

QUALIDADE E IDENTIDADE DAS CACHAÇAS PRODUZIDAS NA  
REGIÃO NORTE FLUMINENSE – RJ

**LEANDRO MARELLI DE SOUZA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

NOVEMBRO/2008

QUALIDADE E IDENTIDADE DAS CACHAÇAS PRODUZIDAS NA  
REGIÃO NORTE FLUMINENSE – RJ

**LEANDRO MARELLI DE SOUZA**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutor em Produção Vegetal”

Orientadora: Karla Silva Ferreira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
NOVEMBRO DE 2008

QUALIDADE E IDENTIDADE DAS CACHAÇAS PRODUZIDAS NA  
REGIÃO NORTE FLUMINENSE – RJ

**LEANDRO MARELLI DE SOUZA**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutor em Produção Vegetal”

Aprovada em 28 de novembro de 2008.

Comissão Examinadora:

---

Prof. José Benício Paes Chaves. Ph.D., Food Science – UFV

---

Prof. Luís César Passoni. D.Sc., Química – UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Meire Lélis Leal Martins. Ph.D., Molecular Biology and Biotechnology – UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Karla Silva Ferreira. D.Sc., Ciências e Tecnologia de Alimentos – UENF  
(Orientadora)

Dedico o presente trabalho aos pingófilos, cachaçólogos e a todos que apreciam a arte de viver e degustar cachaça.

## **A cachaça**

A primeira queima a goela  
Desce forte e vai rasgando,  
A segunda refestela  
Desce fresca e deslizando.

Desde os tempos do império  
Que ela é muito apreciada,  
Pobre “bebe” sem mistério  
O rico a “toma” velada.

Nas festas de “gente boa”  
Quase não se fala nela,  
Mas na “moita” a tal patroa  
É chegada na “amarela”.

Não conheço um brasileiro,  
Mesmo cheio de chilique,  
Que ignore o santo cheiro  
De uma pura de alambique.

Tome pura ou com raiz,  
O importante é o ritual  
De passar pelo o nariz  
Benza a Deus e “desce o pau”.

A danada sempre agrada,  
Seja pura ou caipirinha  
Dentre a todas destiladas,  
Aprecio a tal branquinha.

O sabor que arde e queima  
Tem aroma original,  
E apesar de tanta teima  
É preferência nacional.

A lenda diz que a primeira  
Foi Jesus quem produziu  
O que me reforça a crença  
De que Deus é do Brasil.

Luiz Ângelo Vilela Tannus.

## AGRADECIMENTOS

Ao Pai Celestial, único dono e criador do universo, capaz de glórias e graças;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), pela oportunidade de realização, fornecimento de bolsa de estudos e infra-estrutura necessária para a realização do curso e do trabalho ora apresentado;

A FAPERJ, pela concessão dos recursos financeiros indispensáveis ao projeto;

Aos produtores de cachaça da região Norte Fluminense, em especial ao Paulo Sérgio, Bozó e Demétrio, pela parceria neste trabalho de pesquisa;

À Professora Karla Silva Ferreira, pela confiança em mim depositada e competência na orientação;

Aos professores Luís César Passoni e Meire Lélis Leal Martins, pela co-orientação e valiosas dicas;

Ao Professor José Tarcísio Lima Thiébaud, pelo apoio na área de estatística;

Aos funcionários Paulo Sergio Oliveira de Castro e Valdinéia Estephanele Pinto, pela indispensável ajuda por eles prestada;

A todos os colegas que angariei no período do curso;

A Camila Aparecida Cardoso Podestá, amor da minha vida;

Aos meus amigos de muitas datas Lazaro, Lorena, Simone, Rosemary, Prudenciana (Pupu), Ângela, Fernanda, Victor, e todos que acreditaram e acreditam na minha amizade e companheirismo;

Aos meus pais biológicos, João Batista de Souza e Elizabete Marelli de Souza, pois nasci de bons pais;

