inoculada na dorna, e somente após o consumo dos açúcares é que as bactérias lácticas foram adicionadas. O tempo de fermentação de 48hs não é comum para esta levedura, que normalmente termina a fermentação em 24hs. Este período maior pode ter ocorrido devido à falta de controle da temperatura da sala de fermentação. Assim, a fermentação pode ser sido influenciada por variações na temperatura ambiente, resultando em um tempo maior para o consumo dos açúcares do mosto. A temperatura é um parâmetro importante na fermentação, influenciando o metabolismo da levedura, a produção de compostos voláteis e o perfil aromático dos vinhos (FLEET & HEARD, 1993). Em ambientes com baixas temperaturas, observa-se uma redução no crescimento de bactérias acéticas e lácticas, o que facilita o controle da fermentação alcoólica na vinicultura. No entanto, é importante destacar que essas baixas temperaturas também podem prolongar a duração da fermentação alcoólica, uma vez que resultam em uma desaceleração na velocidade de crescimento da levedura (FLEET & HEARD, 1993; FEUILLAI et al., 1997; BAUER & PRETORIUS, 2000). Em contrapartida, fermentações conduzidas em temperatura elevadas, favorecem a contaminação

bacteriana e uma maior sensibilidade da levedura à toxicidade do etanol (PEREIRA et al., 2020). Além de afetar as atividades metabólicas e o crescimento das leveduras, resultando em alterações nos elementos celulares, como proteínas e membrana plasmática (BENEY & GERVAIS, 2001; NAVES et al., 2010).

Tendo em vista que a cachaça é produzida em todo o país em diferentes épocas do ano e a variação de temperatura é muito grande (15 a 42°C), se faz necessário o controle desta ao longo da fermentação, mantendo-a em sua faixa ideal, entre 20 e 30°C (PEREIRA et al., 2006; ROSA et al., 2016).

Tabela 8 - Condições de fermentação e destilação da cachaça produzida com e *Saccharomyces cerevisiae* UFMG-1007 e a bactéria *Lactiplantibacillus plantarum* BALS 1.1

Condições de fermentação	UFMG-1007 + BALS 1.1 Lactip. plantarum			
	Co-fermentação		Re-fermentação	
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 1	Replicata 2
Grau Brix inicial	12,1	12	12	12,2
Volume inicial de fermentação (L)	15	15	15	15
Temperatura de fermentação (°C)	26,2	26,1	25,2	28,8
Teor de álcool após fermentação (%)	6	6	6	5
Volume para destilação (L)	13	13	13	13
Grau brix final	5,9	6	6,2	6,1
Teor de álcool após destilação (%)	40	40	40	40
Rendimento total (L)	1,95	1,95	1,95	1,625
Volume fração cabeça (L)	0,195	0,195	0,195	0,162
Volume fração coração (L)	1,56	1,56	1,56	1,301
Volume fração cauda (L)	0,195	0,195	0,195	0,162

O Brix inicial do mosto foi padronizado próximo a 12°Brix a fim de se obter uma concentração de açúcar mais uniforme em todas as fermentações, evitando que variações nas condições resultem em alterações no processo de fermentação. O caldo da cana com boa maturação contém de 16 a 24°Brix, sendo necessária sua diluição com água potável tendo em vista que elevadas concentrações de açúcares

no mosto resulta em uma fermentação lenta e elevados teores alcoólicos, interferindo diretamente no fermento com a redução do metabolismo das leveduras (GONÇALVES, 2015; ROSA et al., 2016).

Tabela 9 - Condições de fermentação e destilação da cachaça produzida com *Saccharomyces cerevisiae* UFMG-1007 e *Lacticaseibacillus paracasei* CO30547

Condições de fermentação	UFMG-1007 + CO30547 <i>Lacticaseibacillus paracasei</i>			
	Co-fermentação		Re-fermentação	
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 1	Replicata 2
Grau Brix inicial	12,1	12	12,2	12,1
Volume inicial de fermentação (L)	15	15	15	15
Temperatura de fermentação (°C)	27,7	28,9	29,4	27,5
Teor de álcool após fermentação (%)	6	6	6	6
Volume para destilação (L)	13	13	13	13
Grau brix final	4,5	4,8	4,2	4
Teor de álcool após destilação (%)	40	40	40	40
Rendimento total (L)	1,95	1,95	1,95	1,95
Volume fração cabeça (L)	0,195	0,195	0,195	0,195
Volume fração coração (L)	1,56	1,56	1,56	1,56
Volume fração cauda (L)	0,195	0,195	0,195	0,195

O teor de álcool das cachaças, após a destilação, foi fixado em 40% com o objetivo de estar em conformidade com a legislação que estipula que esta bebida deve conter de 38 a 48% de álcool (MAPA, 2021). Essa escolha visou evitar que a cachaça apresentasse uma graduação alcóolica excessivamente elevada, mesmo dentro dos limites permitidos, o que poderia desagradar aos consumidores e mascarar os sabores e aromas resultantes do processo de fermentação.

