

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

MARCUS HENRIQUE CANUTO

**Influência de alguns parâmetros na produção de
cachaça: linhagem de levedura, temperatura de
fermentação e corte do destilado**

Belo Horizonte

2013

UFMG/ICEx/DQ.935^a
T. 418^a

MARCUS HENRIQUE CANUTO

**Influência de alguns parâmetros na produção de
cachaça: linhagem de levedura, temperatura de
fermentação e corte do destilado**

Tese apresentada ao
Departamento de Química do
Instituto de Ciências Exatas da
Universidade Federal de Minas
Gerais como requisito parcial
para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências - Química.

Belo Horizonte

2013

C235i
2013
T

Canuto, Marcus Henrique

Influência de alguns parâmetros na produção de cachaça: linhagem de levedura, temperatura de fermentação e corte do destilado./ Marcus Henrique Canuto. 2013.

X, 103 f. : il.

Orientador: Rodinei Augusti

Co-orientador: Helmuth Guido Siebald Luna
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

1. Química análica - Teses 2. Cachaça - cromatografia - Teses 3. Frações de destilado - Teses 4. Fermentações - Teses I. Augusti, Rodinei, Orientador II. Siebald Luna, Helmuth Guido, Coorientador. III. Título.

CDU 043

UFMG

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3409-5732
FAX: 031 - 3409-5711
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br



"Influência de Alguns Parâmetros na Produção de Cachaça: Linhagem de Levedura, Temperatura de Fermentação e Corte do Destilado"

Marcus Henrique Canuto

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Rodinei Augusti - Orientador
UFMG

Prof. Helmuth Guido Siebald Luna - Co-Orientador
UFMG

Prof. Rogelio Lopes Brandão
UFOP

Prof. Patterson Patrício de Souza
CEFET-MG

Prof. Marcelo Martins de Sena
UFMG

Prof. Zenilda de Lourdes Cardeal
UFMG

Belo Horizonte, 21 de fevereiro de 2013.

Dedico esse trabalho aos produtores rurais, principalmente àqueles pequenos produtores da agricultura familiar, que com muita dedicação e perseverança lutam pela tradição e qualidade da Cachaça de Mineira.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela proteção e iluminação das horas mais difíceis.

Aos professores Rodinei Augusti e Helmuth G. L. Siebald pela orientação, estímulo, e amizade.

Ao professor Carlos Augusto Rosa e aos seus alunos do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras – ICB - UFMG pela cooperação e disponibilidade.

À minha mãe Gracinda, meu pai Sebastião Canuto (*in memoriam*) e irmãos Joubert e Helba pelo amor e carinho indispensáveis nessa jornada.

À minha noiva Denise pelo amor, paciência, incentivo, apoio incondicional e compreensão.

Ao Sr. Klaus Jansohn pela disponibilidade, cooperação, apoio, interesse e boas ideias.

À Metainox na pessoa do Sr. Domingos Pontes Nunes, à D&R Alambiques, à Vale Verde e ao técnico Gildson Vaz Moura pela colaboração na construção dos equipamentos e apoio na produção das amostras.

À Ampaq (Associação Mineira de Produtores de Cachaça de Qualidade) na pessoa do Sr Luiz Flamarion Bernardes Ferreira – Diretor Técnico da AMPAQ pela cooperação e colaboração.

Ao Departamento de ciências básicas da FCBS - UFVJM e aos colegas da disciplina de Bioquímica por compreender e cooperar com meu período de afastamento junto à UFVJM.

Aos companheiros dos Laboratórios 167, 171, Júlio, Júnia, Isabela, Jaqueline, Renata, Miriany, Vanessa, Maria José, Amauri, Helvécio, Cláudia pela convivência e amizade.

À aluna de iniciação científica Fabiana pela dedicação e auxílio nos trabalhos.

Aos amigos Paula, Fulgêncio, José Leônidas e Cristiano Ozório pelo incentivo e apoio.

Aos funcionários do departamento de química da UFMG, em especial às secretárias Paulete, Kátia e Lílian, do Programa de Pós-Graduação em Química, pela paciência.

Ao professor Geraldo Magela, ao técnico Wellerson e aos colegas do laboratório 291 pela e colaboração.

À agência de fomento FAPEMIG pelo apoio financeiro, sendo bolsista do Programa Mineiro de Capacitação Docente (PMCD) e financiamento do Projeto de pesquisa.

“A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento.”

Platão

RESUMO

Neste trabalho, a influência de diferentes linhagens de leveduras e temperaturas de fermentação no perfil dos voláteis da cachaça de alambique foi avaliada. A existência de um ou vários indicadores químicos que permitam definir claramente cada uma das frações, cabeça, coração e cauda, obtidas no processo de destilação do mosto fermentado da cana de açúcar, também foi verificada. Tais investigações contribuem ao desenvolvimento da atividade da produção da cachaça, a qual é importante tanto do ponto de vista econômico quanto social, para o país e para o estado de Minas Gerais em particular. Este trabalho visa, portanto, estabelecer critérios de controle de qualidade e boas práticas na fabricação para adequar o produto e sua imagem de modo a conquistar os mercados locais e internacionais. Sendo assim, foi desenvolvido e construído um equipamento de fermentação e destilação com inovações tecnológicas em escala semi-industrial, de forma que tal tecnologia pudesse ser repassada aos pequenos produtores rurais. Foram realizadas fermentações usando três linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e uma não *cerevisiae* nas temperaturas de 18, 23 e 28°C. Os vinhos obtidos foram destilados e as frações coletadas foram analisadas usando as técnicas de espectrometria de massas com ionização *electrospray* (ESI-MS) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Os resultados da Análise de componentes principais (PCA) e Análise hierárquica de grupos (HCA) obtidos do tratamento quimiométrico dos dados oriundos dos espectros de massas revelaram o agrupamento das frações do destilado (cabeça, coração e cauda). As análises cromatográficas revelaram a importância da seleção da linhagem de levedura bem como a definição da temperatura para a fermentação, demonstrando, na maioria dos casos, que temperaturas inferiores favorecem a menor produção de compostos secundários e contaminantes. Além disso, a utilização de dornas fechadas, ao promover fermentações em semianaerobiose, possibilitou a diminuição da produção de ésteres e álcoois superiores, fatores estes que tendem a melhorar a qualidade da bebida. Os resultados comprovaram o predomínio de compostos secundários e contaminantes nas frações cabeça e cauda, reforçando a realização do corte correto e descarte dessas frações. O equipamento de destilação reduziu a níveis muito baixos as concentrações de carbamato de etila, bem como definiu, com grande precisão, a separação das frações (cabeça, coração e cauda). Os equipamentos mostraram ser eficientes e, sendo acessíveis aos pequenos produtores, permitirão a obtenção de um produto de maior valor agregado e, desta forma, podem contribuir na melhoria das condições sócio-econômicas para fixação da mão de obra no campo.

Palavras-chave: Cachaça, destilação, fermentação, espectrometria de massas, GC-MS.

ABSTRACT

In this work, the influence of different strains of yeast and temperature of fermentation on the profile of the volatile fraction derived from the distillation of brewed sugarcane juice was evaluated. The existence of one or several chemical indicators to clearly define each distillate fraction, head, heart and tail, was also verified herein. These investigations contribute to the development of *cachaça* production, which is important, both economically and socially, for the country and mainly for the State of Minas Gerais. This thesis therefore aims to establish criteria for quality control and good manufacturing practices to suit the product and its image in order to conquer the local and international markets. Therefore, we developed and built fermentation and distillation apparatus with technological innovations in semi-industrial scale so that such technology could be passed on to small farmers/producers. Fermentations were conducted using distinct strains of yeast (three *Saccharomyces cerevisiae* and one non *cerevisiae*) at temperatures of 18, 23 and 28°C. The wines obtained were distilled and the collected fractions were analyzed using direct infusion electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The results of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) applied on the ESI-MS data revealed the grouping of the three distillate fractions (head, heart and tail). GC analysis revealed the importance of the selection of yeast strain as well as the control of the fermentation temperature; in most cases it was verified that lower temperatures favored a smaller production of secondary compounds and contaminants. Furthermore, the use of closed vessels to promote fermentations under semi-anaerobic conditions allowed the decrease in the production of esters and higher alcohols, a factor that tend to improve the quality of the beverage. Results showed the prevalence of secondary compounds and contaminants in the head and tail fractions, which reinforces the need in the determination of the correct cutting position and disposal of these fractions. The distillation apparatus remarkably reduced the concentration of ethyl carbamate and precisely defined the separation between fractions (head, tail and heart). The distillator proved to be efficient and, being accessible to small producers, will allow the attainment of a more valuable beverage and thus may contribute to improve the socio-economic conditions for the establishment of labor in the rural area.

Keywords: Cachaça, distillation, fermentation, ESI-MS, GC-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Fluxograma ilustrativo do processo de produção de cachaça.....	12
Figura 2.2 – Engenho elétrico.	13
Figura 2.3 – Dornas de fermentação de material plástico.	15
Figura 2.4 – Um alambique modelo serpentina simples com aquecimento direto.....	20
Figura 2.5 – Alambique de capelo simples.....	23
Figura 3.1 – (A) Biorreator; (B) cilindro para banho d'água com controle automático de temperatura; (C) tampa com lacre d'água; (D) escape de gás; (E) refrigerador e (F) central de automatização do sistema de controle de temperatura.....	27
Figura 3.2 – Visão interna do biorreator.	28
Figura 3.3 – Biorreator com cilindro de banho de controle de temperatura.....	28
Figura 3.4 – Central de controle de automatização da temperatura.....	29
Figura 3.5 – Alambique com aquecimento termostatizado.....	30
Figura 3.6 – Condensador com as serpentinas em cobre e aço inox.....	31
Figura 4.1 – Alambique termostatizado de cobre com condensador de aço inoxidável.....	37
Figura 4.2 – Perfis de restrição do DNA mitocondrial obtidos a partir do mosto com levedura iniciadora <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG 1031.	39
Figura 4.3 – Perfis de restrição do DNA mitocondrial obtidos a partir do mosto com levedura iniciadora <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG RJW23.	40
Figura 4.4 – Perfis de restrição do DNA mitocondrial obtidos a partir do mosto com levedura iniciadora <i>Schizosaccharomyces pombe</i> UFMG 521.....	41
Figura 5.1 - Construção da matriz de dados X a partir dos espectros de massas das amostras.	45
Figura 5.2 – Espectros de massas ESI (-)-MS típicos para amostras de frações cabeça, coração e cauda derivadas da destilação do vinho fermentado da cana de açúcar.....	46
Figura 5.3 – Gráfico de escores para componentes principais (PC1 e PC2) construído a partir dos dados de ESI (-)-MS das alíquotas recolhidas na destilação do vinho fermentado da cana.	48
Figura 5.4 – Gráfico de pesos as duas componentes principais (PC1 e PC2), construído a partir dos dados ESI (-)-MS das alíquotas recolhidas no decurso da destilação do vinho fermentado da cana.	49

Figura 5.5 – Dendrograma (HCA) construído a partir dos espectros de ESI (-)-MS das alíquotas recolhidas na realização da destilação do vinho fermentado da cana.	Erro! Indicador não definido.
Figura 5.5 – Dendrograma (HCA) construído a partir dos espectros de ESI (-)-MS das alíquotas recolhidas na realização da destilação do vinho fermentado da cana.	50
Figura 6.1 – Rampa de aquecimento do forno do CG-MS.	58
Figura 6.2 – Cromatogramas de alíquotas de destilados típicos das frações cabeça, coração e cauda.	61
Figura 6.3 – Cromatograma ampliado para o pico cromatográfico do 2-metilbutan-1-ol e para o 3-metilbutan-1-ol.	62
Figura 6.4 – Variação da concentração do furfural com a temperatura de fermentação e linhagem de levedura iniciadora.	64
Figura 6.5 – Variação da concentração do Benzaldeído com a temperatura de fermentação e linhagem de levedura iniciadora.	66
Figura 6.6 – Variação da concentração do Butanal com a temperatura de fermentação e linhagem de levedura iniciadora.	67
Figura 6.7 – Variação da concentração do acetato de etila com a temperatura de fermentação e linhagem de levedura iniciadora.	69
Figura 6.8 – Variação da concentração do acetato de isobutila com a temperatura de fermentação e linhagem de levedura iniciadora.	71
Figura 6.10 – Variação da concentração do hexanoato de etila com a temperatura de fermentação e linhagem de levedura iniciadora.	72
Figura 6.9 – Variação da concentração do acetato de hexila com a temperatura de fermentação e linhagem de levedura iniciadora.	72
Figura 6.11 – Variação da concentração do octanoato de etila com a temperatura de fermentação e linhagem de levedura iniciadora.	73
Figura 6.12 – Variação da concentração do propan-1-ol com a temperatura de fermentação e linhagem de levedura iniciadora.	76
Figura 6.13 – Variação da concentração do butan-1-ol com a temperatura de fermentação e linhagem de levedura iniciadora.	77
Figura 6.14 – Variação da concentração do 2-metilpropan-1-ol com a temperatura de fermentação e linhagem de levedura iniciadora.	77
Figura 6.15 – Variação da concentração do 2-metilbutan-1-ol com a temperatura de fermentação e linhagem de levedura iniciadora.	78
Figura 6.16 – Variação da concentração do 3-metilbutan-1-ol com a temperatura de fermentação e linhagem de levedura iniciadora.	78
Figura 6.17 – Variação da concentração do pentan-1-ol com a temperatura de fermentação e linhagem de levedura iniciadora.	79
Figura 6.18 – Variação da concentração do decan-1-ol com a temperatura de fermentação e linhagem de levedura iniciadora.	79

Figura 6.20 – Variação da concentração do mentol com a temperatura de fermentação e linhagem de levedura iniciadora.	80
Figura 6.19 – Variação da concentração do geraniol com a temperatura de fermentação e linhagem de levedura iniciadora.	80
Figura 6.21 – Variação da concentração do carbamato de etila com a temperatura de fermentação e linhagem de levedura iniciadora.	83
Figura 6.22 – Variação da concentração do Dimetilsulfóxido com a temperatura de fermentação e linhagem de levedura iniciadora.	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Limites de padrões de identidade e qualidade regulamentados para a cachaça	4
Tabela 2.1 – Toxicidade, ponto de ebulição e efeitos de algumas espécies químicas encontradas em cachaças.....	16
Tabela 6.1 – Materiais e equipamentos utilizados no desenvolvimento do método de análise do perfil de voláteis nas frações do destilado de cachaça	54
Tabela 6.2 – Reagentes utilizados no desenvolvimento do método de análise do perfil de voláteis em frações do destilado do vinho de cana.....	55
Tabela 6.3 – Analitos e suas concentrações para construção da curva de calibração	57
Tabela 6.4 – Programa de ajuste de ganho do detector	58
Tabela 6.5 – Coeficiente de determinação (r^2), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e a concentração máxima de alguns ésteres analisados presente nas frações do destilado	70
Tabela 6.6 – Relação entre as concentrações encontradas nas frações de destilado coração analisadas e o máximo relatado pela literatura.....	71
Tabela 6.7 – Coeficiente de determinação (r^2), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e a concentração máxima dos álcoois superiores analisados presente nas frações do destilado	74
Tabela 6.8 – Aroma dos álcoois superiores e relação entre as concentrações encontradas nas alíquotas frações coração e as relatadas pela literatura.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

°Brix	– Grau Brix (escala numérica que mede a quantidade de compostos solúveis numa solução de sacarose)
CE	– Carbamato de etila
DMSO	– Dimetilsulfóxido
ESI-MS	– Espectrometria de massas com ionização por electrospray (<i>Electrospray ionization mass spectrometry</i>)
GC-MS	– Cromatografia gasosa com detecção com espectrometria de massas (<i>Gas chromatography–mass spectrometry</i>)
°GL	– Grau Gay Lussac (fração em volume ou percentual em volume (%v))
HCA	– Análise hierárquica de grupos (<i>Hierarchical cluster analysis</i>)
LC	– Cromatografia líquida (<i>Liquide Chromatography</i>)
LD	– Limite de detecção
LQ	– Limite de quantificação
MS-IT-TOF	– Espectrometria de massas com armadilha de íons e tempo de voo (<i>Mass spectrometer - ion trap - time-of-flight</i>)
PCA	– Análise de componentes principais (<i>Principal component analysis</i>)
pH	– Potencial hidrogeniônico
CDL	– <i>Curved Desorption Line</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	TEMA.....	4
1.2	PROBLEMA.....	5
1.2.1	Objetivo geral	6
1.2.2	Objetivos específicos.....	6
1.3	JUSTIFICATIVA	7
1.4	ESTRUTURA DA TESE	7
2	CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA	8
2.1	BREVE HISTÓRICO DA AGUARDENTE DE CANA DE AÇÚCAR.....	9
2.2	O PROCESSO DE PRODUÇÃO DA CACHAÇA TRADICIONAL	11
2.2.1	A fermentação	14
2.2.2	A destilação	19
2.2.3	O envelhecimento.....	24
3	DESENVOLVIMENTO E CONSTRUÇÃO DE BIORREADORES E ALAMBIQUE EM ESCALA SEMI-INDUSTRIAL.....	25
3.1	PARTE EXPERIMENTAL	26
3.1.1	Biorreatores	26
3.1.2	Alambique.....	29
3.1.3	Realização de fermentações e destilações piloto	31
3.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
3.2.1	Fermentação e destilação piloto.....	32
3.3	CONCLUSÕES	33
4	FERMENTAÇÕES COM TEMPERATURA CONTROLADA E DESTILAÇÕES.....	34
4.1	PARTE EXPERIMENTAL	35
4.1.1	Microrganismos	35
4.1.2	Reativação dos inóculos.....	35
4.1.3	Fermentações.....	35
4.1.4	Destilações	37
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.3	CONCLUSÃO.....	42

5	MODELAGEM QUIMIOMÉTRICA DAS FRAÇÕES DE DESTILADO USANDO ESPECTROS DE MASSAS OBTIDOS POR IONIZAÇÃO ELECTROSPRAY (ESI-MS)	43
5.1	PARTE EXPERIMENTAL	44
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.3	CONCLUSÕES	52
6	PERFIL SEMIQUANTITATIVO DE ALGUNS VOLÁTEIS NAS FRAÇÕES DE DESTILADOS E SUA RELAÇÃO COM A LINHAGEM E TEMPERATURA DE FERMENTAÇÃO	53
6.1	PARTE EXPERIMENTAL	54
6.1.1	Materiais	54
6.1.2	Coleta das amostras	56
6.1.3	Preparação das soluções dos padrões e curva analítica	56
6.1.4	Definição de parâmetros instrumentais	58
6.1.5	Programas para tratamento dos dados	59
6.1.6	Tratamento dos dados	59
6.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
6.2.1	Resultados cromatográficos	60
6.2.2	Influência da temperatura de fermentação e da linhagem de levedura no perfil de alguns voláteis	63
6.3	CONCLUSÕES	86
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
	REFERÊNCIAS	90
	APÊNDICE	102
	Trabalhos Apresentados em Eventos	103
	Palestras Ministradas em Eventos	103
	Co-orientação de Trabalho de Conclusão de Curso	103
	Trabalhos Publicados e Submetidos para Publicação	103

1 INTRODUÇÃO

Cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil [1]. Bebida com graduação alcoólica de trinta e oito a quarenta e oito por cento em volume, a vinte graus Celsius; obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana de açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até seis gramas por litro, regulamentada pelo art. 53 do Decreto nº 6.871 de 04 de julho de 2009 [2].

A cachaça foi a primeira bebida destilada na América Latina, descoberta entre os anos 1534 e 1549, durante o processo de produção do açúcar. Portanto, a história da cachaça se confunde com a própria história do Brasil [3, 4]. Hoje, ela é a terceira bebida destilada, em volume consumido, no mundo, com cerca de 4000 marcas, 40.000 produtores no Brasil e volume anual em torno de 1,2 bilhão de litros [5, 6].

O volume de exportação da cachaça, em torno de 10 milhões de litros, é aproximadamente 1% de toda produção anual. Em 2011, este destilado foi exportado através de 90 empresas que o comercializaram para 60 países e geraram uma receita de U\$ 17,28 milhões pela exportação de 9,8 milhões de litros [6, 7]. Apesar de um crescimento médio nas exportações de 10% ao ano, este número ainda é pequeno se comparado à sua produção, portanto possui ainda um grande potencial a ser explorado, considerando-se as tendências mundiais e o já comprovado sucesso da bebida [4]. Se compararmos com o volume de importação de uísque no ano de 2011, que segundo o Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, foi de 25,0 milhões de litros com gasto de U\$ 115,56 milhões, percebemos então o quanto temos que investir nas exportações da cachaça [8].

As últimas medidas tomadas para o setor, como a criação da Câmara Setorial [9], a defesa pela denominação de origem [1], a elaboração de toda uma regulamentação para o produto [10], assim como a publicação da 'Agenda estratégica 2010-2015 – Cachaça' [11], constituem indicadores de "novos tempos" para o destilado de cana brasileiro. Essas ações revelam um maior profissionalismo e maturidade do setor, sendo, portanto, portadores de novas e boas perspectivas para a cachaça num futuro próximo [12].

Acreditamos que o aumento da demanda pela bebida de elevado padrão de qualidade provoca desafios para os produtores na adoção de técnicas produtivas mais eficientes. Dentre as etapas de produção da cachaça, a fermentação do mosto de caldo de cana, destilação do vinho e o envelhecimento, são as mais importantes para a obtenção de uma aguardente de excelência química (toxicológica) e sensorial.

O processo de fabricação artesanal da cachaça é simples, porém realizado em diversas etapas, fatores que podem alterar o produto final; além disso, deve-se levar em consideração a grande diversidade de regiões produtoras da bebida. Por isso, as cachaças artesanais possuem uma variedade tão extensa de aromas e sabores [13-16].

A destilação do vinho de cana de açúcar para a produção de cachaça ocorre, basicamente, de duas maneiras diferentes, usando alambiques de cobre, na destilação em batelada ou descontínua, ou usando grandes alambiques de coluna de aço inoxidável, de destilação contínua. A legislação do Estado de Minas Gerais, além de reconhecer oficialmente o processo tradicional de fabricação, em alambique, da cachaça de Minas, considera a cachaça artesanal mineira, como a bebida obtida pela destilação do mosto fermentado apenas em alambiques de cobre [17, 18].

A legislação brasileira vigente determina os limites máximos aceitáveis para os contaminantes orgânicos e inorgânicos e congêneres, definindo desta forma os padrões de qualidade para a cachaça, conforme descrito na Tabela 1.1 [10].

Na busca por soluções para controlar a contaminação do destilado, destiladores de colunas de aço inox, alumínio e porcelana têm sido utilizados na indústria de aguardente. Entretanto, observou-se que a ausência de cobre no destilador e/ou nas colunas conduz a um defeito organoléptico no produto, o qual apresenta aroma típico de sulfetos [19]. Outras inovações tecnológicas implementadas no fabrico da cachaça estão na seleção de linhagens e sua comercialização para que os produtores possam utilizá-las como fermento iniciador da fermentação, favorecendo a busca e manutenção de um padrão de qualidade [20-22].