Aos meus pais adotivos, Antônio Luiz Rodrigues Fingolo e Maria Lúcia Pessanha Santos Fingolo, por tudo que fizeram e fazem por mim;

Aos meus irmãos, Luciano Marelli de Souza e Lídia Marelli de Souza;

Ao meu filho Vitor Monteiro de Souza, por ser um ótimo filho e um prêmio para mim;

A Maurino Vasconcelos e Wilma Vasconcelos, pelas colaborações nos momentos difíceis e o apoio no dia a dia, por mim e pela minha família;

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

## SUMÁRIO

INDICE DE TABELAS .....	X
INDICE DE FIGURAS .....	XII
RESUMO .....	XIV
ABSTRACT .....	XVII
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1 Produção de cachaça .....	7
2.1.1 Matéria-prima .....	9
2.1.2 Colheita .....	13
2.1.3 Moagem, decantação e ajuste do °Brix .....	14
2.1.4 Fermentação do mosto .....	15
2.1.4.1 Propagação do fermento .....	23
2.1.4.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na fermentação alcoólica .....	27
2.1.4.3 Processo fermentativo .....	29
2.1.5 Destilação do vinho .....	29
2.1.6 Pós-destilação do vinho .....	30
2.2 Padrões de identidade e qualidade de aguardente .....	32
3. TRABALHOS .....	36
TEORES DE COMPOSTOS ORGÂNICOS EM CACHAÇAS PRODUZIDAS NA REGIÃO NORTE FLUMINENS - RJ .....	36
RESUMO .....	37
ABSTRACT .....	37



INTRODUÇÃO .....	38
PARTE EXPERIMENTAL .....	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
CONCLUSÕES .....	51
AGRADECIMENTOS .....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52
TEORES DE COBRE, ZINCO, FERRO, SÓDIO E POTÁSSIO EM CACHAÇAS .....	54
RESUMO .....	55
ABSTRACT .....	55
INTRODUÇÃO .....	56
MATERIAL E MÉTODOS .....	57
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	58
CONCLUSÕES .....	62
AGRADECIMENTOS .....	62
REFERÊNCIAS .....	63
COMPONENTES ORGÂNICOS E INORGÂNICOS AO LONGO DA DESTILAÇÃO DO VINHO DO CALDO-DE-CANA PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA .....	65
RESUMO .....	66
ABSTRACT .....	66
INTRODUÇÃO .....	67
MATERIAL E MÉTODOS .....	69
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	76
CONCLUSÕES .....	88
AGRADECIMENTOS .....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	89
ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS DE ALAMBIQUES DO MUNICÍPIO DE CAMPOS DOS GOYTACAZES .....	92
MATERIAL E MÉTODOS .....	93
ABSTRACT .....	94
INTRODUÇÃO .....	95
MATERIAL E MÉTODOS .....	96
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	101

CONCLUSÕES .....	110
AGRADECIMENTOS .....	110
REFERÊNCIAS .....	110
4. RESUMOS E CONCLUSÕES .....	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	115

## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA – Diferença entre os períodos de maturação de diferentes variedades de cana de açúcar .....	11
TABELA – Principais vantagens da cana-de-ano-e-meio e cana-de-ano .....	13
TABELA – Padrões de identidade da aguardente de cana-de-açúcar e da cachaça .....	33
TABELA – Limite para os congêneres estabelecidos pela legislação brasileira .....	33
TABELA – Limites máximos permitidos de contaminantes na cachaça estabelecidos pela legislação brasileira .....	34
TABELA – Relação das amostras de cachaça analisadas, respectivas indústrias e o critério de diferenciação .....	40
TABELA – Limites máximos e mínimos, composição físico-química, média e desvio padrão dos componentes analisados .....	44
TABELA – Número de amostras de cachaça das 30 analisadas que não atendem aos parâmetros de identidade e qualidade proposto pela Instrução Normativa N° 13 .....	45
TABELA – Teores de minerais nas amostras de cachaça (mg.L <sup>-1</sup> de cachaça) e o critério de diferenciação .....	59
TABELA – Caracterização morfológica das leveduras selecionadas e avaliadas em meio sólido <i>YP</i> .....	105