Inicialmente, foram estabelecidos os volumes de 15 litros para a fermentação e 13 litros para a destilação, considerando a capacidade volumétrica das dornas de fermentação e do destilador empregados. A diferença entre esses dois valores

decorre do processo natural ocorrido ao final da fermentação, onde as leveduras e bactérias sedimentam-se no fundo da dorna de fermentação. Como resultado, 2 litros de caldo de cana foram retidos na dorna com o propósito de separar o vinho fermentado do resíduo denominado "pé de cuba".

Tabela 10 - Condições de fermentação e destilação da cachaça produzida com *Saccharomyces cerevisiae* UFMG-1007

Condições de fermentação	UFMG-1007			
	Fermentação		Re-fermentação sem inóculo bacteriano	
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 1	Replicata 2
Grau Brix inicial	12,2	12,1	12	12,1
Volume inicial de fermentação (L)	15	15	15	15
Temperatura de fermentação (°C)	28,1	25,1	30,1	28,7
Teor de álcool após fermentação (%)	5	6	6	5
Volume para destilação (L)	13	13	13	13
Grau brix final	5,3	5,5	5,1	5
Teor de álcool após destilação (%)	40	40	40	40
Rendimento total (L)	1,625	1,95	1,95	1,625
Volume fração cabeça (L)	0,162	0,195	0,195	0,162
Volume fração coração (L)	1,301	1,560	1,560	1,301
Volume fração cauda (L)	0,162	0,195	0,195	0,162

O rendimento total da fermentação foi determinado com base no teor de álcool alcançado ao final de cada fermentação, no teor de álcool desejado para a bebida após a destilação e no volume de vinho fermentado submetido à destilação. Utilizando o rendimento total foi calculado as proporções das frações da cachaça. A primeira fração a ser destilada, conhecida como "cabeça", corresponde a 10% do volume total. A fração do "coração" constitui a cachaça propriamente dita, representando 80% do volume total destilado, e a fração final, chamada de "cauda", compreende os últimos 10% do destilado (MAIA & CAMPELLO et al., 2006; ROSA et al., 2016). As frações da

"cabeça" e "cauda" foram descartadas, e apenas o "coração" foi utilizado para os testes posteriores.

5.6. Análise de cobre

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2021) estabelece que a concentração de cobre encontrada nas cachaças não pode ultrapassar o limite de 5mg/L, tendo em vista que altas concentrações de cobre são tóxicas para o ser humano e podem desencadear doenças como epilepsia, artrite reumatoide e melanoma (TAYLOR et al., 2020). A Tabela 11 mostra que todos os valores de cobre encontrados estão acima dos limites permitidos pela legislação vigente. O valor mais elevado, de 86,5 mg/L, foi identificado na primeira replicata da re-fermentação, utilizando a levedura UFMG-1007 em associação com a bactéria *Lactip. plantarum* BALS 1.1. Por sua vez, o menor resultado de cobre, de 8,5 mg/L, foi registrado na primeira replicata da co-fermentação, empregando a mesma combinação de microrganismos. Esses resultados apontam para uma presença excessiva de cobre nas amostras analisadas proveniente do alambique de destilação utilizado. Vale ressaltar que esses valores elevados inviabilizaram a realização da análise sensorial da cachaça neste momento.

A presença de teores elevados de cobre nas amostras de cachaça provavelmente decorre de condições inadequadas de armazenamento do destilador de cobre quando não está em uso. É recomendável que o destilador e sua serpentina sejam armazenados cheios de água para evitar a oxidação do cobre e a formação de azinhavre ($\text{CuCO}_3\text{Cu(OH)}_2$), um composto azulado que, quando em contato com os vapores provenientes da destilação, se dissolve e se mistura à cachaça, contaminando-a. Além disso, é indicado que, após o equipamento permanecer inativo por um longo período, a primeira destilação seja feita apenas com água para remover possíveis sujidades e crostas de azinhavre. Essas práticas de cuidado e limpeza são fundamentais para garantir a qualidade e a pureza do produto final (FRANÇA et al., 2011; DEL PINO et al., 2014).

Tabela 11 - Valores de cobre encontrado nas amostras de cachaça em co-fermentação e re-fermentação produzidas no presente trabalho.

Amostras	Tipo de fermentação	Replicata	Concentração de cobre (mg/L)
----------	---------------------	-----------	------------------------------

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG-1007+ <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> BALS1.1	Co-fermentação	1	8,5
		2	24,4
	Re-fermentação	1	86,5
		2	15,9
<i>S. cerevisiae</i> UFMG-1007+ <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> CO30547	Co-fermentação	1	19,7
		2	20,6
	Re-fermentação	1	29,7
		2	17,1
<i>S. cerevisiae</i> UFMG-1007	Co-fermentação	1	53,0
		2	30,7
	Re-fermentação	1	23,6
		2	27,9

5.7. Cromatografia Gasosa

As tabelas Tabela 12, Tabela 13, Tabela 14 apresentam os valores obtidos dos compostos voláteis analisados por meio de cromatografia gasosa, sendo eles: acetato de etila, metanol, acroleína, álcool propílico, álcool isobutílico, 2-butanol, álcool isoamílico e 1-butanol. Foram considerados os resultados provenientes dos dois tipos distintos de fermentação, co-fermentação e re-fermentação, além das respectivas duplicatas experimentais. A análise das concentrações destes compostos é relevante para a compreensão da composição química e da qualidade das bebidas em estudo, permitindo uma avaliação abrangente e precisa dos constituintes presentes no produto final em função dos diferentes processos fermentativos empregados.