Tabela 1.1 – Limites de padrões de identidade e qualidade regulamentados para a cachaça

Componente	Limite	Unidade
Teor de etanol em cachaça	38 a 48	% em v/v de etanol a 20 °C
Sacarose	6	g L ⁻¹
Acidez volátil, em ácido acético	150	mg.100mL ⁻¹ de a.a.*
Ésteres, em acetato de etila	200	mg.100mL ⁻¹ de a.a.*
Aldeídos, em etanal	30	mg.100mL ⁻¹ de a.a.
Soma de furfural e hidroximetilfurfural	5	mg.100mL ⁻¹ de a.a.*
Álcoois superiores (soma dos álcoois propan-1-ol, 2-metilpropan-1-ol, 2-metilbutan-1-ol, 3-metilbutan-1-ol e)	360	mg.100mL ⁻¹ de a.a.*
Congêneres (soma da acidez volátil, ésteres, aldeídos, furfural e álcoois superiores)	200 a 650	mg.100mL ⁻¹ de a.a.*
Metanol	20	mg.100mL ⁻¹ de a.a.*
Acroleína	5	mg.100mL ⁻¹ de a.a.*
Butan-1-ol	3	mg.100mL ⁻¹ de a.a.*
Butan-2-ol	10	mg.100mL ⁻¹ de a.a.*
Carbamato de etila	150	µg L ⁻¹
Cobre	5	mg L ⁻¹
Chumbo	200	µg L ⁻¹
Arsênio	100	µg L ⁻¹

* álcool anidro

Fonte: adaptado [10]

As contaminações, bem como o perfil de componentes secundários do destilado, possuem relação não somente com o processo de destilação, mas com os processos de fermentação e envelhecimento [23-25].

1.1 TEMA

Sabemos que o setor produtivo de cachaça de alambique está vivamente interessado no desenvolvimento de metodologias inovadoras e confiáveis que permitam a obtenção de uma bebida de alta qualidade, em particular o do Estado de Minas Gerais. O rol econômico e social da empresa da aguardente artesanal mineira é elevado, pois se caracteriza por projetos integrados com outras atividades, como a

bovinocultura de leite ou de corte e a produção de adubo orgânico. Nesta concepção, o bagaço, a ponta de cana e o vinhoto são usados na alimentação do gado no período seco do ano, quando as pastagens são deficientes. O período coincide com o da safra de cana, quando os pecuaristas passam a contar com os subprodutos da fabricação da aguardente. Concordamos que de fato, isto proporciona maior estabilidade da mão de obra, pois o período de produção coincide com a entressafra de outras culturas, evitando o êxodo da população rural para os já saturados grandes centros urbanos, aumentando os problemas sociais daí decorrentes.

O impacto econômico e social no curto prazo dependerá da receptividade dos produtores artesanais às mudanças no processo que inevitavelmente deverão ser implementadas. No longo prazo, há a necessidade do estabelecimento de uma linha de pesquisa ininterrupta nesta área, assim como é feito nas bebidas destiladas tradicionais, como uísque, vodca, rum, conhaque e tequila.

Mesmo com sua longa história, pouco avanço tem sido observado, principalmente no setor produtivo da cachaça tradicional. Novas pesquisas sobre a qualidade da cachaça devem buscar e implantar tecnologias mais avançadas nas mais diversas fases da produção da bebida, mas respeitando e apurando o processo tradicional, responsável por uma bebida de alta qualidade sensorial. Outrossim, os componentes secundários presentes na cachaça podem prejudicar tanto a qualidade da bebida quanto a saúde dos consumidores, dependendo da frequência e da quantidade com que esta bebida é ingerida. Neste contexto, o monitoramento de tais substâncias torna-se uma necessidade sanitária e, ao mesmo tempo, um parâmetro para atestar a qualidade do produto.

1.2 PROBLEMA

Nas últimas décadas, muitas transformações foram sentidas na produção e comercialização da cachaça. Dentre os principais fatores que corroboram para esse processo se destacam os esforços para o reconhecimento da denominação de origem “cachaça”, a construção de normas e selos de qualidade nas várias esferas (nacional, estadual e regional), a introdução de estratégias de mercado, como a organização dos pequenos e médios produtores em cooperativas e associações, o

marketing e apresentação final do produto. A maior interação e articulação entre esses produtores têm proporcionado escala, incorporação de atributos específicos à bebida e, conseqüentemente, a conquista de importantes nichos de mercado, bem como o aumento do valor agregado da bebida [12].

Acreditamos que o desempenho futuro do setor produtivo da cachaça artesanal dependerá do acréscimo de tecnologia à atividade visando o enobrecimento da bebida, sem perder o seu caráter tradicional reconhecido como Patrimônio Histórico do Estado de Minas Gerais. Para tanto, os esforços devem ser concentrados no desenvolvimento de formas de manter os padrões de qualidade da cachaça e, desta maneira, conquistar e também fidelizar o consumidor.

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo é identificar a influência de diferentes linhagens de leveduras e temperaturas de fermentação no perfil dos voláteis da cachaça de alambique e verificar a existência de indicadores químicos que permitam determinar claramente a posição de corte das frações oriundas da destilação, isto é, cabeça, coração e cauda.

1.2.2 Objetivos específicos

Os objetivos primordiais são os seguintes:

- i. Desenvolver e construir biorreatores termostatizados com ajuste e manutenção de temperatura programável em escala piloto;
- ii. Desenvolver e construir um alambique termostatizado em cobre em escala piloto;
- iii. Empregar a planta piloto construída para produzir e coletar as frações de destilados oriundos de diferentes vinhos fermentados do mosto de caldo de cana por três linhagens da levedura *Saccharomices cerevisiae* e uma de *Saccharomyces não cerevisiae*;
- iv. Definir as frações do destilado, cabeça coração e cauda;
- v. Determinar o teor de carbamato de etila e outros componentes secundários, álcoois superiores, ésteres e aldeídos, nas frações dos destilados;

- vi. Julgar a influência das linhagens de levedura e temperatura de fermentação na produção de cachaça.

1.3 JUSTIFICATIVA

Este trabalho foi originado objetivando contribuir ao desenvolvimento do setor produtivo, levando-se em consideração os fatores econômicos e sociais decorrentes da atividade da produção da cachaça. Também foi considerado que a bebida representa um ícone para o país e para o estado de Minas Gerais em particular, e, para tanto, se faz mister a adoção de práticas de controle de qualidade, boas práticas na fabricação para adequar o produto e sua imagem de modo a ser consumido nos mercados locais e internacionais.

1.4 ESTRUTURA DA TESE

A tese é apresentada em sete capítulos. Os dois primeiros capítulos apresentam os aspectos gerais, a contextualização, os fundamentos dos principais tópicos descritos no trabalho e uma revisão bibliográfica. O capítulo 3 descreve o desenvolvimento e construção da planta piloto: dorna com controle de temperatura automatizada e alambique com adaptações tecnológicas; bem como os resultados obtidos na realização do teste piloto. No capítulo 4 são apresentados materiais, métodos e discussão dos resultados obtidos para a parte microbiológica do trabalho referente às fermentações com linhagens selecionadas e controle de temperatura, bem como a parte experimental das destilações e coletas de amostras. Já o capítulo 5 trata da modelagem quimiométrica das frações de destilado usando os espectros de massas com ionização *electrospray*. A determinação do perfil de alguns voláteis nas frações de destilados e sua relação com a linhagem e temperatura de fermentação são relatados no capítulo 6. O capítulo 7 refere-se à conclusão geral do trabalho e, por fim, são listadas as referências utilizadas.

2 CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BREVE HISTÓRICO DA AGUARDENTE DE CANA DE AÇÚCAR

Apesar dos primeiros relatos sobre fermentação terem surgido dos egípcios antigos, onde se curavam moléstias com a inalação de vapores de fermentados, somente os gregos registraram o processo de obtenção da *ácqua ardens*, a água que pega fogo – água ardente (*Al Kuhu*). A aguardente chega então ao Oriente Médio por causa da força da expansão romana. Com isto, os árabes descobrem e melhoram os equipamentos para a destilação, deixando-os semelhantes aos que conhecemos hoje. Estes últimos não usavam a palavra *Al Kuhu* e sim *Al raga* para retratar a aguardente, originando então o nome mais popular da aguardente no sul da Ásia: Arak, uma aguardente misturada com licores de anis e degustada com água. A água ardente passa às mãos dos alquimistas que lhe atribuem propriedades místico-medicinais, nomeando-a como a água da vida (*Eau de Vie*), o elixir da longevidade [3, 26].

Essa tecnologia de produção invade todo o Velho Mundo, dando origem às mais diversas bebidas destiladas, como a grappa (destilado de uva) na Itália; o kirsch (destilado da cereja) nas terras Germânicas; o uísque (destilado de cevada sacarificada) na Escócia e a vodca (destilado de centeio) na Rússia. Portugal absorve esta tecnologia devido à invasão moura e produz a bagaceira (destilado do bagaço de uva). Posteriormente, devido às grandes viagens marítimas, essa tecnologia é levada ao novo mundo [27].

A história da cachaça se confunde até mesmo com a história do Brasil, acompanhando todos os momentos importantes de nossos cinco séculos de existência.

Para Cascudo, [3] cachaça é a “*aguardente de mel de cana ou borra de mel destilada*”. Ele lembra que Sá de Miranda (1481-1558) usou o vocábulo na sua carta a Antônio Pereira, senhor de Basto: “*ali não mordida a graça / Eram iguais os juízes / Não vinha nada da praça / Ali, da vossa cachaça / Ali, das vossas perdizes...*”. Talvez seja essa uma das mais antigas referências à cachaça, cuja origem do nome ainda é obscura. A versão mais aceita é a de Silveira Bueno, justamente pelo uso que se fazia da aguardente nos seus

primórdios: *“Antigamente, cachaça era sinônimo de porca e de porco (cachaço). Como a carne fosse dura, juntava-lhe aguardente para amolecê-la. O nome da porca (cachaça) passou a significar a mesma aguardente”*.

Outra origem para a descoberta do vocábulo parte de que os senhores de engenho da Capitania de São Vicente, entre 1532 e 1548, observaram que o vinho de cana de açúcar, garapa azeda vinda dos tachos de rapadura e que ficava ao relento em cochos de madeira para os animais beberem, era uma bebida limpa, em comparação com o Cauim, vinho produzido pelos índios, no qual todos cospem num enorme caldeirão de barro para ajudar a fermentação do milho. Estes senhores de engenho passam a servir o tal caldo de garapa fermentada, denominado cagaça, para os escravos. Daí, é um salto para destilar a cagaça e nascer a cachaça [28].

No Brasil, sua produção data do século XVI, na Bahia, em decorrência da implantação da indústria açucareira pelos colonizadores portugueses. Gabriel Soares, em seu “Memorial”, cita a existência de *“oito casas de cozer méis”*, naquela província, por volta de 1584 [27].

Segundo Cascudo, em 1711, estas informações foram confirmadas, estabelecendo clara distinção entre aguardente – feita de mel de cana destilado – e a cachaça, reiterando *“que os negros escravos se embriagavam com uma e outra”* [3]

Fica claro que cachaça era inicialmente uma bebida dada aos negros, que segundo Freyre [26] *“tinham três refeições por dia e um pouco de aguardente de manhã. A primeira refeição consistia de farinha ou pirão com frutas e aguardente. Nos dias feriados, era costume, em algumas fazendas e em alguns engenhos, matar um boi para o regalo dos escravos e dar-lhes aguardente, que os tornava alegres e os animava para os batuques”*. Já os portugueses, por sua vez, serviam-se do vinho, aqui chegado em tonéis, junto com o queijo do reino, azeite, lentilha e marmelada.

Com o passar dos tempos melhoraram-se as técnicas de produção. A cachaça passou a ser apreciada por todos e consumida nos banquetes

palacianos. Misturada ao gengibre e outros ingredientes, para as festas religiosas portuguesas, ela passou a ser chamada de quentão.

No início do século XX, a cachaça era ainda uma bebida discriminada socialmente. Motivo de chacotas e piadas. Tal fato, entretanto, não diminuiu o seu consumo velado no interior das residências, entre parentes e amigos. Já em 1922, a Semana da Arte Moderna vem a resgatar a brasilidade, e a cachaça começa a desfazer dos preconceitos e continuar no caminho da apuração de sua qualidade [27].

Paulatinamente, a produção de cachaça modificou-se. Os alambiques artesanais instalados nas fazendas com produção destinada ao consumo interno abriram espaço para alambiques industriais, que exportam seu produto para todas as partes do país e do exterior.

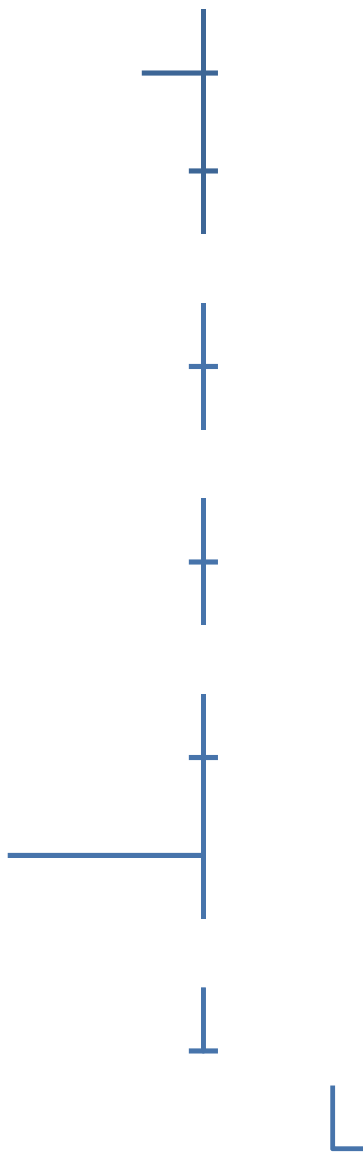
Em 2001, a cachaça consagra-se como bebida nacional com o Decreto nº 4062 de 21 de dezembro deste ano, o qual define as expressões "cachaça" e "cachaça do Brasil" como indicações geográficas [1]. Acreditamos que a cachaça, não sendo mais expressamente vinculada aos indivíduos marginalizados da sociedade, deve estar presente em todos os níveis sociais.

Atualmente, várias marcas de alta qualidade figuram no comércio nacional e internacional, estando presentes nos melhores restaurantes e adegas residenciais do Brasil e do mundo [27].

2.2 O PROCESSO DE PRODUÇÃO DA CACHAÇA TRADICIONAL

Em nossa opinião o processo de fabricação da cachaça de alambique deveria ser conforme apresentado no fluxograma do processo (Figura 2.1) para obtenção da cachaça e ilustra o exemplo de uma planta básica de produção do destilado. O processo é simples e pode ser resumido pelos seguintes estágios: preparo da matéria prima (corte da cana de açúcar, limpeza com separação das folhas e terra; transporte e armazenamento dos colmos); extração do caldo da cana; fermentação do caldo; destilação do "vinho" e obtenção da cachaça. Este

produto pode ser ainda armazenado em tonéis de aço inox ou envelhecido em tonéis de madeira [28].



A primeira etapa do processo consiste na colheita da cana, durante um período de 120 dias que vai de maio a outubro. A cana ao ser colhida deve estar perfeitamente madura e não deve ter sido queimada, pois, de outra forma, propiciaria a inversão da sacarose, além do acúmulo de cinzas nas dornas de fermentação e o gosto de queimado deixado na aguardente devido ao aumento da formação de furfurais e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos [16, 29, 30]. A quantidade de cana cortada deve ser calculada previamente para que não fique mais do que 24 horas sem ser utilizada, pois isso faz com que se inicie o processo de fermentação [28]. Além disso, acreditamos que a presença de oxigênio favorece o crescimento bacteriano e, conseqüentemente, inicia-se uma fermentação láctica indesejável.

Esta cana colhida deve ser lavada para reduzir ao máximo a quantidade de impurezas sólidas que podem contaminar o fermento e o mosto. A seguir, ela é passada por uma moenda para se extrair o caldo. A moenda (Figura 2.2) pode ser movida por tração animal, por roda de água e por motores a combustível ou elétricos [16]. Mas percebemos que os mais comuns, atualmente, são aqueles movidos pela energia elétrica, já que a eletrificação rural é fato consumado.



Figura 2.2 – Engenho elétrico.

O caldo de cana ou garapa necessita ser filtrado e passado por um decantador para tornar-se desprovido de qualquer matéria sólida que ainda reste, tais como terra e bagacilho, os quais podem também contaminar o fermento e comprometer a bebida final [31]. Reconhecemos que o melhor processo para essa separação deveria ser a centrifugação, apesar de ser muito dispendioso para os pequenos produtores.

No caldo deve ser medido o teor de açúcar, o qual deve ficar entre 14 e 16ºBrix; caso esse teor seja superior, ele deve ser corrigido com água potável até que alcance a graduação desejada. Caso o alto teor de açúcares no caldo for muito elevado ele pode produzir um teor de álcool muito grande, prejudicial à 'atividade fermentativa das leveduras [31]. O pH ideal deve ficar entre 4,8 e 6,0 e as temperaturas mais comuns são entre 26 a 32°C. A partir deste ponto, passa-se a chamá-lo mosto, sendo despejado em biorreatores (dornas) para fermentação. As dornas devem conter o fermento iniciador consistindo de cerca de 20% do volume da dorna (pé de cuba). Durante o processo artesanal, os produtores possuem receitas próprias do fermento iniciador, principalmente adicionando ao caldo de cana fubá de milho ou canjiquinha de milho, farelo de soja, querela de arroz, entre outros. Esta mistura é deixada fermentar por 5 a 20 dias em recipientes separados, ou na própria dorna para o desenvolvimento da microbiota fermentadora do pé de cuba [28, 32, 33].

2.2.1 A fermentação

Várias são as pesquisas a respeito da seleção e identificação de linhagens de leveduras que favoreçam a fermentação do mosto produzindo uma cachaça de qualidade superior [20, 21, 34-38]. Convém salientar que existe, no mercado, a comercialização de linhagens isoladas de leveduras *Saccharomices cerevisiae* para fermento iniciador, denominadas leveduras selecionadas como exemplo da UFLA CA-11.

Aconselhamos a utilização das dornas de aço inox, pois estas são de limpeza mais fácil; no entanto, dornas de madeira são ainda utilizadas. Encontram-se também à venda no mercado dornas de material plástico, fibra de vidro e aço carbono (Figura 2.3).

O mosto é fermentado até atingir 0°Brix, quando o açúcar é quase todo convertido pela microbiota em álcoois e, em menor quantidade, em outros compostos orgânicos nas dornas. O período de uma fermentação completa depende, dentre outros fatores, da temperatura e da levedura, mas geralmente acontece durante um período aproximado de 24 horas transformando-se, assim, o mosto em vinho [28].

A fermentação é o processo responsável pela formação da maioria das substâncias responsáveis pelo aroma e sabor da bebida final. Segundo Laing e Jinks, citados por Silva [39], o sabor é definido como um conjunto de sensações provocadas por estímulos de um produto na cavidade bucal. A sensação de sabor compreende os odores, causados pelas substâncias voláteis (via retro nasal), os gostos, provocados pelas substâncias solúveis na boca e os fatores de

sensibilidade química, estimulantes das terminações nervosas das cavidades oral e nasal (pungência, frescor, irritação). Algumas substâncias orgânicas presentes na cachaça produzem efeitos de sabor e toxicidade [40], como as enumeradas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Toxicidade, ponto de ebulição e efeitos de algumas espécies químicas encontradas em cachaças

Espécie	DL ₅₀ (g.kg ⁻¹)	Pe (°C)	Algumas Propriedades
Formaldeído	0,26	- 19,5	Carcinogênica, irritante
Acetaldeído	1,930	21	Narcótica, odorífera, fornece sabor
n-Butiraldeído	5,89	74,8	Narcótica, irritante
Benzaldeído	1,000	179	Narcótica, dermatite, odorífera (cheiro de amêndoas), fornece sabor.
Valeraldeído	4,6	102	Irritante moderado, fornece sabor
Furfural	0,127	161,8	Dor de cabeça, irritante, odor desagradável
Acetona	6,6	56,5	Dor de cabeça, fadiga, etc.
Acetato de Etila	10,1	77	Cheiro de frutas
Caprilato de Etila	0,02596	207	Cheiro de abacaxi
Carbamato de Etila	-	185	Carcinogênico. Sabor salino
Dimetilsulfeto	-	36,2	Odor desagradável
Metanol	1,2	64,7	Dor de cabeça, cegueira
Propanol	1,87	97,2	Ação depressiva, irritante para os olhos e mucosas
Isobutanol	2,46	108	Irritante, fraca como espécie odorífera.
Álcool Isoamílico	5,75	128,5	Cheiro desagradável, sabor repulsivo. Dor de cabeça, náuseas.
Ácido Acético	3,53	118	Cheiro forte, desagradável. Causa corrosão dos tecidos orgânicos
Ácido Caprílico	10,080	239,7	Cheiro ligeiramente desagradável, sabor rançoso
Ácido Cáprico	0,129	270	Cheiro rançoso
Ácido Láurico	0,131	225	Cheiro leve

DL₅₀ = Dose letal para o 50 % da matéria viva. Via oral em ratos.
Pe = Ponto de ebulição

Fonte: adaptado [41]

Os ésteres, álcoois superiores e compostos carbonílicos são substâncias voláteis produzidas durante a fermentação. Segundo Saerens e coautores [42], em particular, ésteres voláteis são de grande interesse industrial, pois a presença destes compostos determina o aroma frutado das bebidas fermentadas, por exemplo cerveja e vinho. Mesmo pequenas alterações nas concentrações desses metabólitos secundários podem produzir grandes efeitos na qualidade sensorial final de bebidas fermentadas, já que eles revelam seu aroma mesmo em baixíssimas concentrações.

Existem dois grupos principais de ésteres aromatizantes em bebidas fermentadas. O primeiro grupo contém os acetatos (no qual o ácido acético origina o grupo acetato e o álcool tem sua origem num complexo grupo que vai desde o etanol aos diversos álcoois derivados do metabolismo de aminoácidos), tais como acetato de etila (aroma de menta), acetato isoamílico (aroma de banana), e acetato de feniletila (rosas, mel) [42].

O segundo grupo, são os ésteres etílicos (em que o grupo álcool é o etanol e o ácido é um grupo de ácidos graxos de cadeia média), que inclui hexanoato de etila (aroma de sementes de anis, maçã verde), octanoato de etila (aroma maçã), e decanoato de etila (odor floral) [42].

Destes dois grupos, os ésteres de acetato têm recebido maior atenção, não porque eles sejam mais importantes, mas porque eles são produzidos em quantidade muito superior e, portanto, mais fáceis de serem mensurados. Além disso, os genes envolvidos na sua síntese foram descobertos primeiro. Ao contrário, pouco se sabe sobre a produção dos ésteres de etila, apesar do desejável aroma de maçã verde das substâncias desta classe [42].

Os compostos carbonílicos, em particular os aldeídos, estão amplamente distribuídos nos vinhos e bebidas em geral influenciando significativamente no aroma desses produtos, devido ao baixo valor de seus limites de percepção olfativa. O tipo e a concentração desses compostos carbonílicos podem variar tanto quanto o poder de conferir notas agradáveis ou desagradáveis ao aroma, ou seja, um único aldeído poderá influenciar positiva ou negativamente nas características sensoriais do vinho, dependendo principalmente da sua concentração no meio. Por esse motivo, a identificação de compostos carbonílicos pode ser um recurso importante na busca pela sua padronização [43].

Vários são os fatores que podem influenciar na constituição das bebidas alcoólicas, tais como o substrato a ser fermentado, o processo de fermentação, a destilação e o armazenamento durante o envelhecimento. Mas, as condições no processo de fermentação e o tipo de levedura são os fatores que mais influenciam

na qualidade sensorial das bebidas alcoólicas, devido aos compostos produzidos durante a fermentação, os quais dão sabor e aroma às bebidas [34, 44, 45]

Leveduras são organismos vivos e só podem tolerar certos ambientes. A acidez do meio, ou pH, é muito importante, pois a levedura fermenta de forma confiável em apenas um nível de pH ótimo. Produtores de vinho, muitas vezes, adicionam ácido tartárico no início da fermentação para iniciar o processo visando uma redução do pH para um nível apropriado às leveduras [32].