TABELA – Crescimento das leveduras selecionadas em meio de cultura contendo diferentes fontes de carbono na concentração de 2 g% .....	106
TABELA – Capacidade fermentativa das leveduras selecionadas em meio de cultura líquido <i>YP</i> , contendo diferentes fontes de carbono na concentração de 2 g% .....	108
TABELA – Assimilação de fontes de nitrogênio pelas leveduras estudadas .....	108
TABELA – Crescimento das leveduras em diferentes temperaturas em meio <i>YP</i> .....	109

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA – Fluxograma do processo de produção de cachaça artesanal .	8
FIGURA – Colmos de cana-de-açúcar .....	9
FIGURA – Estrutura química da molécula de sacarose .....	10
FIGURA – Ciclo de desenvolvimento da cana-de-ano-e-meio .....	12
FIGURA – Ciclo de desenvolvimento da cana-de-ano .....	12
FIGURA – Esquema simplificado da formação de compostos em processos fermentativos .....	16
FIGURA – Esquema da fermentação e da respiração .....	18
FIGURA – Vias básicas para a formação dos compostos do sabor durante a fermentação .....	19
FIGURA – Esquema de formação de alcoóis superiores nas leveduras pela via de Ehrlich (catabólica) .....	28
FIGURA – Cromatograma dos padrões obtidos por GC-FID em coluna polar LM-100 .....	42
FIGURA – Valores de grau alcoólico das diferentes amostras analisadas e limite mínimo e máximo para um destilado ser considerado cachaça, conforme Instrução Normativa N° 13 .....	45
FIGURA – Estrutura química do furfural e do 5-hidroximetilfurfural .....	47
FIGURA – Cromatograma típico de amostras de cachaça obtidos por GC-FID em coluna polar LM-100 .....	47
FIGURA – Alambique 1 .....	70
FIGURA – Alambique 2 .....	71
FIGURA – Alambique 3 .....	72

FIGURA – Cromatograma dos padrões obtidos por GC-FID em coluna polar LM-100 .....	75
FIGURA – Cromatograma típico de amostra de cachaça obtidos por GC-FID em coluna polar LM-100 .....	77
FIGURA – Variação dos teores de acetaldeído durante a destilação ..	78
FIGURA – Variação dos teores de acetato de etila durante a destilação	79
FIGURA – Variação dos teores de 1-propanol durante a destilação ...	79
FIGURA – Variação dos teores de 1-butanol durante a destilação .....	80
FIGURA – Variação dos teores de metanol durante a destilação .....	81
FIGURA – Variação dos teores de etanol destilação.....	82
FIGURA – Variação dos teores de iso-butanol durante a destilação ...	83
FIGURA – Variação dos teores de iso-amílico durante a destilação ...	83
FIGURA – Variação dos teores de 1-hexanol durante a destilação .....	84
FIGURA – Variação dos teores de ácido acético durante a destilação	85
FIGURA – Variação dos teores de cobre durante a destilação .....	87
FIGURA – Variação dos teores de zinco durante a destilação .....	87
FIGURA – Variação dos teores de ferro durante a destilação .....	88
FIGURA – Colônias de leveduras isoladas em meio sólido <i>YP</i> .....	101
FIGURA – Crescimento da levedura isolada (por número) em meio <i>Agar Lisina (A)</i> e Meio <i>Agar YP (B)</i> .....	103
FIGURA – Porcentagem de leveduras isoladas crescidas em condição de estresse .....	104

## RESUMO

SOUZA, LEANDRO MARELLI, Biólogo D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Novembro de 2008, Qualidade e identidade das cachaças produzidas na região Norte Fluminense – RJ; Professor Orientador: Karla Silva Ferreira; Professor Conselheiro: Luís César Passoni e Meire Lélis Leal Martins.