Tabela 12 - Média da concentração de compostos secundários encontrados nas cachaças produzidas com a associação de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG-1007 e *Lactip. plantarum* BALS1.1 (valores expressos em mg/100mL de álcool anidro)

Parâmetros	Classe	UFMG-1007 + BALS1.1 <i>Lactip. plantarum</i>	
		Co-fermentação	Re-fermentação
Acetato de Etila	Éster	10,92 ± 2,96	26,54 ± 3,39
Metanol	Álcool	0,27 ± 0,11	0,14 ± 0,1

Acroleína	Aldeído	0,14 ± 0,04	0,6 ± 0,21
Álcool Propílico	Álcool	17,53 ± 3,56	8,42 ± 1,05
Álcool Isobutílico	Álcool	2,58 ± 1,49	44,58 ± 0,65
2-Butanol	Álcool	1,93 ± 0,13	0,4 ± 0,24
Álcool Isoamílico	Álcool	4,8 ± 1,49	5,86 ± 1,28
1-Butanol	Álcool	0,002 ± 0,0	0,004±0

Tabela 13 - Média da concentração de compostos secundários encontrados na cachaça produzida com a associação de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG-1007 e *Lacticaseibacillus paracasei* CO30547 (valores expressos em mg/100mLde álcool anidro)

Parâmetros	Classe	UFMG-1007 + CO30547 <i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	
		Co-fermentação	Re-fermentação
Acetato de Etila	Éster	0,68 ± 0,26	7,58 ± 2,24
Metanol	Álcool	0,2 ± 0,12	2,27 ± 0,84
Acroleína	Aldeído	0,07 ± 0,01	0,18 ± 0,07
Álcool Propílico	Álcool	5,85 ± 0,66	8,77 ± 0,51
Álcool Isobutílico	Álcool	28,06 ± 1,56	48,03 ± 6,73
2-Butanol	Álcool	0,21 ± 0,02	2,39 ± 0,31
Álcool Isoamílico	Álcool	0,49 ± 0,09	39,42 ± 0,46
1-Butanol	Álcool	0,003 ± 0	0,01 ± 0

Tabela 14 - Média da concentração de compostos secundários encontrados na cachaça produzida com *Saccharomyces cerevisiae* UFMG-1007 (valores expressos em mg/100mLde álcool anidro)

Parâmetros	Classe	UFMG-1007	
		Co-fermentação	Re-fermentação
Acetato de Etila	Éster	6,7 ± 2	35,13 ± 0,03
Metanol	Álcool	5,99 ± 1,38	1,99 ± 0,26
Acroleína	Aldeído	0,02 ± 0	0,46 ± 0,31

Álcool Propílico	Álcool	30,77 ± 1,37	11,65 ± 1,95
Álcool Isobutílico	Álcool	0,17 ± 0,03	45,06 ± 2,63
2-Butanol	Álcool	4,06 ± 0,21	2,54 ± 1,26
Álcool Isoamílico	Álcool	5,88 ± 1,21	4,14 ± 1,45
1-Butanol	Álcool	0,003 ± 0	0,02 ± 0

Os álcoois superiores, representados pela soma dos valores de álcool isobutílico, álcool isoamílico e álcool propílico, foram avaliados nas cachaças produzidas com as diferentes combinações de microrganismos. Para a cachaça produzida com a combinação UFMG-1007+ *Lactip. plantarum* BALS 1.1, os valores de álcoois superiores foram de aproximadamente 25 mg/100mL (de álcool anidro) para a co-fermentação e, 59 mg/100mL (de álcool anidro) para a re-fermentação. Já para a combinação UFMG-1007+ *Lacticaseibacillus paracasei* CO30547, os valores foram em torno de 34 mg/100mL (de álcool anidro) para a co-fermentação e, 96 mg/100mL (de álcool anidro) para a re-fermentação. No caso da cachaça produzida somente com *S. cerevisiae* UFMG-1007, os valores de álcoois superiores foram de 37 mg/100mL (de álcool anidro) para a co-fermentação e 61 mg/100mL (de álcool anidro) para a re-fermentação. Observa-se que os maiores valores foram encontrados nas re-fermentações. No entanto, é importante destacar que esses valores ainda estão significativamente abaixo do limite máximo estabelecido pela legislação, que é de até 360 mg/100mL (de álcool anidro). Os resultados mostraram que o processo de re-fermentação do vinho produzido faz com que os valores de álcoois superiores aumentem possivelmente devido a ação das bactérias láctica inoculadas.

Ao comparar os valores dos álcoois superiores obtidos neste estudo com os valores encontrados por CARVALHO et al. (2015), que produziram cachaças com culturas de *S. cerevisiae* associadas a *Lactococcus lactis*, nota-se que as concentrações de álcool propílico e álcool isoamílico foram menores no presente trabalho. Essas variações podem ser atribuídas aos diferentes microrganismos utilizados e às condições experimentais empregadas em cada estudo. Além dos microrganismos, o que foi diferente.