A levedura também requer um ambiente ideal para fermentar de forma confiável e eficiente. Uma faixa de temperatura específica deve ser mantida para assegurar a fermentação consistente. Se a temperatura subir demais, a atividade da levedura cessará e haverá degradação de outros compostos orgânicos no vinho [42].

A população de micro-organismos responsável pela fermentação do caldo de cana é constituída normalmente por uma grande diversidade de leveduras e bactérias; dentre essas espécies as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* são predominantes [32].

S. cerevisiae é um micro-organismo leveduriforme, unicelular e que possui geralmente uma forma elipsoidal. Em aerobiose e nas condições ótimas de cultura e nutrição, sua biomassa é dobrada a cada 90 minutos. Esta levedura se reproduz de forma assexuada através de brotos (divisão mitótica) ou sexuada por esporulação (meiose, segregação e formação de haplóides) e cruzamento com formação de diplóides *mating* [45].

As cepas de *S. cerevisiae* possuem uma grande diversidade genética, quando selecionadas em diferentes regiões ou até mesmo em um único local em diferentes momentos do processo de fermentação [45].

Quando o teor de açúcar do mosto é praticamente todo metabolizado pelas leveduras, baixando-o para 0 °Brix, deve-se transferir o vinho para a panela do alambique e realizar a destilação. Ao transferir o vinho para o alambique deve-se conservar na dorna de fermentação o pé de cuba, cerca de 20% do volume, contendo a microbiota propagadora do fermento. A centrifugação consiste no

melhor processo para obtenção de um vinho com menor quantidade de matéria sólida, mas por economia, utiliza-se normalmente a decantação neste processo [28].

2.2.2 A destilação

A destilação é o processo responsável por separar as substâncias voláteis (água, álcool etílico, aldeídos, álcoois superiores, ácido acético, gás carbônico, etc.) das não voláteis (sólidos em suspensão, sais minerais ou oriundas da decomposição de células de leveduras ou bactérias, etc.). Através do aquecimento do vinho no alambique formam-se vapores ricos em etanol e demais substâncias voláteis, as quais são condensadas pelo resfriamento, retornando à forma líquida. De um vinho com 7 a 8°GL chega-se a um destilado com 38 a 54°GL de etanol. O produto resultante, de composição diferente daquela do vinho (mais rico em substâncias voláteis) é a aguardente ou cachaça. A parte que permanece na panela do alambique, chamada de vinhoto, é rica em água e em substâncias não voláteis do vinho [46].

O processo de destilação não só concentra os constituintes voláteis da fermentação, como também produz novos compostos por desidratação, esterificação, etc. Os congêneres derivados da reação de Maillard, tais como pirazinas e compostos furânicos, formados da degradação de açúcares residuais, estão também relacionados com aromas, como o cacau e caramelo, respectivamente. Os níveis de tais substâncias são muito mais elevados em aguardentes de alambiques expostos ao calor intenso por longo período [47].

Pode-se também salientar que a acroleína, responsável pelo caráter pungente em rum, uísque e conhaque, é produto da degradação térmica do glicerol produzido pela ação bacteriana sobre as bebidas fermentadas [48, 49].

Três objetivos principais podem ser atribuídos à destilação: (I) realizar a extração de compostos voláteis presentes no fermentado, (II) promover a concentração seletiva de compostos orgânicos voláteis desejáveis e eliminação seletiva de compostos menos voláteis que podem também representar riscos à

saúde ou serem prejudiciais para as características organolépticas do destilado, e (III) promover reações químicas específicas que originam compostos com efeito de beneficiar o aroma. Portanto, a destilação desempenha um papel ativo na determinação da qualidade final da cachaça [19, 50, 51].

O aquecimento do alambique pode ser por fogo direto, indireto ou caldeira. Os modelos de alambique podem ser de capelo simples ou “tromba de elefante”, capelo com a saída em serpentina, serpentina ou “cabeça quente”, capelo modificado com serpentina, capelo com pré-aquecedor, capelo modificado com pré-aquecedor, serpentina com deflegmador, três corpos ou tipo alegria [46]. Os diferentes modelos de alambique podem influir na qualidade do produto, além de cada um apresentar rendimento e técnica própria de operação [52]. Um modelo muito comum entre os pequenos produtores é apresentado na Figura 2.4.



Figura 2.4 – Um alambique modelo serpentina simples com aquecimento direto.

O fermentado é, então, aquecido utilizando chama (alimentada por lenha, com gás natural ou bagaço de cana) ou de aquecimento indireto como caldeiras ou banhos. Esse vinho aquecido forma um vapor rico em compostos voláteis ou solúveis na mistura etanol água. O vapor é, então, condensado fora da panela de aquecimento, passando por uma serpentina de refrigeração. O destilado é então, coletado em três frações sequenciais.

O primeiro corte é destinado a separar a fração cabeça, enquanto o segundo corte separa a fração coração da cauda. A fração cabeça é, às vezes, esbranquiçada ou esverdeada, a fração cauda é turva e a fração coração é incolor e também é a única que possui valor comercial. Para determinar o melhor ponto de corte entre as três frações de destilado, deve-se equacionar o perfil qualitativo e quantitativo dos álcoois, ésteres, ácidos graxos e aldeídos, com especial atenção para o conteúdo de metanol (que é tóxico) e 2-butanol (responsável por sabores desagradáveis). Entretanto, o corte é ainda feito de forma totalmente empírica, baseado na experiência do mestre alambiqueiro, e sobre as concentrações de álcoois, avaliada por medidas de densidade. O corte entre as frações cabeça e coração é feito tipicamente entre 70 e 80°GL em etanol, enquanto que o corte entre as frações coração e cauda normalmente é feito entre 35 e 50°GL de etanol. Muitas vezes a fração coração é demasiado rica em metanol e, portanto, uma segunda destilação é necessária para reduzir o teor de metanol para dentro das especificações legais. A destilação pode, por sua vez, ser realizada em bateladas ou em modo contínuo. Em ambos os casos é geralmente uma boa prática realizá-la lentamente, de modo a evitar o desenvolvimento de superaquecimentos e consequente degradação térmica do destilado [53, 54].

Vários são os modelos de equipamentos de destilação que existem para destilar os vinhos. Basicamente eles se diferenciam pela forma que o vapor é resfriado (alambique de capelo ou serpentina), pela forma de aquecimento (direto ou indireto), pela presença de deflegmador (aumentando a superfície de contato na coluna e com isso o número de pratos teóricos de destilação) e pelos materiais com que são construídos, variando do tradicional de cobre ao aço inox e até mesmo cerâmico. Existem, atualmente, até mesmo alambiques a baixa pressão, favorecendo o processo de destilação a baixas temperaturas [46, 53, 55]

Nos processos tradicionais de fabricação de cachaça, para a destilação são usados alambiques de cobre, já que este metal favorece a qualidade de aroma e sabor da bebida, provavelmente atuando como catalisador de importantes reações que ocorrem durante a destilação [56]. Mas também, ultimamente, tem sido observado a utilização de bronze, latão, alumínio, aço carbono ou inox para confecção de alambiques [46].

Para obtenção de uma bebida de maior qualidade, os produtos da destilação de aguardente são divididos em três frações: destilado cabeça, coração e cauda (ou água fraca). O destilado de coração, a fração de melhor qualidade, deverá apresentar o teor alcoólico em torno de 45 a 50°GL.

O destilado de cabeça, obtido na fase inicial da destilação, é mais rico em substâncias mais voláteis que o etanol (metanol, certos aldeídos e ésteres), assim como em outros compostos menos voláteis, mas que se encontram envolvidos por moléculas de água e etanol, perdendo assim o seu ponto de ebulição característico (álcoois superiores). Dependendo do aparelho de alambicar e da riqueza em álcool do vinho, os primeiros destilados atingem até 65 a 70°GL [46, 56].

Estes destilados de cabeça e cauda são ricos em compostos tóxicos e indesejáveis; devem ser eliminados, pois são os principais responsáveis pela veisalgia, os efeitos fisiológicos desagradáveis, como a dor de cabeça, que se segue após a uma grande ingestão de bebida alcoólica, popularmente conhecida como “ressaca” [41].

Para que se alcance um produto de qualidade, com um teor de compostos secundários, como ésteres e álcoois superiores, dentro dos limites aceitáveis, é recomendado realizar uma fina regulação do aquecimento do vinho e do resfriamento do vapor. Este perfeito controle, durante toda a destilação, ajustando a fonte de aquecimento e o fluxo de água fria no capelo ou deflegmador, permitirá a obtenção de um produto na graduação alcoólica desejada, com maior rendimento em qualidade e quantidade da fração coração e menores quantidades de cabeça e cauda [16].

Acreditamos que o alambique de capelo ou tromba de elefante simples ou capelo (Figura 2.5) possui um rendimento da fração coração é menor, mas com maior qualidade. A ineficiência do seu sistema de resfriamento permite escapar grande parte das substâncias indesejáveis, mais voláteis, presentes na fração cabeça.

A quantidade de volume que corresponde à fração cabeça depende de diversos fatores como a qualidade da fermentação, o modelo, regulagem e operação do alambique. Normalmente, é considerado pela literatura como cabeça, cerca de 5 a 10% do volume total do destilado ou com teor alcoólico acima de 70°GL [46, 56]. Porém, recomendamos a análise química desta fração, pois em alguns casos uma grande parte dela pode ser até aproveitada, conforme veremos nos resultados obtidos nesta tese.



Figura 2.5 – Alambique de capelo simples.

Já a cauda é considerada pela literatura, e praticado pelos produtores, como 10% do volume total do destilado, com teor alcoólico abaixo de 31°GL [16]. Para melhor rendimento da fração coração deve-se aperfeiçoar o corte do destilado, realizando a análise química da fração cauda.

As contaminações mais severas parecem verificar-se durante a fermentação e durante o processo de destilação. Na destilação do vinho são utilizados tradicionalmente alambiques de cobre porque, segundo muitos autores, o cobre favorece a qualidade da bebida agindo como catalisador de importantes reações de degradação de produtos indesejáveis [56-59]. Quando a destilação ocorre em alambiques de cerâmica ou vidro, por exemplo, o produto torna-se desagradável ao paladar, principalmente, devido ao aumento do teor de produtos de enxofre,

elevando-se também a toxicidade da bebida, provocando, além de mau hálito no bebedor, um grande mal-estar no dia seguinte, a vesalgia. Além de tudo isso, no caso da destilação em alambiques de cobre, pode ocorrer a contaminação com cobre pela formação de uma substância chamada de "azinhavre", $\text{CuCO}_3\text{Cu}(\text{OH})_2$, a qual é solúvel nos vapores alcoólicos [41]. O teor máximo de cobre, na cachaça, permitido pela legislação brasileira em vigor é de 5 mg L^{-1} de aguardente [5].

2.2.3 O envelhecimento

No caminho para obtenção de uma bebida de qualidade, o próximo passo é a armazenagem, que pode ser feita em vasilhas plásticas, de vidro, metal ou madeira. O recomendado para o envelhecimento é em tonéis de madeira, uma vez que este material possui porosidade, o que permite trocas gasosas com o meio externo e o "amadurecimento" da bebida. Porém, as madeiras também incorporam substâncias na bebida por dissolução de alguns componentes. Portanto, os diferentes tipos de madeiras podem influenciar de diferentes formas o aroma e o sabor da cachaça envelhecida [23, 60].

Apesar de inadequado, é muito comum a utilização de reservatórios plásticos para armazenar a cachaça. Estes recipientes são praticamente impermeáveis às trocas gasosas e desfavorecerem o perfeito envelhecimento da bebida. São também bastante perigosos quando sua origem for de vasilhames reutilizáveis de produtos tóxicos, como pesticidas ou produtos de limpeza. Para tanto, o armazenamento em recipientes de vidro ou de aço inox são mais aconselháveis para manter, sem grandes alterações e por maior tempo, as características de um bom destilado.

O envelhecimento não encobre falhas de uma aguardente mal processada, mas o produto de boa qualidade pode ser lapidado, até o ponto de equipará-lo aos melhores destilados do mundo. Segundo o trabalho de Verruma-Bernardi [60] "O envelhecimento a partir dos 48 meses favoreceu o desenvolvimento de alguns atributos sensoriais os quais devem ter contribuído para aceitação das aguardentes".

3 DESENVOLVIMENTO E CONSTRUÇÃO DE BIORREATORES E ALAMBIQUE EM ESCALA SEMI-INDUSTRIAL

3.1 PARTE EXPERIMENTAL

3.1.1 Biorreatores

Previamente foi pesquisada no mercado a existência de biorreatores ou dornas de fermentação em escala semi-industrial com controle de temperatura. Devido à inexistência no mercado de um equipamento que atendesse às necessidades da pesquisa, precisou-se projetar e construir os biorreatores que apresentassem essas características.

O projeto do biorreator foi baseado em consultas prévias aos produtores de cachaça e pesquisadores na área de microbiologia. Os biorreatores, projetados por nosso grupo de pesquisa e financiados pela FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais) foram construídos pela METAINOX (Metalúrgica Vale do Inox Ltda, João Monlevade – MG) em aço inoxidável em formato cilíndrico e de fundo cônico com um volume total de 50 L. O volume do pé de cuba era ajustável, variando de 5 a 15 L, pelo uso de um tubo com anel *o-ring* no fundo da dorna. Foram construídas três dornas para obtenção dos resultados em triplicata (Figura 3.1). O volume útil de cada dorna (40 L, pé de cuba + vinho) foi estabelecido de acordo com a capacidade mínima dos alambiques de cobre semi-industriais existentes no mercado.

O custo total da construção da planta piloto demorou um período de um ano e meio desde sua concepção até sua montagem, ficou orçada em aproximadamente R\$ 20.000,00, valor financiado pelo projeto APQ-01215-09 (“Estudo de alguns aspectos físico-químicos da fermentação e da destilação da aguardente de cana de açúcar (cachaça)”) da FAPEMIG.

As leveduras no processo de fermentação alcoólica possuem metabolismo anaeróbico [61]. Deste modo, as dornas foram desenvolvidas com tampa hermeticamente fechada com lacre d’água e com tubulação para saída de gases, os quais foram borbulhados em uma garrafa com solução alcalina para remoção dos odores e do CO₂. Os biorreatores foram construídos com uma tubulação partindo do centro da dorna e com uma torneira na outra extremidade, de forma a facilitar a

retirada das amostras do mosto/vinho, sem a necessidade de abrir o sistema. Com uma tubulação partindo do fundo de cada dorna, e com um registro na outra extremidade, possibilitou-se a transferência do vinho para o alambique ao final do processo de fermentação.



Todo o sistema foi automatizado com os dados colhidos de um sensor de temperatura (Figura 3.2) instalado no centro de cada biorreator. Desta forma, a temperatura de cada biorreator podia ser controlada de forma independente. O tubo com *o-ring* no fundo de cada dorna permitiu o ajuste do volume do pé de cuba

(porcentagem do volume total da dorna), propiciando maior ou menor quantidade do fermento propagador.



Figura 3.2 – Visão interna do biorreator.

Para a manutenção da temperatura de fermentação, os biorreatores foram construídos dentro de um recipiente cilíndrico, também de aço inox, de forma que pudessem ficar imersos em um banho d'água (Figura 3.3). A água do banho pode ser aquecida com o auxílio de uma resistência no fundo deste recipiente ou resfriada através da troca contínua com água proveniente do refrigerador.



Figura 3.3 – Biorreator com cilindro de banho de controle de temperatura.

O sistema de automatização (Figura 3.4), planejado e construído com auxílio de um técnico eletricitista, pode ser ajustado para uma temperatura máxima e uma

mínima, na quais o aquecimento ou resfriamento podem ser acionados. Este sistema aciona uma série de bombas de sucção, válvulas solenóides, refrigerador ou resistências que promovem o ajuste da temperatura dentro dos biorreatores.



Figura 3.4 – Central de controle de automatização da temperatura.

3.1.2 Alambique

Na carência de um alambique, com características específicas, tornou-se necessário o desenvolvimento de um novo modelo (Figura 3.5) que foi fabricado pela D&R (D&R Alambiques e Cobres Ltda – Belo Horizonte – MG). Neste modelo de alambique a panela e a coluna foram fabricadas em cobre batido e não simplesmente prensado no formato do alambique. Isto permite que haja um aumento da superfície de contato, otimizando a ação catalítica do cobre.

A coluna foi projetada com o formato de gota, muito semelhante aos alambiques para destilação de conhaque e uísque, para facilitar o fluxo do vapor e promover uma melhor separação dos voláteis [56].

Dois acessos, com tampa rosqueada em bronze, para a panela e para a coluna, foram instalados de tal forma a favorecer a limpeza e higienização dessas partes. A panela foi construída com um volume total de 55 L, sendo que destes somente 40 L é o volume útil, cerca de 75% do volume total [16]. O reator ainda possui uma saída para descarregar o vinhoto.

O aquecimento, para facilitar o controle mais fino da temperatura, foi promovido de forma indireta, utilizando-se um banho aquecido por uma resistência elétrica controlado com auxílio de um termostato. O controle da temperatura do reator é feito através de dois termômetros analógicos, instalados na panela e no topo da coluna. Desta forma, acompanham-se as variações da temperatura do líquido na panela e do fluxo de vapor na coluna de destilação.

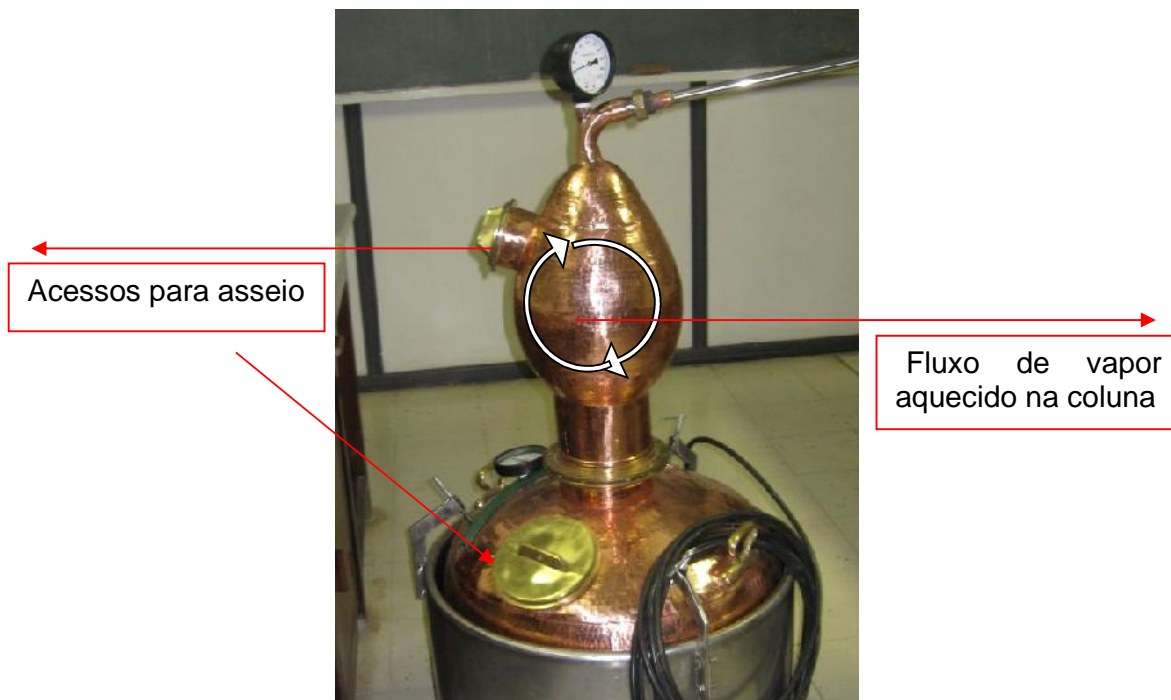


Figura 3.5 – Alambique com aquecimento termostatzado.

A saída do vapor aquecido da coluna foi construída de forma ascendente visando dificultar a eliminação de compostos indesejáveis de cobre, formados na panela ou na coluna do destilador. No alto da coluna uma conexão em bronze, rosqueada, foi conectada à tubulação da serpentina de resfriamento.

O condensador (Figura 3.6) foi construído com um recipiente em aço inox e duas serpentinas intercambiáveis para condensação do vapor, sendo uma em cobre e outra em aço inoxidável. Este arranjo foi feito no sentido de se promover a busca por uma variação no perfil do destilado ao trocar o material do condensador. Porém na presente pesquisa, utilizamos somente a serpentina de aço inox, pois acreditamos que ela reduz a contaminação por cobre na bebida final.



Figura 3.6 – Condensador com as serpentinas em cobre e aço inox.

3.1.3 Realização de fermentações e destilações piloto

3.1.3.1 Fermentações

Olaniran et al. [62] estudaram a influencia da temperatura no perfil de voláteis e qualidade organoléptica de cervejas e obtiveram os melhores resultados para as fermentações (com linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*) conduzidas na temperatura de 22,5°C . Para testar o perfeito funcionamento e otimizar as condições da planta piloto, foram realizadas fermentações, utilizando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 1007, em triplicata de dornas nas temperaturas extremas de 18°C e 28°C.

3.1.3.2 Destilações

Os destilados obtidos nas fermentações a 18°C foram coletados e armazenados em frascos âmbar com tampas plásticas, sendo que as primeiras

28 amostras foram de 50 mL cada, totalizando um volume de 1,4 L de cabeça. Depois foram coletadas 5 amostras de 500 mL, totalizando um volume de 2,5 L de coração e o restante foi coletado novamente em amostras de 50 mL até que cessasse a destilação, perfazendo um total de 0,10 a 0,70 L de volume de cauda.

Já os destilados obtidos nas fermentações a 28°C foram coletados e armazenados em frascos âmbar com tampas plásticas, sendo que as primeiras 12 amostras foram de 50 mL cada, totalizando um volume de 0,6 L de cabeça. Depois foram coletadas de 6 a 8 amostras de 500 mL, totalizando um volume de 3 a 4 L de coração e o restante foi coletado novamente em amostras de 50 mL até que cessasse a destilação perfazendo um total de 0,20 a 0,45 L de volume de cauda.

A destilação teve início numa temperatura de 80°C na coluna e 86°C na panela. O corte de cabeça/coração aconteceu quando a temperatura da panela era de 90°C e da coluna de 89°C. Já o corte de coração/cauda aconteceu quando as temperaturas da caldeira do alambique e da coluna eram de 92°C e 90°C, respectivamente.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1 Fermentação e destilação piloto

A temperatura da fermentação pode influenciar diretamente a qualidade da bebida. Vários estudos relacionam a temperatura de fermentação ao perfil de voláteis de bebidas fermentadas, e neles existe um consenso a respeito das baixas temperaturas de fermentação estarem correlacionados com a obtenção de bebidas de melhor qualidade [42, 62-65]. Porém, as temperaturas relativamente baixas elevam muito o gasto dispensado com a refrigeração das dornas e aumentam também o tempo das bateladas [64].

Diante dos fatos relatados pela literatura e das condições oferecidas pela planta piloto, fixou-se a temperatura mínima de trabalho em 18°C e a máxima em 28°C, pois para temperaturas inferiores o tempo de cada batelada supera 72

horas de fermentação, onerando e inviabilizando o pequeno produtor de realizar tais procedimentos. Já em relação à temperatura superior, fixou-se em 28°C, pois em temperaturas maiores as reações são muito rápidas e aumenta muito a velocidade de escape do CO₂(g). Isso propicia a formação de bolhas que pode causar o transbordamento do mosto. Além disso, há o aumento da fermentação ácida (láctica e acética) pelo favorecimento do desenvolvimento bacteriano [66].