A ocorrência de baixas concentrações de propanol e álcool propílico tem sido associada a cachaças de qualidade superior em análises sensoriais (BOZA & HORII, 1998; LIMA et al., 2009). Portanto, é possível inferir que a redução desses compostos verificada no presente trabalho pode indicar um fator positivo, sugerindo cachaças com boa qualidade sensorial.

Os ésteres são compostos aromáticos que ocorrem em teor relativamente alto, tornando-os bastante relevantes para as propriedades sensoriais da cachaça. São de extrema importância para a formação do "flavour" característico da bebida e sua concentração é principalmente influenciada pelo processo de maturação e envelhecimento da bebida. Os ésteres são amplamente associados ao buquê frutado das bebidas alcoólicas (LURTON et al., 1995; ROSSITER, 1996; NONATO, et al., 2001; DE SOUZA et al., 2006). As médias dos teores de ésteres, em acetato de etila, mantiveram-se em conformidade com os parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira, que delimitam o valor máximo de 150 mg/100 mL (de álcool anidro). Vale observar que as cachaças obtidas por re-fermentação apresentaram quantidades superiores de acetato de etila quando comparadas às produzidas por co-fermentação. Como exemplo, combinação de UFMG-1007+ *Lactip. plantarum* BALS 1.1 resultou na produção de $35,13 \pm 0,03$ mg/100mL de acetado de etila.

Para o metanol foi encontrado nas cachaças valores variando de $0,14 \pm 0,1$ a $5,99 \pm 1,38$ mg/100 mL (de álcool anidro). No entanto, é importante ressaltar que, independentemente das diferentes concentrações de metanol encontradas, nenhuma delas se aproximou do limite estabelecido na legislação, que é de 20 mg/100 mL (de álcool anidro). Essa conformidade com os padrões legais é essencial para assegurar a segurança e a qualidade da cachaça, uma vez que o metanol é uma substância que pode ser tóxica em altas concentrações. Portanto, os resultados sugerem que os processos de fermentação utilizados não tiveram um impacto significativo nos teores de metanol da cachaça e que as amostras analisadas estão em conformidade com os regulamentos estabelecidos. A formação de metanol na cachaça está associada à decomposição da pectina presente na cana-de-açúcar, pelos microrganismos. O metanol se liga à pectina e é liberado ao longo do processo de fermentação, tornando-se parte da bebida produzida (VILELA, 2005). Para evitar a formação de metanol na cachaça é necessário realizar uma filtragem eficiente do caldo, a fim de remover o bagacilho tanto no processo fermentativo, quanto no destilador (VILELA et al. 2007).

Portanto, é fundamental adotar práticas de produção adequadas e rigorosas medidas de controle de qualidade para garantir que os teores de metanol na cachaça estejam dentro dos limites estabelecidos e em conformidade com as normas regulatórias.

5.8. Acidez da cachaça

Os ácidos voláteis desempenham um papel fundamental na composição da cachaça, influenciando diretamente seu aroma e sabor. A acidez da bebida é afetada por diversos fatores, incluindo o controle da matéria-prima, o processo de destilação e, sobretudo, a etapa de fermentação. Durante a fermentação, é de extrema importância atentar para a seleção adequada das leveduras, o tempo de duração do processo, a pureza do meio, a temperatura e o cuidado no manuseio do mosto, a fim de evitar a proliferação de bactérias acéticas que podem aumentar a acidez da cachaça e prejudicar o rendimento da produção (MIRANDA et al., 2008; DO RÊGO LEITE et al. 2017). A elevada presença de acidez volátil na bebida pode resultar na produção de cachaça com sabor indesejável e ligeiramente agressivo ao paladar do consumidor, o que terá um impacto negativo na qualidade do produto (VERRUMA-BERNARDI et al., 2020; CHEN et al., 2021). A Tabela 15 apresenta os dados relativos à acidez de cada cachaça produzida, expressa em mg/100m de álcool anidro, com suas respectivas médias e desvios padrão. As mensurações foram realizadas considerando as diferentes combinações de microrganismos utilizadas na produção, UFMG-1007 + *Lactip. plantarum* BALS 1.1, UFMG-1007 + *Lacticaseibacillus paracasei* CO30547 e UFMG-1007; e o processo de re-fermentação.

Tabela 15 – Média da acidez volátil das cachaças produzidas no presente trabalho (valores expressos em mg/100mL de álcool anidro).

Amostras	Tipo de fermentação	Média de acidez das replicatas	Desvio padrão
<i>S. cerevisiae</i> UFMG-1007 + <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> BALS 1.1	Co-fermentação	15	2,37
	Re-fermentação	20	2,16
	Co-fermentação	11,8	2,82

<i>S. cerevisiae</i> UFMG-1007 + <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> CO30547	Re- fermentação	18,7	0
<i>S. cerevisiae</i> UFMG-1007	Co- fermentação	15,6	3,69
	Re- fermentação	22,5	0

De acordo com a legislação vigente do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, todos os valores de acidez encontrados nas cachaças produzidas estão em conformidade com o limite máximo estabelecido, 150 mg/100mL de álcool anidro. As cachaças produzidas utilizando a levedura UFMG-1007 em combinação com *Lactip. plantarum* BALS1.1 apresentaram uma acidez de $15 \pm 2,37$ mg/100mL de álcool anidro durante o processo de co-fermentação e de $20 \pm 2,16$ mg/100mL de álcool anidro na fase de re-fermentação. Já nas cachaças produzidas com *S. cerevisiae* UFMG-1007 em associação com *Lactocaseibacillus paracasei* CO30547, a acidez observada foi de $11,87 \pm 2,82$ mg/100mL de álcool anidro na co-fermentação e de $18,75 \pm 0$ mg/100mL de álcool anidro na re-fermentação. Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que as bactérias lácticas utilizadas não influenciaram nos níveis de acidez volátil. Alguns autores sugerem que as bactérias lácticas seriam prejudiciais os processos por aumentarem os níveis de acidez volátil, o que acarretaria uma menor qualidade sensorial da bebida (Rosa et al. 2016). A cachaça produzida exclusivamente com a levedura UFMG-1007 apresentou baixos valores de acidez volátil ($22,5 \pm 0$ mg/100mL de álcool anidro). No processo de co-fermentação a acidez resultante foi de $15,62 \pm 3,69$ mg/100mL de álcool anidro. Como dito anteriormente, adição das bactérias ácido lácticas como cultura iniciadora parece não afetar negativamente o processo de fermentação de produção da cachaça.

Ao comparar os resultados de acidez obtidos no presente trabalho com o estudo conduzido por DUARTE et al. (2011), notamos que nossos valores de acidez foram menores do que os encontrados por eles. Em seus estudos, Duarte et al. (2011) relataram acidez volátil de 28,72 mg/100 mL (álcool anidro) para a levedura *S. cerevisiae* UFLA CA11 em cultura pura e 33,79 mg/100 mL (álcool anidro) para a co-

inoculação. Essas divergências podem ser atribuídas às características distintas das cepas utilizadas em cada pesquisa.

MIRANDA et al. (2008) sugere que a diminuição dos teores de acidez volátil na cachaça está diretamente relacionada a uma melhoria das características sensoriais do destilado, bem como a um aumento da sua aceitação entre os consumidores. Portanto, a determinação precisa dos níveis de acidez na cachaça assume um papel fundamental na esfera da produção e apreciação dessa bebida. Além de ser um indicativo crucial da qualidade e da consistência do produto, a avaliação da acidez permite ajustes refinados no processo de produção, resultando em perfis sensoriais mais equilibrados e agradáveis ao paladar. Os valores de baixa acidez verificados nas cachaças produzidas no presente trabalho sugerem que estas poderiam ter uma boa aceitação pelos consumidores.

6. Conclusões

Por meio do sequenciamento da subunidade menor do rRNA foi possível identificar as bactérias selecionadas para o presente trabalho como pertencentes as espécies *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lactiplantibacillus plantarum* e *Weissella paramesenteroides*. Estas espécies possuem características metabólicas que sugerem no processo de produção da cachaça.

Lacticaseibacillus paracasei CO30547, *Lacticaseibacillus paracasei* BALR2A1 e *Lactip. plantarum* BALS1.1 foram as que apresentaram melhores resultados quanto a capacidade de crescimento e tolerância às condições adversas presentes durante o processo de produção da cachaça. As três bactérias apresentaram um consumo de açúcares e produção de etanol e glicerol dentro do desejado para microrganismos fermentadores de cachaça.

A produção da cachaça em escala piloto foi realizada com as bactérias *Lactic. paracasei* CO30547 e *Lactip. plantarum* BALS1.1 em re-fermentação e co-fermentação com *S. cerevisiae* UFMG-1007. A associação destes microrganismos influenciou positivamente o processo de fermentação da cachaça, produzindo compostos voláteis desejáveis e mantendo-se dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira

Os resultados mostraram que a utilização de culturas de bactérias lácticas no processo de re-fermentação do vinho produzido durante a fermentação da cachaça foi promissor, e esta técnica poderia ser utilizada pelos produtores para melhorar a qualidade sensorial da bebida, semelhante ao que feito em outras bebidas destiladas.

7. Referências bibliográficas

ALVES, T. M. et al. Influência do tratamento térmico do caldo de cana no desenvolvimento do processo fermentativo e na composição química da cachaça. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 2018.

ARTHUR, R. Cachaça is far more than the caipirinha!. 2021. Disponível em <<https://www.beveragedaily.com/Article/2021/03/09/Brazil-eyes-up-potential-for-Cachaca-in-global-markets>> Acesso em 07 de janeiro de 2021.

AZEVEDO, S. M. de et al. Levantamento da contaminação por cobre nas aguardentes de cana-de-açúcar produzidas em Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, p. 618-624, 2003.

AZZOLINI, M. et al. Evaluation of technological effects of yeast-bacterial co-inoculation in red table wine production. **Ital J Food Sci**, v. 3, n. 22, p. 257-263, 2010.