3.3 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados que apresentaremos nos próximos capítulos, concluímos que o teste da planta piloto construída (biorreatores e alambique) serviu para restringir as faixas de trabalho, identificar falhas e corrigí-las a tempo. O uso de um aquecimento indireto proporcionado pelo banho de imersão, além de permitir um controle mais fino da temperatura, diminui a chance de superaquecimento. Isso faz com que a formação de vários compostos indesejáveis seja minimizada.

4 FERMENTAÇÕES COM TEMPERATURA CONTROLADA E DESTILAÇÕES

4.1 PARTE EXPERIMENTAL

Os experimentos foram conduzidos nas instalações do Departamento de Química e do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras, ambos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.1.1 Microrganismos

Para realizar as fermentações foram utilizadas linhagens de leveduras já caracterizadas, isoladas durante fermentações em alambiques, pertencentes à coleção de leveduras do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras (ICB-UFMG). As culturas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* foram: UFMG 1031, UFMG 1007, UFMG RJW23, e uma não *cerevisiae*, a *Schizosaccharomyces pombe* UFMG 521 [36, 67].

4.1.2 Reativação dos inóculos

A linhagem de levedura foi armazenada congelada em GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 0,5%, K_2HPO_4 0,2%) e coberta com glicerina. Antes do uso, esta levedura foi descongelada e pré-ativada no mesmo ágar SCY (caldo de cana autoclavado 50%, glicose 0,5%, extrato de levedura 0,5%, ágar 2% e cloranfenicol 0,01%) a 30°C por 72 horas. As colônias foram coletadas e inoculadas em 200 mL de pré-inóculos (caldo de cana 50% estéril, 8°Brix) em agitador a 30°C e 100 rpm por 24 horas. O pré-inóculo foi inoculado a uma solução estéril (2,5 L de caldo de cana, 1,5 L de água e 200 g de glicose, 10°Brix) e mantida à temperatura ambiente por 24h para produzir o pé de cuba inicial.

4.1.3 Fermentações

A cada uma das três dornas, com as devidas temperaturas de fermentação ajustadas, foram acrescentados 10 L (25% do volume do fermentado) de inóculo ou fermento iniciador.

Colmos inteiros de cana de açúcar, da variedade para colheita tardia, SP 80-1816 foram moídos para a extração do caldo. O caldo extraído foi filtrado em malha fina de aço e diluído com água destilada e deionizada até alcançar 16°Brix medido com um sacarímetro densimétrico de Brix e confirmado com sacarímetro de refratômetro de campo. O caldo foi congelado em volume suficiente para a realização das 3 bateladas. O volume necessário para cada batelada foi descongelado até a temperatura ambiente para que fosse utilizado.

Às dornas, já contendo o pé de cuba com temperatura equilibrada, foram adicionados 30 L do caldo de cana 16°Brix. Iniciou-se a fermentação de cada uma das três dornas com intervalo de 4 horas entre elas para que as destilações não coincidissem com o fim da fermentação da dorna subsequente, evitando-se, com isso, a fermentação ácida.

As temperaturas do mosto foram mantidas a 18°C até o fim da fermentação. Amostras foram coletadas para medir a acidez e o teor de açúcar. No momento que os fermentados atingiram 0°Brix, 30 L de vinho de cada dorna foram transferidos para o alambique e destilados. Os 10 L de vinho restantes (“pé de cuba”) foram mantidos e ajustados à temperatura de 23°C. Quando a temperatura ficou equilibrada, foram acrescidos mais 30 L de caldo à 16°Brix e repetido todo o processo. Depois, o processo foi repetido novamente para a temperatura de 28°C. Como as fermentações foram realizadas em número de três replicatas, e em três temperaturas, para cada linhagem estudada totalizou-se nove fermentações.

Amostras de mosto foram coletadas a 8°Brix e imediatamente resfriadas a 4°C. A seguir, as amostras foram convenientemente diluídas $\times 10^2$, $\times 10^4$ e $\times 10^6$ vezes com solução salina (NaCl 0,9%) estéril e plaqueadas em duplicata sobre o meio SCY (caldo de cana autoclavado 10%, extrato de levedura 0,5%, ágar 2% e cloranfenicol 0,01%), como descrito por Pataro [67]. As placas foram incubadas a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ por 3 a 5 dias, e os diferentes morfotipos foram quantificados e isolados para posterior identificação.

O DNA mitocondrial foi isolado como descrito previamente por Querol e colaboradores [68] e digerido com a enzima Hinf I (Roche Molecular Biochemicals,

Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Hinf I foi escolhida por ter sido considerada a endonuclease de restrição mais adequada para diferenciar linhagens de *S. cerevisiae* [69]. Os fragmentos de restrição foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TBE 0,5X (45 mmol L⁻¹, 1 mmol L⁻¹ Tris-borato, EDTA, pH 8), visualizados sob luz UV e fotografados.

4.1.4 Destilações

A destilação do vinho foi realizada num alambique simples (Figura 4.1), de cobre, com caldeira de 55 L de capacidade útil, com um sistema de aquecimento em banho termostatzado com água e condensador de aço inoxidável, desenvolvido para esta pesquisa.



Figura 4.1 – Alambique termostatzado de cobre com condensador de aço inoxidável.

O banho de imersão para aquecimento da panela do alambique foi composto por uma solução 1:1 glicerina bidestilada/água. A temperatura do banho permaneceu na faixa de 100 a 120°C durante a destilação. A primeira fração de destilado começou a se formar à temperatura de 80°C na coluna e a 86°C na panela. O corte de cabeça/coração aconteceu quando a temperatura da panela era de 90°C e da coluna de 89°C. Já o corte de coração/cauda aconteceu quando as temperaturas da caldeira do alambique e da coluna eram de 92°C e 90°C, respectivamente.

Os destilados obtidos nas fermentações de cada dorna a cada temperatura e tipo de linhagem de levedura foram coletados. As 60 frações coletadas de cada destilação foram armazenadas em temperatura ambiente, em frascos âmbar de 100 mL e com tampas plásticas, até o momento das análises.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para se aproximar ao máximo das condições utilizadas pelos produtores de cachaça, as fermentações foram realizadas sem a esterilização prévia do caldo de cana, fator este que possibilita a contaminação por leveduras selvagens. Levedura contaminante pode ser definida como qualquer levedura presente no processo fermentativo que não seja aquela selecionada para a condução da fermentação; elas podem atuar prejudicando o processo, causando problemas operacionais e/ou aumentando o tempo de fermentação [70].

No trabalho de Basso [71], a maioria das leveduras iniciadoras do processo de fermentação alcoólica cedeu espaço para as leveduras selvagens em um curto período de 20 a 30 dias.

Os mostos obtidos no ponto médio da fermentação iniciada pelas leveduras UFMG 1031, UFMG RJW23 e UFMG 521, nas temperaturas de fermentação de 18 e 23°C, foram inoculados em duplicata de placas. Os experimentos que usaram a linhagem iniciadora UFMG 1031, tiveram suas amostras de mosto diluídas a 10^{-4} e 10^{-6} e plaqueadas. Essas culturas apresentaram 6 morfotipos de colônias diferentes. Observou-se que de um total de 18 colônias isoladas, 13 apresentaram perfil

idêntico ao tipo 3A, o qual se assemelha muito à linhagem matriz de UFMG 1031. As 5 colônias diferentes apresentaram perfis semelhantes aos 1A, 2A e 4A. As colônias de diferentes fenótipos demonstraram, na realidade, fazer parte de 4 genótipos, tomando por base os perfis das bandas formadas na eletroforese do material DNA mitocondrial digerido. Observa-se, então, que as colônias predominantes em quantidade de crescimento possuíram perfil molecular muito similar à linhagem matriz de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 1031, conforme pode ser visualizado na Figura 4.2.

Portanto, o curto período, em torno de uma semana, entre o início das fermentações e as sucessivas propagações não foram suficientes para comprometer a predominância da linhagem UFMG 1031. Com isso pode-se afirmar que os resultados obtidos para os destilados do vinho são característicos desta levedura.

As amostras de mosto coletadas durante a fermentação da linhagem UFMG RJW23 foram diluídas em salina fisiológica a 10^{-4} e 10^{-5} vezes e plaqueadas. As

culturas apresentaram 2 morfotipos de colônias predominantes. Observou-se que de um total de 20 colônias isoladas, pertencentes aos 2 morfotipos diferentes (1B e 2B), todas apresentaram perfil idêntico à linhagem matriz de UFMG RJW23. Os dois morfotipos de colônias demonstraram, na realidade, fazer parte de um genótipo, tomando por base os perfis das bandas formadas na eletroforese do material DNA mitocondrial digerido, conforme se visualiza na Figura 4.3. A linhagem de levedura UFMG RJW23 mostrou-se totalmente predominante durante as bateladas de sua fermentação, validando o perfil químico obtido para os destilados do vinho.

As fermentações usando a linhagem de levedura *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) UFMG 521 demonstraram que ela é menos resistente pelas contaminações por leveduras selvagens. Das amostras de mosto coletadas durante a fermentação da linhagem UFMG 521, diluídas em solução salina fisiológica a 10^{-4} e 10^{-5} vezes e plaqueadas, foram selecionadas 11 colônias pertencentes a dois morfotipos diferentes. Uma classe de morfotipo, na qual foi agrupada 5 colônias diferentes, deu origem ao fenótipo 1C, muito semelhante ao perfil apresentado pelo material genético das mitocôndrias da levedura matriz. Em relação à segunda classe de morfotipo, houve 5 colônias que apresentaram perfil semelhante ao 2C e uma que apresentou perfil semelhante ao 3C.

Observa-se, na Figura 4.4, que as bandas registradas no perfil de restrição de DNA mitocondrial para a linhagem matriz não são marcantes. A provável causa desta característica pode estar na técnica de extração, descrita por Querol e colaboradores [68], já que ela é específica. Essas observações nos levam a crer que as colônias isoladas, pertencentes à segunda classe, são provenientes de contaminações por leveduras selvagens presentes no caldo de cana, e o perfil marcante das suas bandas dos fenótipos 1C e 3C pertencem, provavelmente, a linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

4.3 CONCLUSÃO

O curto período entre o início das fermentações e as sucessivas propagações, mesmo trabalhando com o caldo cana sem ser esterilizado, semelhante ao que acontece com os produtores de cachaça tradicional, não foram suficientes para comprometer a predominância das linhagens UFMG 1031, UFMG RJW27 e até mesmo para *S. Pombe* UFMG 521. Portanto, podemos afirmar que os resultados obtidos para os destilados são característicos para cada levedura em estudo.

**5 MODELAGEM QUIMIOMÉTRICA DAS
FRAÇÕES DE DESTILADO USANDO
ESPECTROS DE MASSAS OBTIDOS POR
IONIZAÇÃO ELECTROSPRAY (ESI-MS)**

5.1 PARTE EXPERIMENTAL

As análises de espectrometria de massas com ionização *electrospray* (ESI-MS) das frações de destilados foram realizadas utilizando um espectrômetro de massas de alta resolução (IT-TOF, Shimadzu, Tóquio, Japão), com precisão de massa <5 ppm no modo negativo. As condições utilizadas foram: voltagem do spray de -3,5 kV; taxa de fluxo de gás nebulizador (N₂) igual a 1,5 L min⁻¹; temperatura da interface (CDL - *Curved Desorption Line*) igual a 200°C; pressão do gás de secagem de 100 kPa e o tempo para acumulação dos íons no octapolo de 100 ms. Os espectros de massas foram obtidos no modo de varredura total dentro do intervalo de *m/z* de 50-500. Uma alíquota (1 mL) foi recolhida de cada fração e transferida para frascos de vidro imediatamente antes das análises por ESI-MS. Esses frascos de vidro foram distribuídos no amostrador automático e 2 µL de cada alíquota inseridos sequencialmente na fonte do espectrômetro de massas. Para evitar a interferência cruzada entre as amostras foi injetado metanol grau HPLC (Merck, Alemanha) a uma taxa de fluxo de 35 µL min⁻¹.

Todos os espectros de massas acumulados para cada amostra foram organizados em tabelas com as intensidades relativas (em porcentagem) de cada razão *m/z*, utilizando o programa Excel Office 2010 Microsoft®. As análises de componentes principais (PCA) e o agrupamento hierárquico de clusters (HCA) foram realizados pelo programa Unscrambler 10.1 CAMO®. A matriz de dados foi organizada com 4502 variáveis (*m/z* 50,00 a 500,00) e 30 casos (amostras).

Para a realização dos cálculos quimiométricos, uma matriz de dados **X** foi construída colocando-se as amostras nas linhas e as respectivas variáveis (*m/z* dos íons) nas colunas. A construção da matriz de dados é mostrada esquematicamente na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

As análises quimiométricas foram realizadas em etapas para as amostras obtidas para cada linhagem de leveduras, de cada dorna e a cada temperatura.

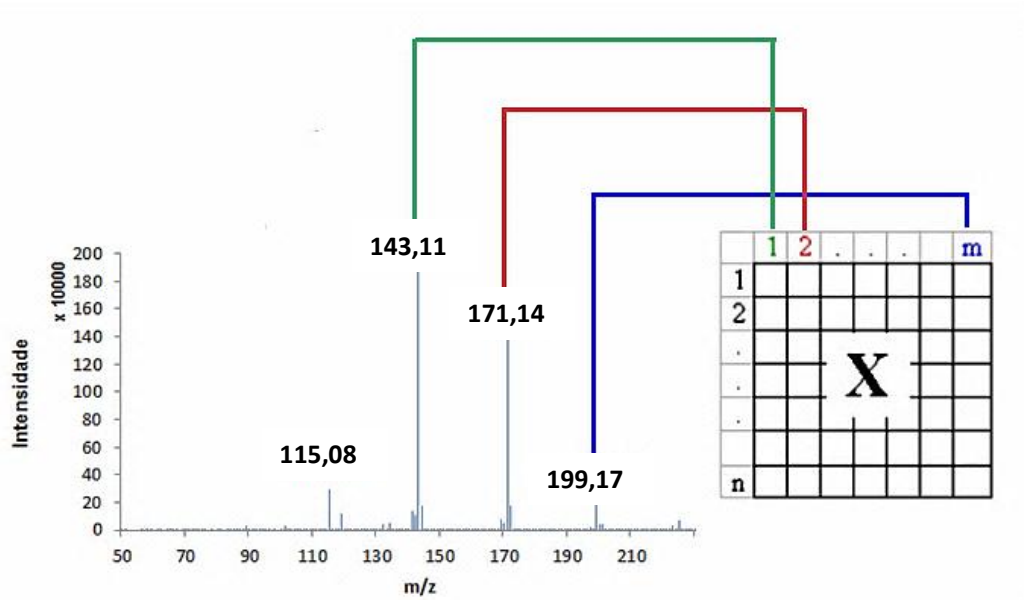
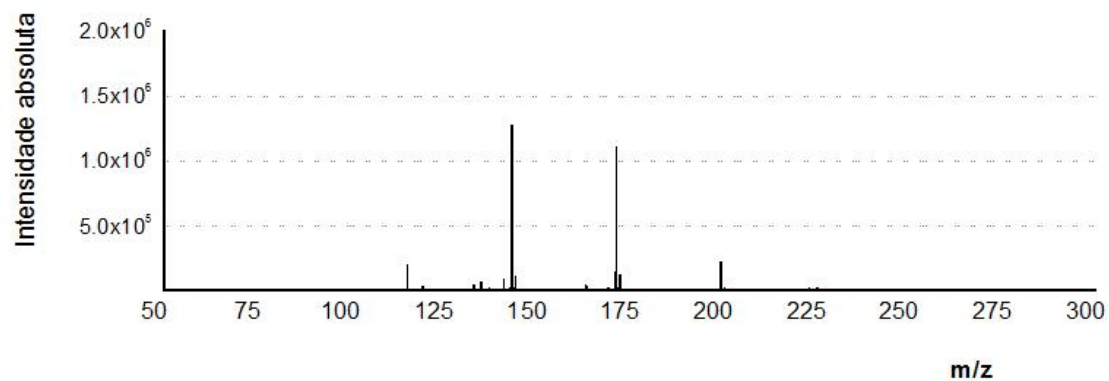


Figura 5.1 - Construção da matriz de dados X a partir dos espectros de massas das amostras.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos últimos anos, vários estudos relatam a obtenção de impressões digitais de um conjunto de amostras, tomando por base a espectrometria de massas com ionização *electrospray* (ESI-MS). As amostras são analisadas diretamente, sem pré-tratamento ou separação cromatográfica [57, 72-76]. Esta metodologia tem mostrado ser rápida e confiável e, quando utilizada em combinação com tratamentos quimiométricos, como as técnicas de análise multivariada PCA e HCA, revela-se uma ferramenta importante, especialmente como método não supervisionado para análise exploratória. Por exemplo, esta metodologia proporcionou uma forma simples, rápida e precisa na diferenciação de cachaça artesanal brasileira envelhecida em quatro grandes tonéis feitos com madeiras diferentes: amburana, bálsamo, jequitibá e carvalho [72]. Esta metodologia foi também aplicada com sucesso para distinguir entre as amostras de cachaça industrial e artesanal e na diferenciação de rum e cachaça, duas bebidas alcoólicas muito semelhantes, ambas derivadas da cana de açúcar. Além disso, a caracterização de amostras de cachaça adulterada pela adição de

caramelo e outras substâncias, tais como corantes, foi eficazmente realizada pelo nosso grupo de pesquisa [57, 73].



Uma vez que as frações (cabeça, coração, cauda), obtidas da destilação de vinho de cana de açúcar, têm composições químicas provavelmente diferentes, os espectros de massas resultantes destas frações, que se constituem

verdadeiras impressões digitais destas amostras, podem ser utilizados para classificá-las.

A Figura 5.2 representa exemplos de espectros de massas obtidos por ionização *electrospray* no modo negativo (ESI(-)-MS) das frações coração, cabeça e cauda resultantes da destilação do vinho fermentado de cana de açúcar. Os ânions de razão massa/carga (m/z) 115,08; 143,11; 171,14 e 199,17 são os mais intensos nestes espectros de massas. Esses quatro ânions referem-se às formas desprotonadas de alguns ácidos orgânicos de cadeia longa (hexanóico, octanóico, decanóico e dodecanóico, respectivamente). Estes pressupostos foram confirmados por meio de medições de massa de alta resolução, contando com um erro máximo de 4,33 ppm entre as massas experimentais observadas e as massas teóricas exatas esperadas para tais espécies aniônicas. Além disso, vários autores já relataram a presença de alguns desses ácidos em processos de fermentação para a produção de cerveja, vinho e até cachaça [74, 75, 77, 78]. Apenas mudanças sutis nas intensidades relativas destes ânions podem ser observadas nos espectros de massas, fato que dificulta uma diferenciação rápida entre as frações por uma simples inspeção visual.

Em vista dessas dificuldades e buscando fornecer uma avaliação mais abrangente dos resultados, os dados de MS foram tratados usando a metodologia de Análise de Componentes Principais (PCA). Para realização da PCA, inicialmente as intensidades absolutas das massas, organizadas em uma matriz de dados, foram pré-processadas. Já que o pré-processamento Centrado na Média é o mais indicado para dados de origem espectrais, optou-se, portanto, por esse método [79]. Os cálculos de PCA geraram um modelo em que os dois primeiros componentes principais foram capazes de explicar cerca de 97% da variância total.

É apresentado na Figura 5.3 o gráfico com as duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2). A primeira componente (PC1) foi responsável pela diferenciação entre as amostras de cauda (21-30) e do coração (11-20), que formam claramente dois grupos distintos e homogêneos. A distinção entre as amostras de cabeça 4-10 (Grupo cabeça II) das demais frações (coração e

cauda) foi amparada pela segunda componente (PC2). Nota-se, no entanto, que as amostras cabeça 1-3, que constituem um agrupamento separado denominado cabeça I, foram alocadas distantes do grupo principal (cabeça II). Estas três amostras de cabeça foram as primeiras a serem recolhidas e, por conseguinte, é razoável supor que as suas composições químicas são suficientemente distintas em relação às outras a partir da mesma fração. Talvez por razões semelhantes, as amostras do agrupamento cabeça 2 (4-10) foram colocadas próximas ao grupo da fração de coração.

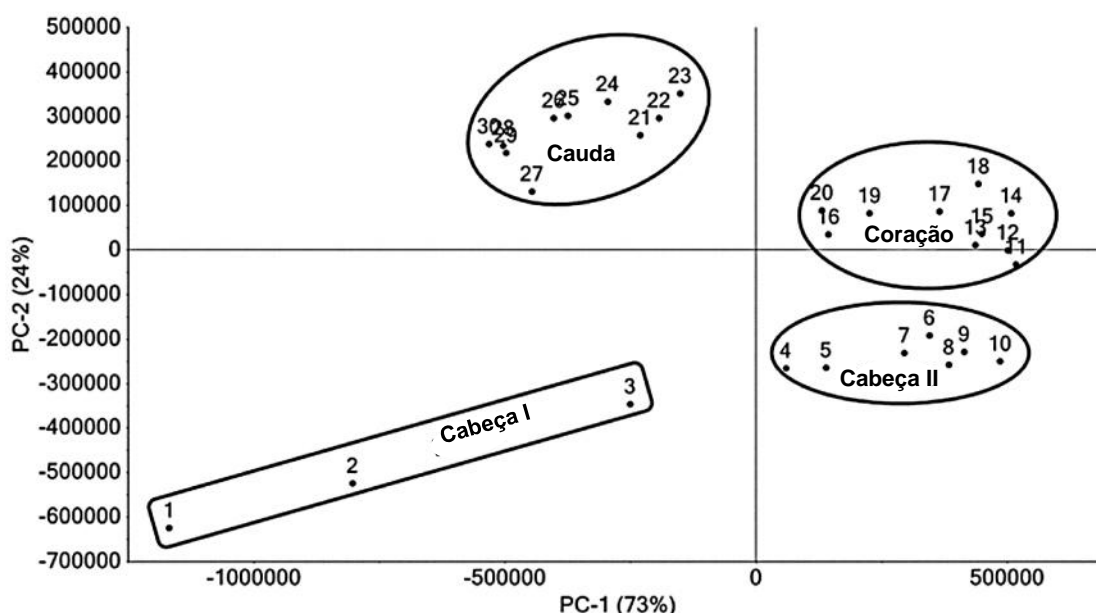


Figura 5.3 – Gráfico de escores para componentes principais (PC1 e PC2) construído a partir dos dados de ESI (-)-MS das alíquotas recolhidas na destilação do vinho fermentado da cana.

O gráfico de pesos para PC1 e PC2, mostrado na Figura 5.4, indica que o ânion de m/z 171,14 é o principal responsável pelo agrupamento das amostras promovido pela componente PC1, realizando a separação das frações coração e cabeça II dos agrupamentos cauda e cabeça I. O ânion 171,14 contribui positivamente na definição das frações coração e cabeça II. Por outro lado, os ânions de m/z 115,08; 143,11; 199,17 e 171,14 são os responsáveis de maior

peso na definição da componente PC2 promovendo a separação das amostras cabeça I e II dos demais grupos. Os ânions 199 e 171 contribuem negativamente, enquanto os íons 115,08 e 143,11 são os que mais contribuem positivamente para a discriminação dos grupos cauda e coração. As maiores intensidades do ânion 199,17 e 171,14 são encontradas nas frações cabeça II e coração. Em relação ao ânion 143 as maiores concentração são registradas nas frações cauda.

Os ânions, 115,08; 143,11; 171,14 e 199,17 pertencem a uma série homóloga de ácidos carboxílicos desprotonados, tornam-se compostos de diagnóstico que permitem a distinção entre as frações de cabeça, coração e cauda obtidas da destilação do caldo de cana fermentado. Aqueles ânions de menor massa, portanto mais solúveis em água contribuíram de forma positiva na definição da fração cauda. Já os ânions de massa ligeiramente maiores contribuíram de forma positiva na definição das frações cabeça.

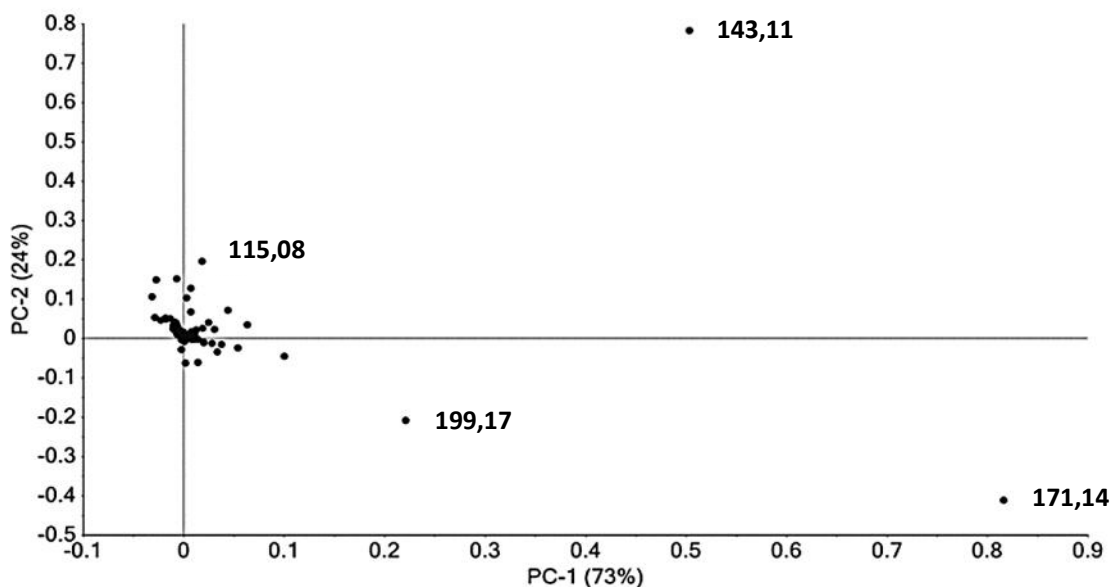


Figura 5.4 – Gráfico de pesos as duas componentes principais (PC1 e PC2), construído a partir dos dados ESI (-)-MS das alíquotas recolhidas no decurso da destilação do vinho fermentado da cana.

Para o cálculo da HCA, se utilizou somente as variáveis com intensidades superiores a 1% do íon de intensidade máxima. Os valores absolutos dos

espectros de MS foram organizados em uma matriz de dados com as 938 variáveis de maior intensidade e 30 amostras.

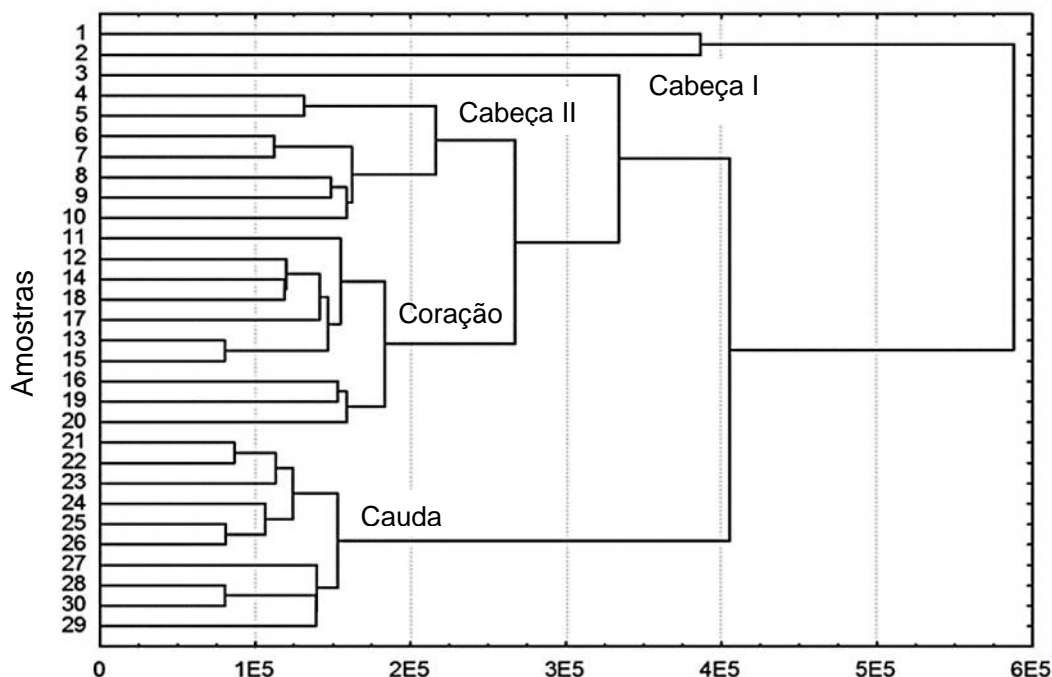


Figura 5.5 – Dendrograma (HCA) construído a partir dos espectros de ESI (-)-MS das alíquotas recolhidas na realização da destilação do vinho fermentado da cana.

Tal como esperado, os resultados obtidos pelo método HCA foram bastante semelhantes aos obtidos pela metodologia PCA. No diagrama representado na Figura 5.5, as amostras foram agrupadas, sem o uso simultâneo de PCA, por ligações simples entre as distâncias euclidianas (não estandarizado). Nesse diagrama, as amostras das frações cauda e coração formaram dois grupos diferentes e as amostras de cabeça, no entanto, se dividiram em dois grupos distintos: cabeça I (amostras 1-3) e cabeça II (amostras 4-10).

O estabelecimento de um eficiente corte da fração cabeça é uma das principais garantias de excelência na qualidade da cachaça. Na produção de uísque destilado em bateladas, segundo Nicol [80], o ponto correto para se

realizar o corte da transição da fração cabeça para a fração coração é definido não só através do monitoramento do teor alcoólico nas porções do destilado (a fração cabeça geralmente compreende um teor de álcool de 75 a 85% v/v), mas também pode ser aplicado o chamado teste de “desembaçamento”. Para a realização deste ensaio, uma alíquota do destilado recém-destilado é diluída em água até que se alcance um teor alcoólico de 47,5% v/v. Se a turbidez for detectada nesta alíquota, ela deverá então ser classificada como fração cabeça, caso contrário será considerado como destilado coração. Este teste baseia-se no fato de que a fração cabeça, que possui elevado teor alcoólico, é capaz de remover continuamente os ácidos carboxílicos e os ésteres de cadeia longa (moléculas que possuem baixa solubilidade em água, mas uma elevada solubilidade em etanol), que ficam aderidos à superfície interior do alambique, deixados durante a destilação da fração cauda da batelada anterior.

As definições de Nicol [80], abordadas no parágrafo anterior, podem, portanto, ser igualmente utilizadas para explicar a separação da fração cabeça em dois grupos tão bem definidos, como observado nos resultados dessa pesquisa. Esta divisão, promovida pela PC1 e confirmada pela HCA, indicam que, embora as amostras do primeiro grupo (cabeça I) possuam características únicas, o segundo grupo (cabeça II) está estreitamente relacionado com a fração de coração (Figura 5.3 e **Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Estes resultados sugerem fortemente que, enquanto a fração de cabeça é constituída quase que exclusivamente pelas primeiras três alíquotas recolhidas (que representam 5% v/v do volume total do destilado), a fração de coração compreende uma proporção mais elevada (em torno de 78% v/v do volume total do destilado) do que normalmente preconizada por vários autores [16, 28, 56, 81]. Portanto, os resultados apresentados aqui apontam para a obtenção de rendimentos mais elevados de cachaça sem comprometer a qualidade da bebida final.

As análises também foram realizadas para os espectros de massas obtidos para os íons positivos; no entanto, os espectros ESI(-)-MS mostraram-se mais limpos e, devido a este fato, foram selecionados para o tratamento quimiométrico.

Finalmente, os resultados aqui apresentados são bastante reprodutíveis, uma vez que o tratamento dos dados de ESI(-)-MS para as outras duas bateladas de destilações mostraram uma tendência idêntica. As duas primeiras componentes principais dos modelos para as outras duas destilações foram capazes de explicar cerca de 95% (PC1 57% e PC2 38%) e 93% (PC1 62 e PC2 31%) da variância total. Comportamento idêntico também foi observado para o agrupamento das frações de destilação encontradas no tratamento quimiométrico e os íons responsáveis por esse ajuntamento.

De forma preliminar, as amostras coletadas nos experimentos piloto foram analisadas utilizando um espectrômetro de massas com ionização *electrospray* (ESI-MS) de menor resolução, modelo LCQ Fleet (Thermo Scientific Corporation, Austin, TX, USA) e os resultados obtidos foram semelhantes aos relatados anteriormente, por isso optou-se por não apresentá-los nesta tese.

5.3 CONCLUSÕES

A utilização de metodologia que aplique estratégias simples, rápidas e confiáveis para a discriminação entre grupos de amostras tem se tornado cada vez mais importante. Assim, a espectrometria de massas com ionização *electrospray* foi aplicada, pela primeira vez, para caracterizar as frações (coração, cabeça e cauda) obtidas a partir da destilação de vinho fermentado de cana. Os dados dos ESI(-)-MS tratados por PCA e HCA permitiram uma discriminação rápida e confiável entre frações do destilado. Vale ressaltar que na presente metodologia não há necessidade de complexos pré-tratamentos das amostras e/ou etapas de separação. A definição precisa dos pontos de corte de cada fração, como explicitamente descrito aqui, pode vir a ser importante para os produtores rurais que visam fabricar cachaça tradicional com uma qualidade superior.

**6 PERFIL SEMIQUANTITATIVO DE ALGUNS
VOLÁTEIS NAS FRAÇÕES DE DESTILADOS
E SUA RELAÇÃO COM A LINHAGEM E
TEMPERATURA DE FERMENTAÇÃO**

6.1 PARTE EXPERIMENTAL

6.1.1 Materiais

Para a realização dos experimentos envolvidos neste trabalho foram utilizados materiais e equipamentos, os quais estão listados na Tabela 6.1, e os reagentes descritos na Tabela 6.2.

Tabela 6.1 – Materiais e equipamentos utilizados no desenvolvimento do método de análise do perfil de voláteis nas frações do destilado de cachaça

Material	Marca / Descrição
Balança analítica	Ohaus corporation (New Jersey, USA) / Adventurer Pro AV264CP
Agitador de tubos	Phoenix / (Tipo Vortex) Modelo AP56
Frascos	Thermo Scientific / Vials volume 2 ml com rosca 8-425, 12x32 mm
Micropipetas de 10, 100, 1000 μ L	Thermo Scientific / Micropipetas Finnpiptette
Cromatógrafo a gás com detector de espectrometria de massas	Shimadzu Corporation (Tokyo, Japan) / GC-2010-Plus-MS-QP2010SE
Seringa para CG com guia	Hamilton / Micro seringa série 1700 de 10 μ L com guia Exmire
Milli-Q	Millipore (Molsheim, France) / purificador de água Ultra-pure Milli-Q

Tabela 6.2 – Reagentes utilizados no desenvolvimento do método de análise do perfil de voláteis em frações do destilado do vinho de cana.

Reagente	Grau de Pureza	Marca	Validade
Padrão de 2-metilbutan-1-ol	99%	Sigma Aldrich	29/08/15
Padrão de 3-metilbutan-1-ol	99%	Sigma Aldrich	03/08/15
Padrão de 5-hidroximetilfurfural	99%	Sigma Aldrich	13/10/15
Padrão de acetaldeído	98,5%	Sigma Aldrich	08/07/13
Padrão de acetato de etila	99,9%	Sigma Aldrich	30/05/13
Padrão de acetato de hexila	99,7%	Sigma Aldrich	29/01/12
Padrão de acetato de isobutila	99,8%	Sigma Aldrich	10/04/13
Padrão de ácido acético	99,8%	Sigma Aldrich	11/04/13
Padrão de ácido decanóico	99,5%	Sigma Aldrich	14/03/12
Padrão de ácido dodecanóico	99,5%	Sigma Aldrich	09/11/11
Padrão de ácido octanóico	99,5%	Sigma Aldrich	20/07/13
Padrão de álcool alílico ou propílico	99%	Sigma Aldrich	26/08/14
Padrão de benzaldeído	99,5%	Sigma Aldrich	13/07/11
Padrão de benzoato de etila	99%	Sigma Aldrich	27/05/15
Padrão de butan-1,4-diol	99%	Sigma Aldrich	24/09/12
Padrão de butan-1-ol	99,9%	Sigma Aldrich	13/07/12
Padrão de (+/-) butan-2-ol	99,8%	Sigma Aldrich	02/05/12
Padrão de butanoato de propila	99%	Sigma Aldrich	28/09/15
Padrão de butiraldeído	99%	Sigma Aldrich	11/08/11
Padrão de carbamato de etila	99%	Sigma Aldrich	26/12/15
Padrão de carbamato de metila	98%	Sigma Aldrich	08/06/11
Padrão de decan-1-ol	99,5%	Sigma Aldrich	18/03/13
Padrão de dimetilssulfóxido (DMSO)	99,9%	Sigma Aldrich	18/05/15
Padrão de dodecan-1-ol	98,5%	Sigma Aldrich	03/12/12
Padrão de 2-furfuraldeído	99%	Sigma Aldrich	03/11/14
Padrão de geraniol	99%	Sigma Aldrich	02/02/12
Padrão de heptanoato de etila	99%	Sigma Aldrich	26/10/15
Padrão de hexadecan-1-ol	99,5%	Sigma Aldrich	13/07/13
Padrão de hexadecanoato de etila	99%	Sigma Aldrich	24/02/11
Padrão de hexanoato de etila	99%	Sigma Aldrich	06/04/11
Padrão de isobutanol	99,8%	Sigma Aldrich	05/05/13
Padrão de mentol	99%	Sigma Aldrich	17/05/15
Padrão de metanol	99,9%	Sigma Aldrich	24/06/12
Padrão de nonoato de etila	98%	Sigma Aldrich	05/06/16
Padrão de octanoato de etila	99%	Sigma Aldrich	30/01/15
Padrão de pentadecanoato de etila	96%	Sigma Aldrich	05/03/14
Padrão de pentan-1-ol	99,8%	Sigma Aldrich	02/03/12
Padrão de pentanoato de etila	99,7%	Sigma Aldrich	11/05/12
Padrão de propan-1-ol	99,9%	Sigma Aldrich	22/03/13
Padrão de propan-2-ol	99,9%	Sigma Aldrich	01/08/12
Padrão de propanoato de pentila	98%	Sigma Aldrich	09/02/11
Padrão de propionato de metila	99,8%	Sigma Aldrich	30/03/12
Padrão de tetradecan-1-ol	99%	Sigma Aldrich	20/10/13
Padrão de tetradecanoato de etila	99%	Sigma Aldrich	19/08/14
Padrão de undecanoato de etila	97%	Sigma Aldrich	30/10/11
Padrão de valeraldeído	97%	Sigma Aldrich	08/09/15
Etanol grau HPLC	99,9%	Merck	

6.1.2 Coleta das amostras

Devido ao grande número de amostras a ser analisado e também pela elevada frequência analítica, optou-se por unir as frações duas a duas. Por exemplo, transferiu-se para um frasco de vidro de 2 mL com septo de silicone revestido de politetrafluoretileno um volume de 0,490 mL da 1ª alíquota, 0,490 mL da 2ª alíquota coletadas do destilado e 0,020 mL de 4-metilpentan-2-ol 1 mg L^{-1} (padrão interno) em etanol/água 40:60 v/v (40°GL). Homogeneizou-se por 30 segundos e rotulou-se.

6.1.3 Preparação das soluções dos padrões e curva analítica

Uma solução de 40% de etanol grau HPLC em água ultrapura Milli-Q foi preparada para mimetizar a matriz da cachaça. Soluções estoques de cada padrão 1000 mg L^{-1} foram preparadas, utilizando como solvente água/etanol 60:40 v/v. Todas as soluções foram armazenadas em geladeira.

Após realizar os ensaios cromatográficos para otimização das condições, a quantificação de alguns compostos foi abandonada, seja por dificuldades relacionadas à falta de repetitividade dos seus picos ou pela proximidade de seus tempos de retenção em relação à faixa de corte do solvente (etanol/água).

As soluções para os pontos da curva analítica foram preparadas para um conjunto de analitos (Tabela 6.3). A cada frasco contendo 0,980 mL da mistura com o conjunto de analitos foi acrescentando, com auxílio de uma micropipeta, 20 μL da solução estoque de 4-metilpentan-2-ol 1000 mg L^{-1} (padrão interno). O 4-metilpentan-2-ol foi escolhido como padrão interno já que satisfaz as condições de ser similar às substâncias que serão quantificadas, sua presença não é comum nas amostras de cachaça, apresenta tempo de retenção e concentração próximos dos obtidos para os analitos e tem bem definido seu pico cromatográfico ao final da corrida, sem proporcionar co-eluições [82]. O 4-metilpentan-2-ol foi eleito como padrão interno por diversos autores na quantificação de voláteis em bebidas [13, 83].

As misturas de padrões correspondentes aos pontos da curva analítica foram armazenadas em geladeira e foram utilizadas pequenas frações em prazo máximo de uma semana

Tabela 6.3 – Analitos e suas concentrações para construção da curva de calibração

ANALITOS	m/z do íon Monitorado		Tempo de retenção	PONTOS DA CURVA (em mg 100 mL ⁻¹ de álcool anidro)							
	Quant.	Confir.		1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º
Butanal	44	43	5,625	0,0025	0,0125	0,0250	0,0625	0,1250	0,2500	0,6250	1,2500
Acetato de etila	43	29 e 45	6,109	0,0025	0,0125	0,0375	0,0750	0,1000	0,1500	0,2000	0,2200
Propionato de metila	88	57	6,325	0,0025	0,0125	0,0250	0,0625	0,1250	0,2500	0,6250	1,2500
Acetato de Isobutila	56	56	9,771	0,0025	0,0250	0,1250	0,5000	1,2500	2,5000	5,0000	10,0000
Butan-2-ol	45	31	10,163	0,0025	0,0250	0,1250	0,5000	1,2500	2,5000	5,0000	10,0000
Propan-1-ol	29	42	10,801	0,0025	0,0125	0,0250	0,0500	0,1000	0,1250	0,1500	0,2000
Isobutanol	41	71	12,538	0,0025	0,0125	0,0250	0,0500	0,1000	0,1500	0,2000	0,2500
Butanoato de Propila	71	89	12,938	0,0025	0,0250	0,1250	0,5000	1,2500	2,5000	5,0000	10,0000
Pentanoato de etila	88	29 e 85	13,321	0,0025	0,0050	0,0075	0,0100	0,0125	0,0150	0,0200	0,0250
Butan-1-ol	56	31	14,725	0,0025	0,0250	0,1250	0,5000	1,2500	2,5000	5,0000	10,0000
Propanoato de pentila	29	57	15,071	0,0025	0,0125	0,0250	0,0625	0,1250	0,2500	0,6250	1,2500
4-metilpentan-2-ol	45		15,379	0,0500	0,0500	0,0500	0,0500	0,0500	0,0500	0,0500	0,0500
Hexanoato de etila	88	29	17,071	0,0025	0,0125	0,0250	0,0500	0,1000	0,1500	0,2000	0,2500
2-metilbutan-1-ol	57	56	17,123	0,0025	0,0063	0,0125	0,0250	0,0500	0,0750	0,1000	0,1250
3-metilbutan-1-ol	55	42	17,338	0,0025	0,0063	0,0125	0,0250	0,0500	0,0750	0,1000	0,1250
Pentan-1-ol	70	42 e 55	18,975	0,0025	0,0250	0,1250	0,2500	0,6250	1,2500	2,5000	5,0000
Acetato de hexila	56	43	19,242	0,0025	0,0125	0,0250	0,0625	0,1250	0,2500	0,6250	1,2500
Heptanoato de etila	88	43	22,204	0,0025	0,0250	0,1250	0,5000	1,2500	2,5000	5,0000	10,0000
Octanoato de etila	101	88 e 57	26,163	0,0013	0,0025	0,0050	0,0125	0,0250	0,0625	0,1250	0,2500
Furfural	96	95	27,550	0,0025	0,0125	0,0250	0,0625	0,1250	0,2500	0,6250	1,2500
Nonoato de etila	88	101	28,700	0,0025	0,0125	0,0250	0,0625	0,1250	0,2500	0,6250	1,2500
Benzaldeído	77	106	28,950	0,0025	0,0125	0,0250	0,0625	0,1250	0,2500	0,6250	1,2500
DMSO	78	63	30,071	0,0025	0,0250	0,1250	0,5000	1,2500	2,5000	5,0000	10,0000
Mentol	81	71	30,846	0,0025	0,0125	0,0250	0,0500	0,1250	0,1875	0,2500	0,5000
Carbamato de etila*	62	44	31,446	1	10	50	100	250	500	1000	2000
Benzoato de etila	105	77	31,438	0,0025	0,0125	0,0250	0,0625	0,1250	0,2500	0,6250	1,2500
Undecanoato de Etila	88	101	32,046	0,0025	0,0125	0,0250	0,0625	0,1250	0,2500	0,6250	1,2500
Decan-1-ol	55	43	32,305	0,0025	0,0250	0,1250	0,2500	0,6250	1,2500	2,5000	5,0000
Geraniol	41	69	33,229	0,0025	0,0250	0,1250	0,5000	1,2500	2,5000	5,0000	10,0000
Butan-1,4-diol	31	42	33,991	0,0025	0,0125	0,0250	0,0625	0,1250	0,2500	0,6250	1,2500
Dodecan-1-ol	43	55	34,325	0,0025	0,0250	0,1250	0,2500	0,6250	1,2500	2,5000	5,0000
Tetradecanoato de etila	88	101	35,146	0,0025	0,0250	0,1250	0,2500	0,6250	1,2500	2,5000	5,0000
Pentadecanoato de etila	88	101	36,209	0,0025	0,0050	0,0075	0,0100	0,0125	0,0150	0,0200	0,0250
Tetradecan-1-ol	55	43	36,454	0,0025	0,0250	0,1250	0,2500	0,6250	1,2500	2,5000	5,0000
Hexadecanoato de etila	88	101	37,554	0,0025	0,0050	0,0075	0,0100	0,0125	0,0150	0,0200	0,0250
Hexadecan-1-ol	69	55	39,400	0,0025	0,0250	0,1250	0,2500	0,6250	1,2500	2,5000	5,0000

* A concentração do carbamato de etila é em µg L⁻¹ de destilado.