BARBOSA, R. et al. Multiple rounds of artificial selection promote microbe secondary domestication—the case of cachaça yeasts. **Genome biology and evolution**, v. 10, n. 8, p. 1939-1955, 2018.

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.

BECKNER, M.; IVEY, M. L.; PHISTER, T. G. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. **Letters in applied microbiology**, v. 53, n. 4, p. 387-394, 2011.

BENEY, L.; GERVAIS, P. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 57, p. 34-42, 2001.

BORTOLINI, F.; SANT'ANNA, E. S.; TORRES, R. C. Comportamento das fermentações alcoólica e acética de sucos de kiwi (*Actinidia deliciosa*): composição dos mostos e métodos de fermentação acética. **Food Science and Technology**, v. 21, p. 236-243, 2001.

BOZA, Y.; HORII, J. Distillation influence on the composition and sensorial quality of sugar cane distilled beverage. **Food Science and Technology**, v. 18, p. 391-396, 1998.

BRASIL. Dos Padrões de Identidade e Qualidade da Aguardente de Cana e da Cachaça. Portaria n.339, de 28/06/2021. ABASTECIMENTO, M. D. A. P. E. Brasília 2021.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anuário da cachaça 2021** / Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/AECS, p. 29, 2022.

BREXÓ, R. P. et al. Yeasts from indigenous culture for cachaça production and brewer's spent grain: Biodiversity and phenotypic characterization for biotechnological purposes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 124, p. 107-120, 2020.

Cachaça artesanal: a genuína bebida nacional. 2016. Disponível em: <<https://alavoura.com.br/colunas/indicacao-geografica/cachaca-artesanal-a-genuina-bebida-nacional/>> Acesso em 07 de janeiro de 2021.

CACHAÇA bate recorde de exportações. **BEER ART – Portal da cerveja**, 17 de janeiro de 2023. Disponível em: <<https://revistabeerart.com/news/cachaca-exportacao>>. Acesso em: 19 de junho de 2023.

CADETE, Raquel M. et al. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. 2012.

CAÑAS, P. M. I. et al. Sequential inoculation versus co-inoculation in Cabernet Franc wine fermentation. **Food Science and Technology International**, v. 21, n. 3, p. 203-212, 2014.

CANUTO, M. H. Influência de alguns parâmetros na produção de cachaça: linhagem de levedura, temperatura de fermentação e corte do destilado. 2013.

CARVALHO, F. P. et al. Interaction of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactococcus lactis* in the fermentation and quality of artisanal cachaça. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 37, p. 51-60, 2015.

CECATO-ANTONINI., S.R. Microbiologia da Fermentação Alcoólica a Importância do Monitoramento Microbiológico em Destilarias, São Carlos, p. 14, 2010.

CECCATO-ANTONINI, S. R. Microbiologia da fermentação alcoólica: a importância do monitoramento microbiológico em destilarias. 2017.

CHEN, K. et al. Feasibility of using gas chromatography-ion mobility spectrometry to identify characteristic volatile compounds related to brandy aging. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 98, p. 103812, 2021.

DE OLIVEIRA, L.; JUNIOR, Edeimar Ferrarezi. Produção de cachaça artesanal. **Revista Interface Tecnológica**, v. 19, n. 2, p. 810-818, 2022.

DE SOUZA, M. D. C. A. et al. Characterization of cachaça and rum aroma. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 2, p. 485-488, 2006.

DEL PINO, J. C., VENQUIARUTO, L. D., DALLAGO, R. M., CARMARGO, S., & SANTOS, D. Saberes populares fazendo-se saberes escolares: Limpando alambiques de cobre. **Vivências**, v.10, p.138-145, 2014.

DO RÊGO LEITE, J. J. et al. Caracterização físico-química de aguardentes de cana-de-açúcar produzidas no Rio Grande do Norte. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 11, n. 1, 2017.

DUARTE, W. F. et al. Effect of co-inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus fermentum* on the quality of the distilled sugar cane beverage cachaça. **Journal of food science**, v. 76, n. 9, p. C1307-C1318, 2011.

DUARTE, W. F.; AMORIM, J. C.; SCHWAN, R. F. The effects of co-culturing non-*Saccharomyces* yeasts with *S. cerevisiae* on the sugar cane spirit (cachaça) fermentation process. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 1, p. 175-194, 2013.

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

FGV – Fundação Getúlio Vargas. **A Indústria da Cachaça no Brasil e suas Interações com o Comércio Internacional**. 2018. Disponível em:

<https://gvagro.fgv.br/sites/gvagro.fgv.br/files/u1115/cachaca_anufood_PT_0.pdf>

Acesso em 07 de janeiro de 2021

FIGUEREDO, G. A. S. R. Determinação de cobre em gin utilizando o colorímetro portátil Hanna HI747. Belo Horizonte, 2023. 36 p. Monografia (Química) – Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais.

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.

FRANÇA, N., SÁ, O. R., & FIORINI, J. E. Avaliação da qualidade da cachaça artesanal produzidas no município de Passos (MG). **Ciência et Praxis**, v.4, p.47-50, 2011

FREITAS SCHWAN, R. et al. Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 79, n. 1, p. 89-96, 2001.