6.1.4 Definição de parâmetros instrumentais

As análises das frações foram realizadas utilizando um cromatógrafo a gás com detector de Espectrometria de Massas (GC-MS), modelo GC-2010-Plus-MS-QP2010SE (Shimadzu). Para as análises, foram usadas as seguintes condições:

- Para a cromatografia gasosa, utilizou-se uma coluna capilar polar HP-INNOWAX de 60 m x 32 mm e 0,50 μm de espessura do filme; o modo de injeção sem divisão de fluxo (*splitless*); a temperatura do injetor 250°C e com um fluxo total de gás de 10 mL min^{-1} . O aquecimento do forno iniciou com a temperatura de 40°C e seguiu a rampa descrita na Figura 6.1. No

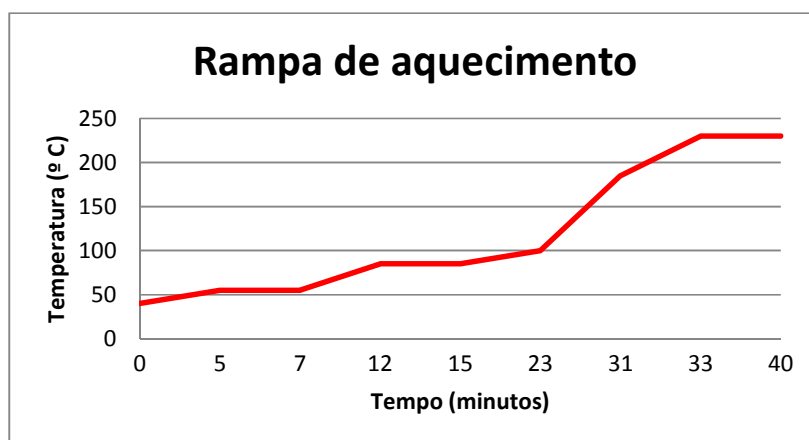


Figura 6.1 – Rampa de aquecimento do forno do CG-MS.

espectrômetro de massas o ajuste da temperatura para a fonte de íons foi de 230°C e para a interface foi de 270°C. O tempo de espera para ligar a fonte de íons foi de 1,5 minutos após a injeção no sistema cromatográfico e o tempo total da corrida foi de 39,70 minutos. De forma a evitar saturações do detector ou a realização de diluições da amostra para as quantificações de alguns analitos, optou-se por ajustar a intensidade de ganho do detector conforme a Tabela 6.4. **Tabela 6.4 – Programa de ajuste de ganho do detector**

Tempo (minutos)	Comando
6,80	Desligar o filamento
9,10	Ligar o filamento
16,80	Ganho do detector em 80%
17,80	Ganho do detector em 100%
26,10	Ganho do detector em 80%
27,35	Ganho do detector em 100%
28,80	Ganho do detector em 80%
29,10	Ganho do detector em 100%

- A programação do detector foi dividida em vários eventos com detecção no modo *full scan* e *single ion* para cada intervalo de tempo da corrida cromatográfica. Foram selecionados 2 ou 3 íons para cada analito, sendo um, o de maior sinal analítico, utilizado para quantificação e o outro para validação.

6.1.5 Programas para tratamento dos dados

Todos os cromatogramas foram tratados com o programa *GCMS-Solution* da Shimadzu® e organizados em tabelas e gráficos utilizando o programa Excel Office 2010 Microsoft®.

6.1.6 Tratamento dos dados

Para explicar os resultados, somente os analitos que estavam presentes em todas as linhagens de leveduras e temperaturas de fermentação foram considerados.

Em decorrência do grande número de dados, considerou-se, como fração cabeça, as três primeiras alíquotas de destilado dos vinhos fermentados nas 3 dornas. A fração coração foi considerada como compreendendo as alíquotas 15, 16 e 17, as quais correspondem ao ponto médio do destilado. E, como fração cauda, foram consideradas as últimas três alíquotas de destilado. Cada alíquota proveniente de cada dorna foi analisada por GC-MS e valores médios para as concentrações dos voláteis foram listados para cada fração. Deste modo, nove análises de GC-MS foram realizadas para cada fração.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com o INMETRO [84], conforme descrito nas Equações 6.1 e 6.2.

Equação 6.1

$$LD = X + 3.s$$

Equação 6.2

$$LQ = X + 10.s$$

Onde: X = média das 10 amostras do branco;
 s = desvio padrão de 10 amostras do branco.

A incerteza foi baseada no intervalo de confiança e foi calculada com nível de confiança de 95%, conforme a Equação 6.3.

Equação 6.3

$$\text{Incerteza} = \pm 1,96 \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Onde: n = quantidade de amostras;
 s = desvio padrão de amostras.

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.2.1 Resultados cromatográficos

O perfil cromatográfico das alíquotas demonstrou um comportamento típico, conforme visualizado nos cromatogramas selecionados (Figura 6.2), sendo representativo para cada fração do destilado (cabeça, coração e cauda). O resultado representado pela fração cabeça corresponde à média obtida das três replicatas de fermentação e para as concentrações das três primeiras amostras. O perfil representado pela fração coração corresponde à média das três replicatas de fermentação e para as concentrações das três amostras centrais. E resultado da fração cauda corresponde à média das três replicatas de fermentação e para as concentrações das três últimas amostras. O perfil de voláteis diminuiu sua

intensidade à medida que as alíquotas reduziram o seu teor alcoólico, característica esta já observada e relatada em outros trabalhos [85, 86].

O resultado da detecção dos analitos, através da espectrometria de massas, permitiu a identificação e quantificação destes, mesmo quando houve co-eluição,

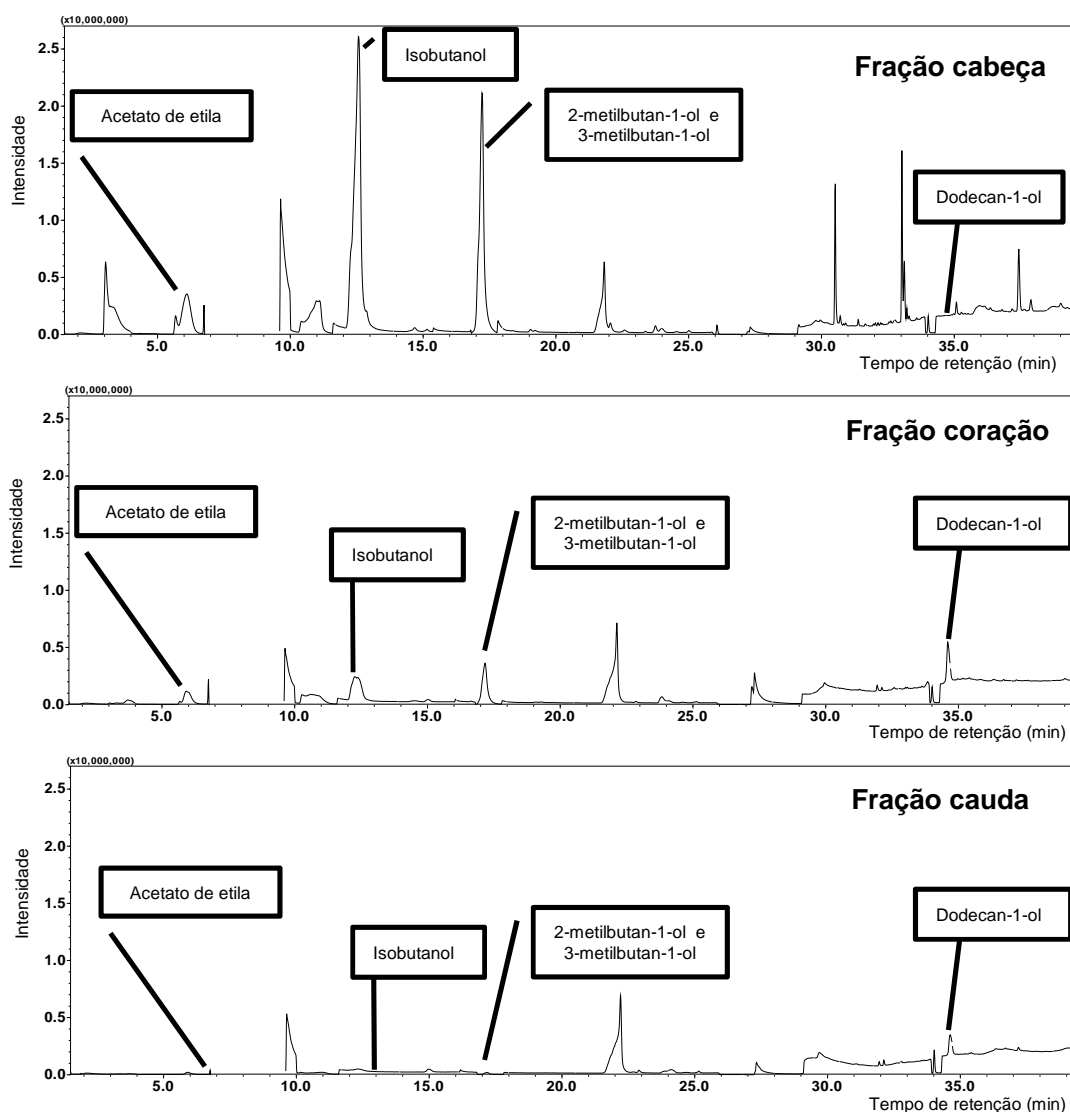


Figura 6.2 – Cromatogramas de alíquotas de destilados típicos das frações cabeça, coração e cauda.

evitando, assim, ambiguidades e resultados duvidosos, conforme discutido por Cardeal e coautores [87]. Um exemplo bem característico pode ser visualizado na Figura 6.3, onde temos a ampliação dos cromatogramas próximo ao tempo de

retenção do 2-metilbutan-1-ol e do 3-metilbutan-1-ol. A legislação brasileira define os valores máximos permitidos para o conjunto dos analitos e não para cada um dos mesmos, pela dificuldade de se quantificar estes isômeros isoladamente por outros meios de detecção que não seja a espectrometria de massas. Nos cromatogramas abaixo, no modo *full scan*, há a presença de um único pico cromatográfico. No entanto, a análise foi conduzida no modo *SIM*, e os íons que caracterizam cada analito são diferentes (m/z 57 para o 2-metilbutan-1-ol e m/z 55 para o 3-metilbutan-1-ol), permitindo a diferenciação dos picos cromatográficos para cada um destes analitos. Assim, a determinação do teor total dos analitos em amostras de cachaça utilizando GC-MS mostrou ser factível em uma análise de rotina, permitindo uma desejável especificação dos analitos [83].

De forma preliminar, as amostras da fração coração coletadas nos experimentos piloto foram analisadas e, como os resultados obtidos foram

semelhantes aos que serão mostrados, optou-se por não apresentá-los nesta tese.

6.2.2 Influência da temperatura de fermentação e da linhagem de levedura no perfil de alguns voláteis

Como amplamente conhecido, a formação de compostos do aroma (ésteres, álcoois superiores, aldeídos, ácidos graxos, entre outros) sofre forte influência das espécies ou linhagens de leveduras na fermentação de diferentes bebidas alcoólicas, tais como vinho, cerveja, uísque, conhaque e rum [35, 36, 38, 39, 44, 68, 69, 88-90]. Como consequência, a temperatura de fermentação e a linhagem da levedura são apontadas como os fatores que mais influenciam o sabor das bebidas alcoólicas.

O acompanhamento de algumas substâncias orgânicas presentes na cachaça é, portanto, de fundamental importância já que elas são responsáveis por produzirem efeitos de sabor e toxicidade [40], como já foi citado anteriormente na Tabela 2.1.

Para melhor visualizarmos a interferência da linhagem no perfil de voláteis, os analitos foram divididos em 3 classes: aldeídos, ésteres e álcoois superiores.

6.2.2.1 Aldeídos

Os aldeídos geralmente têm grande influência sobre o aroma e sabor das bebidas alcoólicas. Alguns desses compostos (por exemplo, acetaldeído, furfural e HMF) são considerados tóxicos para os seres humanos, sendo associados aos efeitos desagradáveis do consumo excessivo de bebidas alcoólicas (sintomas de intoxicação e veisalgia) [41]. Podem-se destacar os sintomas como: náusea, vômitos, agitação, transpiração, confusão e dores de cabeça [23]. Portanto, um conteúdo reduzido de aldeídos nas aguardentes é frequentemente relacionado à bebidas de qualidade superior. As cachaças ricas em acetaldeído podem ser originárias de processos de destilação que não separam adequadamente a fração “cabeça” da bebida [15].

Furfural

O furfural, que possui aroma que recorda amêndoa, caramelo ou açúcar queimado [91], está relacionado com as mudanças no aroma do alimento. O aumento de sua concentração está relacionado, principalmente, com os alimentos que sofrem reação de Maillard ou caramelização, efeito da exposição ao aumento excessivo da temperatura, ocorrência comum durante a destilação por aquecimento direto [43] ou em bebida fabricada a partir de cana queimada [92]. A desidratação e a degradação térmica dos açúcares é uma classe de reações de grande relevância nos alimentos. As pentoses, como a frutose, formam furfural como principal produto de degradação. O valor do IDLH (*Immediately Dangerous to Life or Health Air Concentration*) para o furfural é de 600 ppm [40].

As curvas analíticas obtidas para as análises do furfural tiveram coeficientes de linearidade (r^2) superiores a 0,999738. Os resultados obtidos para o furfural, representado na Figura 6.4, demonstram que as maiores concentrações do analito foram encontradas nas frações cauda, devido, provavelmente, à sua grande solubilidade em água [40].

Nas alíquotas da fração cauda, as concentrações alcançaram valores entre $4,67 \pm 0,05$ a $46,68 \pm 0,88$ mg 100mL^{-1} de álcool anidro, sendo que 8 das 9 amostras registraram valores superiores a 5 mg 100mL^{-1} , limite máximo permitido pela legislação brasileira [10]. Semelhantes valores de concentração foram previamente relatados em outros estudos [93, 94]. Todas as amostras referentes às alíquotas da fração coração obtiveram concentrações bem inferiores ao máximo permitido pela legislação. Portanto, uma cachaça produzida somente com esta fração estaria completamente legal. Essa característica só justifica a importância da definição das frações do destilado e do descarte da cabeça e cauda para obtenção de uma bebida de qualidade.

Em relação à temperatura da fermentação, os maiores valores foram obtidos a 23°C , e, quanto à linhagem da levedura, os maiores valores foram alcançados com a fermentação iniciada pela levedura UFMG 1031.

Benzaldeído

O benzaldeído é um composto de sabor amargo, que lembra amêndoa e açúcar queimado [91]. Ele é nocivo à saúde, podendo causar dermatite, irritação gastrointestinal e até mesmo afetar o sistema nervoso central, provocando de inconsciência ao coma [40].

No gráfico da Figura 6.5 verifica-se que as maiores concentrações encontradas para o benzaldeído foram observadas para as alíquotas da fração cauda, apesar de sua baixa solubilidade em água, devido, provavelmente, a seu elevado ponto de ebulição ($178,1^{\circ}\text{C}$) [40].

Os limites de detecção e de quantificação foram, respectivamente, $0,50 \times 10^{-3}$ e $1,40 \times 10^{-3} \pm 0,02 \times 10^{-3}$ mg. 100mL^{-1} de álcool anidro (mg 100mL^{-1} a.a.) e os coeficientes de linearidade (r^2) das curvas analíticas obtidas para as análises do benzaldeído foram superiores a 0,999652.

Com relação à influência das leveduras na produção de benzaldeído, observa-se que as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* levaram à

concentrações superiores em comparação às não cerevisias para todas as temperaturas de fermentação.

A influência da temperatura da fermentação na produção do benzaldeído não teve um perfil muito bem definido, já que as maiores temperaturas levaram a um aumento da sua produção pela linhagem UFMG RJW23 e a uma redução para a UFMG 1031.

Apesar da relativa toxidez do benzaldeído, os limites máximos para esse analito ainda não são legislados para as bebidas no Brasil. As maiores concentrações encontradas nas frações coração foram de $0.084 \pm 0.002 \text{ mg } 100\text{mL}^{-1}$ de álcool anidro, valores bem inferiores aos encontrados em alguns estudos de Reche [95].

Butanal

O butanal, assim como o benzaldeído, também pode ser nocivo à saúde, causando dermatite e irritação gastrointestinal. Sua dose de letalidade para 50% de uma população de ratos (DL_{50}) é de 2490 mg kg^{-1} [40].

As curvas analíticas obtidas para as análises do butanal tiveram r^2 superiores a 0.999256; $LD = 6,90 \times 10^{-2}$ e $LQ = 21,99 \times 10^{-2} \pm 0,04 \times 10^{-2} \text{ mg } 100\text{mL}^{-1} \text{ a.a.}$.

As variações nas concentrações do butan-1-ol são observadas na Figura 6.6. Devido ao seu baixo ponto de ebulição (75°C), suas maiores concentrações foram obtidas na fração cabeça. A temperatura de fermentação que mais propiciou a formação do butanal foi 23°C e as suas menores produções foram registradas para a levedura UFMG RJW23.

Na fração coração, as concentrações registradas foram de 3,38 a $0,04 \pm 0,03 \text{ mg } 100\text{mL}^{-1} \text{ a.a.}$, semelhantes aos valores encontrados em outros estudos realizados com aguardentes [96].

6.2.2.2 Ésteres

Os ésteres são, qualitativamente e quantitativamente, um dos maiores grupos da fração volátil das bebidas alcoólicas [97], sendo que os mais abundantes são os derivados do ácido acético (acetatos). Eles são também os compostos mais agradáveis, já que seus limiares de odor são relativamente baixos [15]. Mas, ao mesmo tempo, este fator torna-se preocupante uma vez que tais ésteres, quando em excesso, participam de forma negativa na qualidade do produto final [98]

Os ésteres, em geral, são formados durante a fermentação alcoólica graças às leveduras e bactérias. Os ésteres dos ácidos graxos são formados pela ativação dos ácidos carboxílicos, pela descarboxilação oxidativa dos ácidos, pela síntese dos ácidos monocarboxílicos e seus intermediários de cadeia longa e pela alcoólise dos compostos da acetil-Coenzima-A [42]. Vários fatores influenciam no meio fermentativo para a produção dos ésteres como, por exemplo, os teores de aminoácidos, glicose, suplemento nitrogenado, utilização dos micronutrientes e nível de insaturação dos ácidos graxos presentes [99]. Além disso, outros fatores como a espécie de cana de açúcar que foi empregada na produção do mosto, as linhagens de leveduras, a temperatura de fermentação, a concentração de CO₂ e a oxigenação do meio podem ainda influenciar qualidade e a quantidade dos ésteres produzidos [88, 100].

Acetato de etila

Os ésteres de etila são, geralmente, compostos associados com o agradável aroma floral e sabores frutados normalmente detectados em bebidas alcoólicas, tais como tequila, mescal, mouro, vinho, cerveja e outras [101].

O acetato de etila possui um alto limite de odor, de 1 ppm em solução aquosa. Portanto há necessidade do acetato de etila em pequenas concentrações para permite um aroma frutado. Já em concentrações mais elevadas, tal substância pode promover um aroma desagradável de banana madura ou solvente [97].

Ele é levemente tóxico quando ingerido em grandes quantidades, podendo levar à perda dos sentidos, dor de cabeça, náuseas, vômitos, diarreia, tontura e sonolência [40]. Sua DL_{50} para ratos é de 2490 mg kg^{-1} [37].

Nas análises cromatográficas do acetato de etila, os coeficientes lineares das curvas analíticas foram superiores a 0,999097; $LD = 12,71 \times 10^{-2}$ e $LQ = 26,12 \times 10^{-2} \pm 0,04 \times 10^{-2} \text{ mg } 100\text{mL}^{-1} \text{ a.a.}$. Na Figura 6.7 visualiza-se a influência da temperatura e da linhagem de levedura. Assim, a levedura UFMG 1031 na temperatura de $23 \text{ }^\circ\text{C}$ foi a combinação que mais produziu acetato de etila. A maior concentração foi de $8,9 \pm 0,2 \text{ mg } 100\text{mL}^{-1} \text{ a.a.}$, valor muito inferior ao máximo permitido pela legislação e também em relação a outros estudos [94, 95, 98, 102], que avaliaram a presença deste analito em cachaça.

Killian e Ough [100] encontraram resultados semelhantes aos aqui relatados, constatando que a formação de acetato de etila em vinhos diminuiu em temperaturas elevadas de fermentação.

Outros ésteres

Os ésteres acetato de isobutila, acetato de hexila, hexanoato de etila e octanoato de etila possuem odores de maçã, banana, casca de maçã, frutado e manteiga [91]. A Tabela 6.5 resume os dados de r^2 , LD, LQ e concentração máxima em mg 100 mL⁻¹ a.a. para os ésteres supracitados.

Tabela 6.5 – Coeficiente de determinação (r^2), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e a concentração máxima de alguns ésteres analisados presente nas frações do destilado

Analito	$r^2 >$	LD*	LQ*	Concentração máxima*
Acetato de isobutila	0,999819	0,086 ± 0,001	0,274 ± 0,001	5,1 ± 0,1
Acetato de hexila	0,999512	0,086 ± 0,001	0,275 ± 0,001	12,0 ± 0,3
Hexanoato de etila	0,998558	0,210 ± 0,001	0,648 ± 0,001	1,3 ± 0,1
Octanoato de etila	0,998819	0,213 ± 0,001	0,667 ± 0,001	0,86 ± 0,01

* mg 100mL⁻¹ a.a.

As Figuras 6.8 a 6.11 mostram a influência da linhagem de levedura e temperatura de fermentação nos produtos da destilação.

As maiores concentrações dos ésteres foram detectadas nas frações cabeça. A linhagem UFMG 1031 liderou a produção de acetato de isobutila e hexanoato de etila nas fermentações a 23°C, enquanto que a linhagem UFMG RJW23 produziu os maiores teores de acetato de hexila e octanoato de etila a 23°C e 28°C, respectivamente.

Na Tabela 6.6, observa-se que os valores máximos alcançados nas frações coração são inferiores aos máximos encontrados em cachaças avaliadas em outros estudos. A baixa oxigenação durante a fermentação, realizada em dornas fechadas provavelmente foi o fator que contribuiu para essa diminuição na produção dos ésteres, fator esse que é de vasto conhecimento na fabricação de cerveja [103].

A temperatura de fermentação teve diferentes influências sobre a formação dos diferentes tipos de ésteres, dependendo do tipo de linhagem empregado na fermentação. Não se observou um padrão típico de comportamento, resultado semelhante ao descrito na literatura [63, 104].

Tabela 6.6 – Relação entre as concentrações encontradas nas frações de destilado coração analisadas e o máximo relatado pela literatura

Analito	Concentração máxima (mg 100mL ⁻¹ a.a.)	
	fração coração	Literatura
Acetato de isobutila	0,200 ± 0,005	1,65 [105]
Acetato de hexila	1,57 ± 0,02	2,84 [101]
Hexanoato de etila	0,039 ± 0,001	0,20 a 0,77 [15, 106]
Octanoato de etila	0,049 ± 0,001	0,66 a 3,60 [15, 106]

6.2.2.3 Álcoois superiores

Apesar do álcool mais produzido durante as fermentações ser o etanol, devido a seu alto limiar de odor (10 ppm) ele é dos menos representativos no aroma final das bebidas [15].

Os álcoois superiores com cadeias carbônicas de 3 a 5 átomos de carbono são os principais constituintes do óleo fúsel. Eles são importantes componentes, juntamente com os ésteres, para a formação do aroma e sabor das bebidas alcoólicas.

Os álcoois isoamílicos (3-metilbutan-1-ol), amílico (2-metilbutan-1-ol) e n-propílico representam a maior porcentagem dentre os álcoois superiores. Eles são formados durante a fermentação por reações de desaminação e descarboxilação a partir de aminoácidos como a valina, isoleucina e leucina [101].

Quanto ao butan-1-ol, um dos principais fatores para sua formação em cachaças é a contaminação por bactérias acetobutílicas durante o processo de fermentação. Esta contaminação pode ser causada ao deixar a cana de açúcar

próxima a estábulo e locais de ordenha ou pela adubação do canavial com esterco animal fresco [28, 35].

Outra classe de álcoois que contribui positivamente para o aroma, servindo para diferenciá-lo de outras bebidas e fornecer nuance floral, é a dos terpenos [101]. Em estudos com tequila, Peña-Alvarez e colaboradores [107], concluíram que os terpenos podem ter origem a partir da matéria-prima. Já King e Dickinson [108] defendem que essa classe de voláteis é produzida pelas leveduras durante o processo de fermentação.

A Tabela 6.7 resume os dados de r^2 , LD, LQ e concentração máxima em mg 100 mL⁻¹ a.a., para os álcoois superiores avaliados.