GOMES, F. C. O. et al. Use of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of the traditional cachaça in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2438-2447, 2007.

GOMES, F. C. O. et al. Comparison between two selected *Saccharomyces cerevisiae* strains as fermentation starters in the production of traditional cachaça. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 52, p. 449-455, 2009.

GOMES, F. C. O. et al. Identification of lactic acid bacteria associated with traditional cachaça fermentations. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 486-492, 2010.

GONÇALVES, C. M.; Uso de levedura selecionada em escala piloto para a produção de cachaça de alambique. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2015.

GONÇALVES, C. M. et al. Avaliação de parâmetros fermentativos de inóculos utilizados na produção da cachaça de alambique. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 37, n. 2, 2021.

GUERRA, J. B. et al. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 106-111, 2001.

HAMMES, W.P.; HERTEL, C. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: WOOD, B.J.B. et al. (eds.). *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. 4th ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DA CACHAÇA (IBRAC). Cachaça. [S. l.]: IBRAC, 2023. Disponível em: <http://www.ibrac.net/>. Acesso em: 23 agosto. 2023

KNOLL, C. et al. Influence of pH and ethanol on malolactic fermentation and volatile aroma compound composition in white wines. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2077-2086, 2011.

LACERDA, I. C. A. et al. Identification of the bacterial community responsible for traditional fermentation during sour cassava starch, cachaça and minas cheese production using culture-independent 16s rRNA gene sequence analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 650-657, 2011.

LASIK-KURDYŚ, M.; MAJCHER, M.; NOWAK, J. Effects of different techniques of malolactic fermentation induction on diacetyl metabolism and biosynthesis of selected aromatic esters in cool-climate grape wines. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2549, 2018.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. In: **Biotechnol. Bioeng. Symp.; (United States)**. Univ. of Michigan, Ann Arbor, 1981.

LEGRAS, J-L; GALEOTE, V; CAMARASA, C; BLONDIN, B; DEQUIN, S. 2017. Ecology, diversity and applications of *Saccharomyces* yeasts in food and beverages. In: Satyanarayana T, Kunze G, editors. *Yeast diversity in human welfare*. Singapore: Springer Singapore. p. 283–321.

LI, L. et al. The induction of trehalose and glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various stresses. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 387, n. 4, p. 778-783, 2009.

LIMA, A. J. B. et al. Emprego do carvão ativado para remoção de cobre em cachaça. **Química Nova**, v. 29, p. 247-250, 2006.

LIMA, A. J. B. et al. Effect of copper removing substances on the amount of secondary compounds of sugar cane spirit. **Química Nova**, v. 32, p. 845-848, 2009.

LURTON, L. et al. Influence of the fermentation yeast strain on the composition of wine spirits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 67, n. 4, p. 485-491, 1995.

MADRERA, R. R.; VALLES, B. S. Determination of volatile compounds in cider spirits by gas chromatography with direct injection. **Journal of chromatographic science**, v. 45, n. 7, p. 428-434, 2007.

MAIA, A. B. R. A.; CAMPELO, E. A. P. Tecnologia da cachaça de alambique. Belo Horizonte: Sebrae/MG/Sindbebedas, p.129 2006.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. A Cachaça no Brasil: Dados de Registro de Cachaças e Aguardentes Ano 2021. 3 ed. Brasília, 2021.

MARCOS STEFENON, V. et al. Genetic characterization of fermentation yeasts as an element of geographical indication of 'cachaça' and 'aguardente' from Luiz Alves, SC. 2021.

MARTINS, L. F.; BRITES, Sandra. O uso de ativos de propriedade industrial na cadeia de valor da cachaça: The use of industrial property assets in the cachaça value chain. **MIX Sustentável**, v. 9, n. 3, p. 101-115, 2023.

MCLEOD, A. et al. The Genus *Leuconostoc*. In: HOLZAPFEL, W. H. et al. (eds.) *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, 2nd ed. London: Springer, 2014.

MIRANDA, M. B. de et al. Perfil físico-químico de aguardente durante envelhecimento em tonéis de carvalho. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 84-89, 2008.

MUTTON, M. J. R. et al. The clarification of sugarcane juice and the use of CA-11 yeast produces better quality cachaça¹. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 51, 2020.

NAVES, R. et al. Contaminação microbiana nas etapas de processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usina alcooleira. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, n. 11, 2010.

NÓBREGA, I. C. C. Análise dos compostos voláteis da aguardente de cana por concentração dinâmica do " headspace" e cromatografia gasosa-espectrometria de massas. **Food Science and Technology**, v. 23, p. 210-216, 2003.

NONATO, E. A. et al. A headspace solid-phase microextraction method for the determination of some secondary compounds of Brazilian sugar cane spirits by gas chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 3533-3539, 2001.

OLIVEIRA FILHO, J. H.; BORTOLETTO, A. M.; ALCARDE, A. R. Qualidade pós-colheita de colmos de cana armazenados e seus reflexos na produção de cachaça. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 19, n. 1, p. 1-9, 2016.