Tabela 6.7 – Coeficiente de determinação (r^2), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e a concentração máxima dos álcoois superiores analisados presente nas frações do destilado

Analito	$r^2 >$	LD*	LQ*	Concentração máxima*
Propan-1-ol	0,998781	0,100 ± 0,001	0,305 ± 0,001	7,5 ± 0,3
Isobutanol	0,999113	0,105 ± 0,001	0,276 ± 0,001	0,71 ± 0,01
Butan-1-ol	0,999267	0,086 ± 0,001	0,275 ± 0,001	29,0 ± 0,2
2-metilbutan-1-ol	0,999480	0,137 ± 0,001	0,407 ± 0,001	0,52 ± 0,01
3-metilbutan-1-ol	0,998975	0,136 ± 0,001	0,388 ± 0,001	0,98 ± 0,01
Pentan-1-ol	0,998526	0,108 ± 0,001	0,343 ± 0,001	1,61 ± 0,03
Mentol	0,999539	0,133 ± 0,001	0,421 ± 0,001	1,77 ± 0,05
Decan-1-ol	0,999572	0,088 ± 0,001	0,280 ± 0,001	1,20 ± 0,01
Geraniol	0,999417	0,098 ± 0,001	0,303 ± 0,001	3,76 ± 0,09

* mg 100mL⁻¹ a.a.

As Figuras 6.12 a 6.20 mostram a influência da linhagem de levedura e temperatura de fermentação sobre o teor de álcoois superiores em cada fração do destilado.

Assim como os ésteres, as maiores concentrações dos álcoois foram observadas nas frações cabeça. A linhagem UFMG 1031 levou à maior produção de propan-1-ol, 2-metilpropan-1-ol, 2-metilbutan-1-ol, 3-metilbutan-1-ol, pentan-1-ol, decan-1-ol e mentol nas fermentações conduzidas a 23°C. Por outro lado, a linhagem UFMG RJW23 liderou a produção de geraniol, também a 23°C, e de butan-1-ol, a 28°C.

Na Tabela 6.8 verifica-se que, exceto para o pentan-1-ol, os valores máximos alcançados para os álcoois superiores nas frações coração são inferiores aos máximos encontrados em cachaças, como relatados em outros estudos. Quanto ao butan-1-ol, o valor de sua concentração máxima esteve bem próximo ao limite máximo encontrado nas bebidas e relatado na literatura.

Os diferentes perfis da produção de álcoois superiores alcançados por diferentes linhagens de leveduras já foi tema de outros estudos [44, 88, 109]. Por exemplo, Oliveira [44] descreve um resultado semelhante quando da utilização da linhagem *S. pombe*, a qual é capaz de produzir menor quantidade de álcoois superiores em relação às linhagens cerevisiaes.

As concentrações alcançadas em nosso trabalho para os experimentos com *Schizosacharomyces pombe* foram ainda menores que aquelas descritas por Oliveira e coautores [44]. Esses resultados sugerem que as fermentações realizadas em dornas fechadas provavelmente contribuem para a diminuição na produção dos álcoois superiores. A presença excessiva desta classe de substância, muito mais que infringir a legislação em vigor, leva à produção de uma bebida de baixa qualidade.

A temperatura teve diferentes influências sobre a formação dos diferentes tipos de álcoois superiores, dependendo do tipo de linhagem empregado na fermentação. Não se observou um padrão típico de comportamento, resultado semelhante ao descrito na literatura [63, 104]. Uma tendência, porém, ficou clara: as maiores concentrações foram obtidas para as fermentações conduzidas a 23°C, exceto, para o butan-1-ol. De acordo com Maia [28], esse álcool está relacionado à contaminação por bactérias acetobutílicas que podem ser oriundas da cana utilizada.

A produção de butan-1-ol foi maior na fermentação realizada na maior temperatura (28°C), resultado coerente com os relatos da literatura acerca de contaminação bacteriana em fermentações conduzidas em temperaturas superiores. As baixas temperaturas reduzem o crescimento de bactérias acéticas e lácticas, facilitando o controle da fermentação alcoólica [110]. De acordo com Lima e colaboradores [32], dentre os vários microrganismos capazes de produzir butan-1-ol,

destaca-se o *Clostridium butilycum*, o qual é uma bactéria anaeróbia, formadora de esporos, cuja temperatura ótima é de 37°C. Portanto, a possível justificativa para a maior produção do butan-1-ol na maior temperatura pode ser resultante de uma contaminação por essa bactéria ou outra do gênero.

Tabela 6.8 – Aroma dos álcoois superiores e relação entre as concentrações encontradas nas alíquotas frações coração e as relatadas pela literatura

Analito	Aroma [91]	Concentração máxima (mg 100mL ⁻¹ a.a.)	
		fração coração	literatura
Propan-1-ol	Álcool pungente	0,612 ± 0,006	1,13 a 341 [35, 95, 98, 109, 111]
2-metilpropan-1-ol (isobutanol)	Vinho, solvente, amargo	0,231 ± 0,002	3,51 a 188 [35, 95, 98, 109, 111]
Butan-1-ol	Vinho, frutado	14,6 ± 0,3	1,20 a 15,2 [95, 111]
2-metilbutan-1-ol (álcool amílico ativo)	Álcool, uísque, malte	0,148 ± 0,001	2,38 [109]
3-metilbutan-1-ol (álcool isoamílico)	Malte, vinho	0,376 ± 0,004	13,38 a 456 [95, 98, 109]
Pentan-1-ol (álcool amílico normal)	Frutado, adocicado, balsâmico	0,59 ± 0,01	0,05 [109]
Mentol	Menta	0,095 ± 0,002	0,73 [111]
Decan-1-ol	Coco	0,171 ± 0,004	0,60 [111]
Geraniol	Rosas, gerânio	0,156 ± 0,002	0,82 a 4,43 [109, 111]

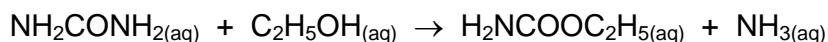
6.2.2.4 Outros contaminantes

Carbamato de etila

O carbamato de etila (CE) ocorre naturalmente nos produtos fermentados, inclusive nas aguardentes nacionais e importadas, em concentrações consideráveis (0,01 a 12,0 mg L⁻¹) [112].

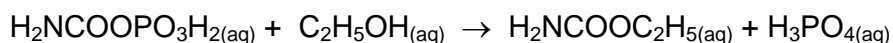
O carbamato de etila, ou uretano (H₂NCOOC₂H₅), é um solvente que industrialmente pode ser obtido pela reação entre a ureia e o etanol em ambiente ácido (Equação 6.4) [58]:

Equação 6.4



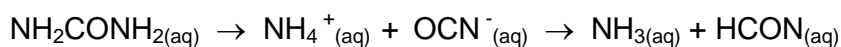
Uma rota metabólica da produção do CE proposto para a *Saccharomyces cerevisiae* é através da reação de carbamifosfato com etanol para gerar o CE em vinhos (Equação 6.5) [58]. Durante a fermentação maloláctica, diferentes precursores do CE são formados pela degradação de aminoácidos por fungos e bactérias, produzindo citrulina e, em menor quantidade, o carbamifosfato.

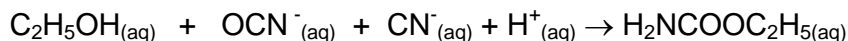
Equação 6.5



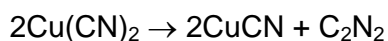
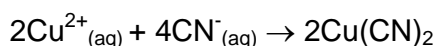
Outro mecanismo proposto que contribui para a formação do CE é a partir da decomposição da ureia ao isocianato e amônia (Equação 6.6). Em soluções aquosas de etanol com aquecimento entre 60 a 100°C, a reação de etanol com isocianato em meio ácido ocorre, levando à formação do CE (Equação 6.7) [112].

Equação 6.6



Equação 6.7

Das diversas rotas propostas para sua síntese, é importante ressaltar a formação do CE a partir da oxidação do cianeto (CN^-) a isocianato (CNO^-) catalisada por íons Cu^{2+} (Equação 6.8). Este último reage com o etanol em meio ácido, conforme já descrito na (Equação 6.7), levando à formação de CE [46, 58, 112]

Equação 6.8

Testes laboratoriais, feitos em cobaias e ratos, mostraram que a injeção de doses em torno de 0,130 mg de carbamato de etila (CE) por kg de peso corporal resultou em incidência de tumores [113]. Em 1985, vários estudos, feitos no Canadá, detectaram a presença de CE em vinhos e bebidas destiladas, o que levou ao estabelecimento de um valor máximo de $150 \mu\text{g L}^{-1}$ para essas bebidas, com base no padrão de consumo moderado e no índice de Ingestão Diária Aceitável (IDA) [114, 115]. A partir destes estudos, os Estados Unidos implementaram um programa voluntário para diminuir o teor do CE no whisky para $125 \mu\text{g L}^{-1}$ após 1989 [114]. Em março de 2007, a Organização Mundial de Saúde, através de sua Agência Internacional de Investigação do Câncer (IARC), reclassificou o potencial cancerígeno do CE do grupo 2A (provavelmente cancerígeno para humanos) para o grupo 2B (possivelmente cancerígeno) [116]. O Brasil regulamentou o limite de $150 \mu\text{g L}^{-1}$ para os destilados obtidos a partir da cana de açúcar, tendo estabelecido um prazo de cinco anos a partir da publicação pelo MAPA da Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho 2005, e alterado para 9 anos pela Instrução Normativa nº 27, de 13 de setembro de 2012 [117].

Nas análises cromatográficas do carbamato de etila, os coeficientes lineares das curvas analíticas foram superiores a 0,999022 e os LD e LQ foram 0,201 e

$0,631 \pm 0,001 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Em trabalhos similares, os limites de quantificação (LQ) para o CE em cachaça foram em torno de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ [112].

Na Figura 6.21 visualiza-se a influência da temperatura e da linhagem de levedura sobre a produção de CE. A linhagem UFMG 1031 na temperatura de 18°C foi a combinação que mais produziu CE. A maior concentração registrada para a fração coração foi de $29,9 \pm 0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, encontrada na fração cabeça fermentada a 18°C , valor esse que foi muito inferior ao máximo permitido pela legislação e semelhante a resultados descritos em outros estudos [52, 94, 95] que avaliaram o analito em cachaça.

Os resultados mostram ainda que a linhagem de *Schizosacharomyces pombe*, em todas as temperaturas de fermentação, levou a produção de concentrações menores de CE em relação às fermentações iniciadas pelas demais linhagens de *Saccharomyces Cerevisiae*.

A realização da destilação da cachaça em alambiques de cobre poderia ser uma agravante na formação do carbamato de etila, já que há a possibilidade de esse metal atuar como catalisador nas reações de formação desse contaminante [52, 58]. Porém, existem estudos onde não se observou nenhuma correlação entre o material do alambique e teores elevados de CE [14, 48, 92].

Dimetilsulfóxido

O Dimetilsulfóxido (DMSO) é um composto muito usado como solvente aprótico e polar em laboratório, na medicina e na indústria. Este composto muito simples tem estimulado muita controvérsia na literatura científica, pois os agentes terapêuticos e tóxicos que não são solúveis em água são muitas vezes solúveis em DMSO. E o DMSO possui ainda uma afinidade muito grande por água favorecendo a sua própria penetração e de outras substâncias através de membranas biológicas [118].

Seus efeitos terapêuticos incluem ações sobre a coagulação, atividade anticolinesterase e liberação de histamina induzida pelos mastócitos. Além disso, um número limitado de pequenos ensaios clínicos indicam possibilidades de uso do DMSO no tratamento de diversas enfermidades, como a amiloidose, para fornecer alívio rápido e temporário da dor em pacientes com artrite e lesões do tecido conjuntivo, e até mesmo para reverter edema cerebral e hipertensão intracraniana. Sua toxicidade sistêmica é considerada baixa. Reações adversas ao DMSO são comuns, mas estão relacionadas com a sua concentração na solução de medicamento. Conseqüentemente, os efeitos colaterais mais frequentes, tais como erupções cutâneas e prurido após aplicação dérmica, hemólise intravascular após a infusão intravenosa e desconforto gastrintestinal após a administração oral, podem ser evitados, em grande parte, pelo emprego de soluções mais diluídas [118, 119].

O DMSO pode ser produzido pela oxidação do dimetilsulfeto (DMS) ou sulfeto de dimetila, que por sua vez é produzido por alguns processos biológicos. É comum a presença de pequenas concentrações de DMSO em bebidas fermentadas. Suas concentrações máximas relatadas na literatura são de 0,14 mg L⁻¹, em cerveja, e 1230 a 946 mg L⁻¹, em amostras de vinho [120, 121]. Em alguns casos, o DMSO é

relatado como a espécie contendo enxofre mais abundante em vinhos e, em experimentos de armazenamento de garrafas de vinho, foi relatado o aumento tanto na formação de DMSO como de DMS. Além disso, observou-se que as amostras de vinho adicionadas de cisteína e DMSO exibiram maior produção de DMS, indicando, portanto, que o DMSO deve atuar como precursor de DMS [121]. O DMS possui baixo ponto de ebulição e um cheiro desagradável de ovo podre [122].

Os coeficientes lineares das curvas de analíticas para as análises cromatográficas do dimetilsulfóxido foram superiores a 0,998583; LD = 0,185 e LQ = $0,578 \pm 0,001 \mu\text{g L}^{-1}$.

Na Figura 6.22 visualiza-se a influência da temperatura e da linhagem de levedura. A linhagem UFMG RJW23 na temperatura de 28°C foi a que mais produziu DMSO e a maior concentração registrada para a fração coração foi de $9,8 \pm 0,2 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ de a.a.. Este valor é menor que os resultados obtidos em vinhos e maior que aqueles obtidos em cervejas [120, 121].

6.3 CONCLUSÕES

Concordante com os resultados observados por Saerens e colaboradores [42], as dornas de fermentação fechadas com lacre d'água podem ter contribuído para evitar a formação excessiva de ésteres e álcoois superiores. Este procedimento também pode ter estimulado a competição anaeróbica durante a fermentação promovendo, com isso, a produção de novas substâncias, as quais, provavelmente, deixam a bebida com um aroma mais complexo e agradável. Deve-se salientar que as concentrações dos contaminantes encontradas nas frações, especialmente o carbamato de etila (CE), foram muito abaixo dos valores permitidos pela legislação.

A temperatura é, indiscutivelmente, um dos parâmetros mais importantes que afetam a fermentação. Embora baixas temperaturas de fermentação tenham interessantes aplicações nas indústrias de produção de vinho e cerveja, mas esse decréscimo na temperatura leva a um efeito adverso no crescimento celular, porque induz um aumento do estresse da levedura durante a fermentação. Portanto com a utilização de linhagens de leveduras que já estejam adaptadas em resistir a esse estresse de baixas temperaturas, pode ser uma das alternativas para se tomar na fabricação da cachaça.

Embora o processo de destilação dos compostos secundários (majoritários e minoritários) seja muito importante para a qualidade do espírito, o seu comportamento experimental ainda não está completamente entendido, e a sua reprodução por ferramentas de simulação também não é totalmente satisfatório. A predominância da concentração destas substâncias nas frações (cabeça, coração e cauda) foi bem definida, correspondente ao seu comportamento físico-químico. Esse fator justifica, mais uma vez, a importância na definição destas frações para cada alambique, assim como o perfeito ajuste fino do seu sistema de aquecimento e resfriamento. Somente destilando um vinho com esse controle, o produtor artesanal poderá obter uma cachaça com excelência e repetir este padrão de qualidade.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os biorreatores termostatizados com ajuste e manutenção de temperatura programável e de alambiques de cobre termostatizados mostram-se eficientes e reprodutíveis na obtenção de um produto final de qualidade. Essa tecnologia pode e deve ser disponibilizada em curto espaço de tempo aos produtores rurais.

Maiores estudos devem ser realizados para certificar a influência das dornas de fermentação fechadas com lacre d'agua na melhoria da qualidade da bebida, relacionando-os com resultados obtidos sob as mesmas condições em dornas abertas.

A definição precisa dos pontos de corte de cada fração é importante para os produtores rurais que visam fabricar cachaça tradicional com uma qualidade superior. Trabalhos futuros devem ser realizados com o intuito de produzir modelos estatísticos discriminatórios que promovam a classificação destas frações e até mesmo identifiquem as adulterações das bebidas comercializadas, como a incorporação das frações cabeça e cauda na fração coração (bebida de qualidade).

O curto período entre o início das fermentações e as sucessivas propagações, mesmo trabalhando com o caldo de cana sem prévia esterilização (semelhante ao que ocorre na realidade dos produtores de cachaça tradicional), não foram suficientes para comprometer a predominância das linhagens, demonstrando a importância da utilização de linhagem de levedura selecionada para a realização das fermentações e obtendo um produto com um padrão de qualidade reprodutível, semelhante ao que já acontece com outras bebidas como o vinho e a cerveja.

São pertinentes maiores estudos que promovam a automatização dos processos, tanto de fermentação quanto de destilação, pois somente produzindo e destilando um vinho com esse controle, o produtor artesanal poderá obter uma cachaça com excelência e repetir incontáveis vezes este padrão de qualidade.

As leveduras mostraram comportamentos ligeiramente diferentes na produção de compostos voláteis secundários, revelando que os melhores padrões de qualidade devem ser alcançados pela associação de duas ou mais linhagens que possam ser escolhidas para promover a produção de uma bebida com as características sensoriais e sanitárias previamente planejadas.

Os resultados deste trabalho demonstraram que pequenas alterações no setor produtivo da cachaça tradicional, acessíveis para grande maioria dos pequenos produtores, podem contribuir de forma a implementar uma grande melhoria no padrão de qualidade da cachaça.

Não são raros os produtores de cachaça que ainda vivem uma realidade tecnológica, social e econômica, extremamente distante daquela, mais evoluída, dos grandes centros rurais e com fácil acesso às novas tecnologias. A contribuição desta pesquisa é de auxiliar esses pequenos produtores a fabricarem um produto de maior qualidade, com apenas com pequenas correções em seu processo.

O impacto econômico e social dessas ações, no curto prazo dependerá da receptividade dos produtores tradicionais à absorção e à realização da prática dessas mudanças no processo que inevitavelmente deverão fazer, e também, ao longo prazo promover o estabelecimento de uma firme linha de pesquisa, ininterrupta nesta área, assim como é feito nas bebidas destiladas tradicionais, como uísque, vodca, rum, conhaque e tequila.

REFERÊNCIAS

- [1]. BRASIL. Decreto nº 4062, de 21 de dezembro de 2001. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, p. 4, 26 dez. 2001.
- [2]. BRASIL. Decreto nº 6871, de 04 de junho de 2009. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, p. 20, 05 jun. 2009.
- [3]. CASCUDO, L. C. **Prelúdio da cachaça**. 2ª ed. São Paulo: Global, 2006.
- [4]. ABRABE - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BEBIDA. **A cachaça.**, Disponível em: <<http://www.abrabe.org.br/cachaca.php>>. Acesso em: 23 out. 2012.
- [5]. INSTITUTO BRASILEIRO DA CACHAÇA - IBRAC. **Mercado Interno**. Brasília, Disponível em: <http://www.ibrac.net/index.php?option=com_content&view=article&id=46&Itemid=47>. Acesso em: 23 out. 2012.
- [6]. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Venda de cachaça para os EUA cresce 12,62% em 2012**. Brasília, Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2012/07/venda-de-cachaca-para-os-eua-cresce-12porcento-em-2012>>. Acesso em: 24 out. 2012.
- [7]. INSTITUTO BRASILEIRO DA CACHAÇA - IBRAC. **Mercado Externo**. Brasília, Disponível em: <http://www.ibrac.net/index.php?option=com_content&view=article&id=47&Itemid=44>. Acesso em: 23 out. 2012.
- [8]. MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior. Disponível em: <<http://alicesweb2.mdic.gov.br/index/home>>. Acesso em: 20 out 2012.
- [9]. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria nº 530 de 12 de Junho de 2008. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção p. 13, 13 jun. 2008.
- [10]. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, p. 3, 30 jun. 2005.
- [11]. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Agenda estratégica 2010-2015 - Cachaça**. Brasília: 2011.
- [12]. VERDI, A. R. Dinâmicas e perspectivas do mercado da cachaça. **Informações Econômicas**, v. 36, n. 2, p. 93-98, 2006.
- [13]. SOUZA, P. P.; CARDEAL, Z. L.; AUGUSTI, R.; MORRISON, P.; MARRIOTT, P. J. Determination of volatile compounds in Brazilian distilled cachaca by using comprehensive two-dimensional gas chromatography and effects of production pathways. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 14, p. 2881-2890, 2009.

- [14]. BARCELOS, L. V. F.; CARDOSO, M. G.; VILELA, F. J.; DOS ANJOS, J. P. Teores de carbamato de etila e outros componentes secundarios em diferentes cachacas produzidas em três regiões do estado de Minas Gerais: Zona da Mata, Sul de Minas e Vale do Jequitinhonha. **Química Nova**, v. 30, p. 1009-1011, 2007.
- [15]. MOREIRA, R. F. A.; NETTO, C. C.; DE MARIA, C. A. B. A fração volátil das aguardentes de cana produzidas no Brasil. **Química Nova**, v. 35, p. 1819-1826, 2012.
- [16]. LIMA, U. A. **Aguardentes**. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W., *et al.* (Ed.). *Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na Produção de Alimentos*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.
- [17]. GOVERNO DO ESTADO DE MINAS GERAIS. Lei 13949, de 11 de julho de 2001. **Minas Gerais Diário do Executivo**, Belo Horizonte, Seção 1, p. 3, 12 jul. 2001.
- [18]. GOVERNO DO ESTADO DE MINAS GERAIS. Lei 16688, de 11 de janeiro de 2007. **Minas Gerais Diário do Executivo**, Belo Horizonte, Seção 2, p. 2, 12 jan. 2007.
- [19]. NASCIMENTO, R. F.; CARDOSO, D. R.; LIMA NETO, B. D. S.; FRANCO, D. W.; FARIAS, J. B. Influência do material do alambique na composição química das aguardentes de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 21, p. 735-739, 1998.
- [20]. BADOTTI, F.; DÁRIO, M. G.; ROSA, C. A.; STAMBUK, B. U. Caracterização bioquímica e molecular de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de fermentações artesanais de caldo de cana e melado para a produção de cachaça em Florianópolis-SC. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n. 03, p. 205-213, 2010.
- [21]. DE SOUZA, A. P. G.; VICENTE, M. A.; KLEIN, R. C.; FIETTO, L. G.; COUTRIM, M. X.; AFONSO, R. C. F.; ARAÚJO, L. D.; DA SILVA, P. H. A.; BOUILLET, L. E. M.; CASTRO, I. M.; BRANDÃO, R. L. Strategies to select yeast starters cultures for production of flavor compounds in cachaça fermentations. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 2, p. 379-392, 2012.
- [22]. CAMPOS, C. R.; SILVA, C. F.; DIAS, D. R.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; SCHWAN, R. F. Features of *Saccharomyces cerevisiae* as a culture starter for the production of the distilled sugar cane beverage, cachaça in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 6, p. 1871-1879, 2010.
- [23]. ALCARDE, A. R.; SOUZA, P. A.; BELLUCO, A. E. S. Aspectos da composição química e aceitação sensorial da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de diferentes madeiras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 226-232, 2010.
- [24]. RECHE, R. V.; LEITE NETO, A. F.; DA SILVA, A. A.; GALINARO, C. A.; DE OSTI, R. Z.; FRANCO, D. W. Influence of Type of Distillation Apparatus on Chemical

Profiles of Brazilian Cachaças. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 16, p. 6603-6608, 2007.

[25]. GARCÍA-LLOBODANIN, L.; ROCA, J.; LÓPEZ, J. R.; PÉREZ-CORREA, J. R.; LÓPEZ, F. The lack of reproducibility of different distillation techniques and its impact on pear spirit composition. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 9, p. 1956-1963, 2011.

[26]. FREYRE, G. **Casa Grande e Senzala**. 51^a ed. São Paulo: Global, 2006.

[27]. GRAVATÁ, C. E. S. **Almanaque da Cachaça**. Belo Horizonte: LAPHIS, 1991.

[28]. MAIA, A. B. R. A.; CAMPELO, E. A. P. **Tecnologia da cachaça de alambique**. Belo Horizonte: Sebrae-MG, 2006.

[29]. GALINARO, C. A.; FRANCO, D. W. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) em cachaça, rum, uísque e álcool combustível. **Química Nova**, v. 32, p. 1447-1451, 2009.

[30]. GALINARO, C. A. **Distinção entre cachaça produzida com cana de açúcar queimada e não queimada**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de concentração: Química Analítica). Instituto de Química, USP, São Carlos, 2006.

[31]. ARAQUE, I.; GIL, J.; CARRETE, R.; BORDONS, A.; REGUANT, C. Detection of arc Genes Related with the Ethyl Carbamate Precursors in Wine Lactic Acid Bacteria. **J Agric Food Chem**, 2009.

[32]. LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. 1^a ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001.

[33]. SCHMIDELL, W.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. D. A. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001.

[34]. OLIVEIRA, V. A.; VICENTE, M. A.; FIETTO, L. G.; CASTRO, I. M.; COUTRIM, M. X.; SCHULLER, D.; ALVES, H.; CASAL, M.; SANTOS, J. O.; ARAUJO, L. D.; DA SILVA, P. H. A.; BRANDAO, R. L. Biochemical and Molecular Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Obtained from Sugar-Cane Juice Fermentations and Their Impact in Cachaca Production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 693-701, 2008.

[35]. SILVA, P. H. A.; SANTOS, J. O.; ARAÚJO, L. D.; FARIA, F. C.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, V. A.; VICENTE, M. A.; BRANDÃO, R. L. Avaliação cromatográfica de compostos voláteis de cachaças produzidas com leveduras de diferentes procedências. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 100-106, 2009.

[36]. BADOTTI, F.; BELLOCH, C.; ROSA, C.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Physiological and molecular characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* cachaça

strains isolated from different geographic regions in Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 579-587, 2010.

[37]. BADOTTI, F.; DARIO, M. G.; ALVES JÚNIOR, S. L.; CORDIOLI, M. L. A.; MILETTI, L. C.; ARAUJO, P. S.; STAMBUK, B. U. Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. 4, p. 1-11, 2008.

[38]. MARINI, M. M.; GOMES, F. C. O.; SILVA, C. L. C.; CADETE, R. M.; BADOTTI, F.; OLIVEIRA, E. S.; CARDOSO, C. R.; ROSA, C. A. The use of selected starter *Saccharomyces cerevisiae* strains to produce traditional and industrial cacha double dagger a: a comparative study. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 235-242, 2009.

[39]. SILVA, C. L. C.; ROSA, C. A.; LIMA, A. B. R. A.; OLIVEIRA, E. S. Qualidade química e sensorial de cachaças produzidas com quatro linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (floculantes, não-produtoras de H₂S e de referência) **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 406-422, 2006.

[40]. O'NEIL, M. J. **The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2006.

[41]. SIEBALD, H. G. L.; CANUTO, M. H.; DA SILVA, J. B. B. Alguns aspectos toxicológicos da cachaça. **Informe Agropecuario**, v. 30, n. 248, p. 55-59, 2009.

[42]. SAERENS, S. M.; DELVAUX, F.; VERSTREPEN, K. J.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J. M.; DELVAUX, F. R. Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 2, p. 454-61, 2008.

[43]. AZEVÊDO, L. C.; REIS, M. M.; SILVA, L. A.; ANDRADE, J. B. Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. **Química Nova**, v. 30, p. 1968-1975, 2007.

[44]. OLIVEIRA, E. S.; CARDELLO, H. M. A. B.; JERONIMO, E. M.; SOUZA, E. L. R.; SERRA, G. E. The influence of different yeasts on the fermentation, composition and sensory quality of cachaça. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 707-715, 2005.

[45]. PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000.

[46]. BRUNO, S. N. F. Destilação – Distillation of Brazilian Sugar Cane Spirits (Cachaças). **Revista Internacional do Conhecimento Online**, v. 3, n. 5, mai. 2012. Disponível em:

<<http://revistainternacionaldoconhecimento.wordpress.com/2012/05/02/destilao-distillation-of-brazilian-sugar-cane-spirits-cachaas-by-sergio-nicolau-freire-bruno/>>.

Acesso em: 12 out 2012.

- [47]. OSORIO, D.; PEREZ-CORREA, J. R.; BIEGLER, L. T.; AGOSIN, E. Wine Distillates: Practical Operating Recipe Formulation for Stills. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 16, p. 6326-6331, 2005.
- [48]. ZACARONI, L. M.; CARDOSO, M. G.; SACZK, A. A.; SANTIAGO, W. D.; DOS ANJOS, J. P.; MASSON, J.; DUARTE, F. C.; NELSON, D. L. Caracterização e quantificação de contaminantes em aguardentes de cana. **Química Nova**, v. 34, p. 320-324, 2011.
- [49]. MASSON, J.; CARDOSO, M. G.; ZACARONI, L. M.; DOS ANJOS, J. P.; SACKZ, A. A.; MACHADO, A. M. R.; NELSON, D. L. Determination of acrolein, ethanol, volatile acidity, and copper in different samples of sugarcane spirits. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, p. 568-572, 2012.
- [50]. BOZA, Y.; HORII, J. Influência do grau alcóolico e da acidez do destilado sobre o teor de cobre na aguardente. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 18, n. 1, p. 85-94, 2000.
- [51]. CARDOSO, D. R.; LIMA-NETO, B. S.; FRANCO, D. W.; NASCIMENTO, R. F. D. Influência do material do destilador na composição química das aguardentes de cana: parte II. **Química Nova**, v. 26, p. 165-169, 2003.
- [52]. BRUNO, S.; VAITSMAN, D.; KUNIGAMI, C.; BRASIL, M. Influence of the distillation processes from Rio de Janeiro in the ethyl carbamate formation in Brazilian sugar cane spirits. **Food Chemistry**, v. 104, n. 4, p. 1345-1352, 2007.
- [53]. SILVA, M. L.; MACEDO, A. C.; MALCATA, F. X. Review: Steam distilled spirits from fermented grape pomace Revision: Bebidas destiladas obtidas de la fermentación del orujo de uva. **Food Science and Technology International**, v. 6, n. 4, p. 285-300, 2000.
- [54]. VERSINI, G.; ODELLO, L. Grappa: considerations on the Italian traditional distillation. In: IER SYMPOSIUM INTERNATIONAL SUR LES EAUX-DE-VIE TRADITIONNELLES D'ORIGINE VITICOLE; 1991; Bordeaux. **Anais...** Paris: Lavoisier-Tec&Doc.; 1990. p. 32-37.
- [55]. RIBEIRO, J. C. G. M. **Fabricação artesanal da cachaça mineira**. Belo Horizonte: Editora Perform, 1997.
- [56]. LÉAUTÉ, R. Distillation in Alambic. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 41, n. 1, p. 90-103, 1990.
- [57]. SOUZA, P. P.; OLIVEIRA, L. C. A.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N.; AUGUSTI, D. V.; SIEBALD, H. G. L.; AUGUSTI, R. Brazilian cachaça: "Single shot" typification of fresh alembic and industrial samples via electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 1064-1068, 2009.

- [58]. ARESTA, M.; BOSCOLO, M.; FRANCO, D. W. Copper(II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2819-24, 2001.
- [59]. FARIA, J. B.; FERREIRA, V.; LOPEZ, R.; CACHO, J. The sensory characteristic defect of "cachaça" distilled in absence of cooper. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 14, n. 1, p. 1-7, 2003.
- [60]. VERRUMA-BERNARDI, M. R.; PARAZZI, C.; BORGES, M. T. M. R.; MACEDO, V. M.; FERREIRA, K. S.; DELIZA, R. Efeito do envelhecimento de aguardentes nas características sensoriais e preferência. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 14, n. 2, p. 219-224, 2012.
- [61]. VOLPE, P. L. O. Estudo da fermentação alcoólica de soluções diluídas de diferentes açúcares utilizando microcalorimetria de fluxo. **Química Nova**, v. 20, p. 528-534, 1997.
- [62]. OLANIRAN, A. O.; MAHARAJ, Y. R.; PILLAY, B. Effects of fermentation temperature on the composition of beer volatile compounds, organoleptic quality and spent yeast density. **Electronic Journal of Biotechnology Online**, v. 14, n. 2, 2011. Disponível em: <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/657>. Acesso em: 29 out 2012.
- [63]. BRAGA, V. S. **A influência da temperatura na condução de dois processos fermentativos para produção de cachaça**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba, 2006.
- [64]. BARDI, E.; KOUTINAS, A. A.; KANELLAKI, M. Room and low temperature brewing with yeast immobilized on gluten pellets. **Process Biochemistry**, v. 32, n. 8, p. 691-696, 1997.
- [65]. KOURKOUTAS, Y.; KOMAITIS, M.; KOUTINAS, A. A.; KALIAFAS, A.; KANELLAKI, M.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Wine production using yeast immobilized on quince biocatalyst at temperatures between 30 and 0 °C. **Food Chemistry**, v. 82, n. 3, p. 353-360, 2003.
- [66]. INÊS, A.; TENREIRO, T.; TENREIRO, R.; MENDES-FAIA, A. Revisão: As bactérias do ácido láctico do vinho- Parte I. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, v. 23, p. 81-96, 2008.
- [67]. PATARO, C.; GUERRA, J. B.; PETRILLO-PEIXOTO, M. L.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; LINARDI, V. R.; ROSA, C. A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 1, p. 24-31, 2000.

- [68]. QUEROL, A.; BARRIO, E.; HUERTA, T.; RAMÓN, D. Molecular Monitoring of Wine Fermentations Conducted by Active Dry Yeast Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 2948-2953, 1992.
- [69]. SABATE, J.; CANO, J.; QUEROL, A.; GUILLAMÓN, J. M. Diversity of Saccharomyces strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 452-455, 1998.
- [70]. CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do estado de São Paulo, Brasil. **Scientia Agricola**, v. 56, p. 207-216, 1999.
- [71]. BASSO, L. C.; DE AMORIM, H. V.; DE OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.
- [72]. SOUZA, P. P.; SIEBALD, H. G. L.; AUGUSTI, D. V.; NETO, W. B.; AMORIM, V. M.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N.; AUGUSTI, R. Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting of Brazilian Artisan Cachaça Aged in Different Wood Casks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 6, p. 2094-2102, 2007.
- [73]. SOUZA, P. P.; AUGUSTI, D. V.; CATHARINO, R. R.; SIEBALD, H. G.; EBERLIN, M. N.; AUGUSTI, R. Differentiation of rum and Brazilian artisan cachaca via electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, n. 10, p. 1294-9, 2007.
- [74]. CATHARINO, R. R.; CUNHA, I. B.; FOGACA, A. O.; FACCO, E. M.; GODOY, H. T.; DAUDT, C. E.; EBERLIN, M. N.; SAWAYA, A. C. Characterization of must and wine of six varieties of grapes by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 41, n. 2, p. 185-90, 2006.
- [75]. CAJKA, T.; RIDDELLOVA, K.; TOMANIOVA, M.; HAJLSLOVA, J. Recognition of beer brand based on multivariate analysis of volatile fingerprint. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 25, p. 4195-203, 2010.
- [76]. GEÖCZE, A. C.; OLIVEIRA, E. S.; GEÖCZE, K. C.; ALVARENGA, R. M.; CANUTO, M. H.; SIEBALD, H. G. L. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of Brazilian cachaças produced in copper alembic and in stainless-steel column stills. **European Food Research and Technology**, v. 235, n. 5, p. 853-859, 2012.
- [77]. SAWAYA, A. C. H. F.; CATHARINO, R. R.; FACCO, E. M. P.; FOGAÇA, A.; GODOY, H. T.; DAUDT, C. E.; EBERLIN, M. N. Monitoring of wine aging process by electrospray ionization mass spectrometry. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 730-734, 2011.
- [78]. ZHU, L.; HU, Z.; GAMEZ, G.; LAW, W. S.; CHEN, H.; YANG, S.; CHINGIN, K.; BALABIN, R. M.; WANG, R.; ZHANG, T.; ZENOBI, R. Simultaneous sampling of

volatile and non-volatile analytes in beer for fast fingerprinting by extractive electrospray ionization mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 1, p. 405-13, 2010.

[79]. MATOS, G. D.; PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Análise exploratória em química analítica com emprego de quimiometria: PCA e PCA de imagens. **Revista Analytica**, v. 6, p. 38-50, 2003.

[80]. NICOL, D. A. **Batch distillation**. In: RUSSELL, I. (Ed.). Handbook of Alcoholic Beverages Series. London: Academic Press, 2003.

[81]. PIGGOTT, J. R.; CONNER, J. M. **Whiskies**. In: LEA, A. G. H. e PIGGOTT, J. R. (Ed.). Fermented Beverage Production. New York: Kluwer Academic, 2003.

[82]. COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2006.

[83]. NASCIMENTO, E. S. P.; CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W. Comparação de técnicas de determinação de ésteres em cachaça. **Química Nova**, v. 32, p. 2323-2327, 2009.

[84]. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008**. Rio de Janeiro: INMETRO, 2010.

[85]. SCANAVINI, H. F. A.; CERIANI, R.; MEIRELLES, A. J. A. Cachaça distillation investigated on the basis of model systems. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, p. 429-440, 2012.

[86]. SCANAVINI, H. F. A.; CERIANI, R.; CASSINI, C. E. B.; SOUZA, E. L. R.; MAUGERI FILHO, F.; MEIRELLES, A. J. A. Cachaça Production in a Lab-Scale Alembic: Modeling and Computational Simulation. **Journal of Food Process Engineering**, v. 33, p. 226-252, 2010.

[87]. CARDEAL, Z. L.; SOUZA, P. P.; GOMES DA SILVA, M. D. R.; MARRIOTT, P. J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography for fingerprint pattern recognition in cachaca production. **Talanta**, v. 74, n. 4, p. 793-9, 2008.

[88]. DATO, M. C. F.; PIZAURO JÚNIOR, J. M.; MUTTON, M. J. R. Analysis of the secondary compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* and wild yeast strains during the production of "cachaça". **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 70-74, 2005.

[89]. GOMES, F. D. C. O.; ARAÚJO, R. A. D. C.; CISALPINO, P. S.; MOREIRA, E. S. A.; ZANI, C. L.; ROSA, C. A. 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.

- [90]. SILVA, C. L.; VIANNA, C. R.; CADETE, R. M.; SANTOS, R. O.; GOMES, F. C.; OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C. A. Selection, growth, and chemo-sensory evaluation of flocculent starter culture strains of *Saccharomyces cerevisiae* in the large-scale production of traditional Brazilian cachaca. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, n. 2-3, p. 203-10, 2009.
- [91]. ACREE, T. E. **Flavornet and human odor space**. Geneva NY, Disponível em: <<http://www.flavornet.org/flavornet.html>>. Acesso em: 27 nov 2012.
- [92]. MASSON, J.; CARDOSO, M. G.; VILELA, F. J.; PIMENTEL, F. A.; DE MORAIS, A. R.; DOS ANJOS, J. P. Parâmetros físico-químicos e cromatográficos em aguardentes de cana queimada e não queimada. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 1805-1810, 2007.
- [93]. ALCARDE, A. R.; SOUZA, P. A.; BOSQUEIRO, Â. C.; BELLUCO, A. E. S. Perfil físico-químico de aguardente de cana-de-açúcar produzida por metodologias de dupla destilação em alambique simples. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n. 3, p. 499-506, 2009.
- [94]. SERAFIM, F. A. T.; GALINARO, C. A.; SILVA, A. A. D.; BUCHVISER, S. F.; NASCIMENTO, E. S. P. D.; NOVAES, F. V.; FRANCO, D. W. Quantitative chemical profile and multivariate statistical analysis of alembic distilled sugarcane spirit fractions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 1506-1514, 2012.
- [95]. RECHE, R. V. **Aspectos da tipificação da aguardente**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências, -área de concentração: Química Analítica). Instituto de Química, USP, São Carlos, 2006.
- [96]. PENTEADO, J. C. P.; MASINI, J. C. Multivariate Analysis for the Classification Differentiation of Brazilian Sugarcane Spirits by Analysis of Organic and Inorganic Compounds. **Analytical Letters**, v. 42, n. 17, p. 2747-2757, 2009.
- [97]. NÓBREGA, I. C. D. C. Análise dos compostos voláteis da aguardente de cana por concentração dinâmica do "headspace" e cromatografia gasosa-espectrometria de massas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 210-216, 2003.
- [98]. BOGUSZ JUNIOR, S.; KETZER, D. C. M.; GUBERT, R.; ANDRADES, L.; GOBO, A. B. Composição química da cachaça produzida na região noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 793-798, 2006.
- [99]. SOLES, R. M.; OUGH, C. S.; KUNKEE, R. E. Ester Concentration Differences in Wine Fermented by Various Species and Strains of Yeasts. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 33, n. 2, p. 94-98, 1982.
- [100]. KILLIAN, E.; OUGH, C. S. Fermentation Esters — Formation and Retention as Affected by Fermentation Temperature. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 30, n. 4, p. 301-305, 1979.

- [101]. DRAGONE, G.; MUSSATTO, S. I.; OLIVEIRA, J. M.; TEIXEIRA, J. A. Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 929-935, 2009.
- [102]. NONATO, E. A.; CARAZZA, F.; SILVA, F. C.; CARVALHO, C. R.; CARDEAL, Z. L. 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.
- [103]. BRÁNYIK, T.; VICENTE, A. A.; DOSTÁLEK, P.; TEIXEIRA, J. A. A Review of Flavour Formation in Continuous Beer Fermentations*. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 114, n. 1, p. 3-13, 2008.
- [104]. RAMSAY, C. M.; BERRY, D. R. Effect of temperature and pH on the formation of higher alcohols, fatty acids and esters in the malt whisky fermentation. **Food Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 117-121, 1984.
- [105]. MORÉS, S. **Determinação de compostos voláteis em cachaça por microextração em fase sólida**. 2009. Dissertação (Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química.). Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- [106]. NASCIMENTO, E. S. P. D. **Ésteres em aguardente de cana: seu perfil**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de concentração: Química Analítica). Instituto de Química, USP, São Carlos, 2007.
- [107]. PEÑA-ALVAREZ, A.; DÍAZ, L.; MEDINA, A.; LABASTIDA, C.; CAPELLA, S.; VERA, L. E. Characterization of three Agave species by gas chromatography and solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1027, n. 1–2, p. 131-136, 2004.
- [108]. KING, A.; DICKINSON, J. R. Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. **Yeast**, v. 16, n. 6, p. 499-506, 2000.
- [109]. DUARTE, W.; AMORIM, J.; SCHWAN, R. The effects of co-culturing non-*Saccharomyces* yeasts with *S. cerevisiae* on the sugar cane spirit (cachaça) fermentation process. **Antonie van Leeuwenhoek Online**, v. n. 1-20, ago. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10482-012-9798-8>>. Acesso em: 29 nov 2012.
- [110]. MEURGUES, O. Valorization of chardonnay flavours in Burgundy using wine making techniques. **Revue Francaise d'Oenologie**, v. 160, p. 16-22, 1996.
- [111]. BOSCOLO, M.; BEZERRA, C. W. B.; CARDOSO, D. R.; LIMA NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Identification and dosage by HRGC of minor alcohols and esters in Brazilian sugar-cane spirit. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, p. 86-90, 2000.

- [112]. WEBER, J.; SHARYPOV, V. Ethyl carbamate in foods and beverages: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 7, n. 3, p. 233-247, 2009.
- [113]. STOEWSAND, G. S.; ANDERSON, J. L.; MUNSON, L. Inhibition by wine of tumorigenesis induced by ethyl carbamate (urethane) in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 29, n. 5, p. 291-295, 1991.
- [114]. RIFFKIN, H. L.; WILSON, R.; HOWIE, D.; MÜLLER, S. B. Ethyl carbamate formation in the production of pot still whisky. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 95, n. 2, p. 115-119, 1989.
- [115]. CANADÁ. **Consolidation - Food and Drug Regulations - C.R.C., c.870**. Minister of Justice, 2012.
- [116]. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Alcoholic Beverage Consumption and Ethyl Carbamate**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2007.
- [117]. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 27, de 13 de setembro de 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, p. 14 set. 2012.
- [118]. BRAYTON, C. F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. **The Cornell veterinarian**, v. 76, n. 1, p. 61-90, 1986.
- [119]. SWANSON, B. N. Medical use of dimethyl sulfoxide (DMSO). **Reviews in clinical & basic pharmacology**, v. 5, n. 1-2, p. 1-33, 1985.
- [120]. PEARSON, T. W.; DAWSON, H. J.; LACKEY, H. B. Naturally occurring levels of dimethyl sulfoxide in selected fruits, vegetables, grains, and beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 29, n. 5, p. 1089-1091, 1981.
- [121]. DE MORA, S. J.; LEE, P.; SHOOTER, D.; ESCHENBRUCH, R. The Analysis and Importance of Dimethylsulfoxide in Wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 44, n. 3, p. 327-332, 1993.
- [122]. SILVA, V. D. A.; BENITE, A. M. C.; SOARES, M. H. F. B. Algo Aqui Não Cheira Bem... A Química do Mau Cheiro. **Química Nova na Escola**, v. 33, n. 1, p. 3-9, 2011.

APÊNDICE

Trabalhos Apresentados em Eventos

CANUTO, M. H.; ROSA, C. A.; DE MOURA, F.; AUGUSTI, R.; SIEBALD, H. G. L. *Fingerprint* de frações de destilado de cachaça de alambique: aplicação ESI-MS e análise de dados multivariados. 16º Encontro Nacional de Química Analítica, 2011, Campos de Jordão – SP.

Palestras Ministradas em Eventos

CANUTO, M. H. Marcadores bioquímicos para cabeça, coração e cauda. 1º Congresso Mineiro da Cachaça, 2011, Belo Horizonte – MG.

Co-orientação de Trabalho de Conclusão de Curso

CANUTO, M. H.; SIEBALD, H. G. L.; FORTES, I. C. P.; PICCIN, E.. Participação em banca de Fabiana de Moura. Avaliação da correlação do pH, teor alcoólico e perfil de compostos voláteis da Aguardente de cana de açúcar (Cachaça). 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Tecnológica) - Universidade Federal de Minas Gerais.

Trabalhos Publicados e Submetidos para Publicação

SIEBALD, H. G. L.; CANUTO, M. H.; DA SILVA, J. B. B. Alguns aspectos toxicológicos da cachaça. **Informe Agropecuario**, v. 30, n. 248, p. 55-59, 2009.

GEÖCZE, A. C.; OLIVEIRA, E. S.; GEÖCZE, K. C.; ALVARENGA, R. M.; CANUTO, M. H.; SIEBALD, H. G. L. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of Brazilian cachaças produced in copper alembic and in stainless-steel column stills. **European Food Research and Technology**, v. 235, n. 5, p. 853-859, 2012.

CANUTO, M. H.; ROSA, C. A.; DE MOURA, F.; AUGUSTI, R.; SIEBALD, H. G. L. Distillation of fermented sugarcane juice: fractions characterized by electrospray ionization mass spectrometry and multivariate data treatment. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 7, p. 901-904, 2012.