OLIVEIRA, R. E. S. et al. Destilação de cachaça no estado da paraíba: um estudo exploratório. In: CORDEIRO, C. A. M. et al. Ciência e Tecnologia de Alimentos: Pesquisa e Práticas Contemporâneas, v. 2, n. 1, p. 457-464, 2021.

PARREIRAS, P. M. et al. Desenvolvimento de sorvete de kefir com polpa de manga: avaliação sensorial, físico-química e de bactérias ácido lácticas. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 40, n. 1, p. 109-118, 2019.

PEREIRA, J. A. M.; ROSA, C. A.; FARIA, J. B. Cachaça de alambique. **Tecnologia Fácil-8**. Brasília: LK Editora, 2006.

PEREIRA, A. F. Suplementação de nitrogênio sobre a fermentação alcoólica para produção de cachaça, cerveja e vinho. 2007.

PEREIRA, D. A.; VIEIRA, R. C. M.; GIMENEZ, A. Z. Fatores que afetam a fermentação alcoólica. **Ciência & Tecnologia**, v. 12, n. 1, p. 44-55, 2020.

PORTUGAL, C. B. et al. The role of spontaneous fermentation for the production of cachaça: a study of case. **European Food Research and Technology**, v. 242, n. 9, p. 1587-1597, 2016.

PRIEST, F. G. Lactic acid bacteria-the uninvited but generally welcome participants in malt whisky fermentation. **Microbiology Today**, v. 31, p. 16-18, 2004.

REMIZE, F.; BARNAVON, L.; DEQUIN, Sylvie. Glycerol export and glycerol-3-phosphate dehydrogenase, but not glycerol phosphatase, are rate limiting for glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic engineering*, v. 3, n. 4, p. 301-312, 2001.

ROSA, C. A.; JÚNIOR, A. M. S.; FARIA, J. B. Cachaça de Alambique. In: VENTURINI FILHO, W. G. *Bebidas Alcoólicas*. São Paulo: ed. Blucher, 2016. p.359-368.

ROSSITER, K. J. Structure-odor relationships. **Chemical reviews**, v. 96, n. 8, p. 3201-3240, 1996.

SALATI, P. Exportação brasileira de cachaça cai 24% em 2020 com pandemia. 2021. Disponível em: <<https://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2021/01/21/exportacao-brasileira-de-cachaca-cai-24percent-em-2020-com-pandemia.ghtml>> Acesso em 07 de janeiro de 2021.

SALDANHA, C. B. et al. Overview of Brazilian Geographical Indications and the Experience of Cachaca Indications of Procedure. **Journal of Sustainable Development**, v. 16, n. 3, p. 119-119, 2023.

SCHWAN, R. F. et al. Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 79, n. 1, p. 89-96, 2001.

SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 1, p. 30-39, 2009.

SOARES, T. L.; SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F. Monitoring the fermentation process for cachaca production using microbiological and physico-chemical methods with different *Saccharomyces cerevisiae* isolates. **Food Science and Technology**, v. 31, n. 1, p. 184-187, 2011.

SOUZA, L.M.; ALCARDE. M.G.; LIMA, F.V.; BORTOLETTO, A.M. *Produção de Cachaça de Qualidade*. Piracicaba: ESALQ, 2013. 72p.

STROPPIA, C. T. et al. Kinetic parameters of yeasts strains isolated from cachaça distilleries in Minas Gerais/Brazil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. SPE, p. 1978-1983, 2009.

TAYLOR, A. A. et al. Critical review of exposure and effects: implications for setting regulatory health criteria for ingested copper. **Environmental management**, v. 65, p. 131-159, 2020.

TORRES-GUARDADO, R. et al. Microbial interactions in alcoholic beverages. **International Microbiology**, p. 1-15, 2021.

VALÉRIO JÚNIOR, M. F. R. et al. Estudo de co-cultura entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces kudriavzevii* para elaboração de uma bebida alcoólica fermentada à base de Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.). 2018.

VAN ALST, A. J. et al. Growth Curves: Generating Growth Curves Using Colony Forming Units and Optical Density Measurements. 2016.

VERRUMA-BERNARDI, M. R. et al. Volatile compounds in cachaças obtained from three sugarcane varieties cultivated under the managements: organic, conventional and without fertilization. **Química Nova**, v. 43, p. 1227-1233, 2020.

VILELA, A. F. **Estudo da adequação de critérios de boas práticas de fabricação na avaliação de fábricas de cachaça de alambique**. 2005. 96 f. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

VILELA, F. J. et al. Determinação das composições físico-químicas de cachaças do sul de Minas Gerais e de suas misturas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 1089-1094, 2007.

WALKER, G. M. Wines: microbiology of winemaking. In: **Encyclopedia of food microbiology**. Academic Press, 2014. p. 787-792.

WANIKAWA, A. Flavors in malt whisky: a review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 78, n. 4, p. 260-278, 2020.

WANIKAWA, A.; SUGIMOTO, T. A Narrative Review of Sulfur Compounds in Whisk (e) y. **Molecules**, v. 27, n. 5, p. 1672, 2022.