Este estudo foi dividido em quatro ensaios. Nos dois primeiros, fez-se a quantificação dos compostos orgânicos etanol, metanol, 1-propanol, 1-butanol, iso-butanol, álcool iso-amílico, acetato de etila, acetaldeído, ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural e acroleína, e dos minerais cobre, zinco, ferro, sódio e potássio, em trinta amostras pertencentes a dezesseis produtores de cachaças associados da Cooperativa dos Produtores de Cachaça e Derivados da Cana-de-Açúcar do Norte Fluminense – COOPCANF, comparando os resultados com os padrões de identidade e qualidade estabelecidos pela legislação vigente. Das trinta amostras analisadas, 63,3% delas apresentaram não conformidade com a legislação nacional em pelo menos um dos componentes orgânicos analisados. Deste total, o grau alcoólico real, com 30,0% das amostras abaixo do mínimo permitido, e a soma dos compostos 5-hidroximetilfurfural e furfural, também com 30,0% das amostras acima do máximo permitido, foram os parâmetros com maiores índices de irregularidades. O ácido acético e 1-butanol apresentaram teores acima do máximo permitido em 13,3% e 10,0% das amostras, respectivamente. Os compostos metanol e acroleína, assim como, álcoois superiores, não atenderam à conformidade em 3,3% das amostras. Todas as amostras apresentam níveis de acetaldeído e acetato de etila dentro do limite permitido pela legislação. Já para os componentes inorgânicos, 46,7% estavam

com teores de cobre acima do limite máximo permitido. Houve presença de zinco em todas as amostras analisadas e 75,0% apresentaram ferro. Aproximadamente, 60,0% continham sódio e em 25,0% detectou-se potássio. Em um terceiro ensaio, com a finalidade de conhecer a composição química do destilado durante a destilação do vinho da cana-de-açúcar, foram quantificados diversos compostos em diferentes frações do destilado coletadas ao longo de 160 minutos de destilação. Os resultados indicam que os teores de acetaldeído, acetato de etila, 1-propanol e 1-butanol são mais elevados nos primeiros momentos da destilação. O metanol foi detectado em  $(78 \pm 4,9)\%$  das amostras estudadas, com presença distribuídas de forma linear ao longo de todo o período de destilação. Já os compostos etanol, iso-butanol e álcool iso-amílico possuem teores menores na fase final da destilação, com uma queda linear significativa ao longo do tempo. De forma inversa, os teores de 1-hexanol e ácido acético foram mais elevados na fase final da destilação. Os elementos cobre, zinco e ferro foram detectados em todas as frações estudadas, com valores médios variando, em mg por litro de amostra, entre 3,55 a 54,66 para cobre, 0,07 a 0,51 para zinco e 0,05 a 0,70 para ferro. No quarto ensaio, um estudo foi realizado com o objetivo de isolar leveduras nativas em mostos de fermentação de dois alambiques, a fim de selecionar aquelas com propriedades apropriadas para a produção de cachaça. Das 130 colônias que foram isoladas, apenas 25 foram capazes de crescer em uma concentração de etanol de 10,0%. Destas, 10 que apresentaram melhores crescimentos, foram selecionadas e submetidas à caracterização morfológica e bioquímica. Todas as seis colônias isoladas da destilaria BZ apresentaram resultados incompatíveis com a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, de acordo com a fonte de carbono estudada, enquanto que todas as quatro colônias da destilaria PS (PS13, PS36, PS43 e PS46) apresentaram resultados, que foram compatíveis com a espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Entretanto, de acordo com os resultados do teste de fermentação de carboidratos, das dez colônias estudadas, apenas as colônias PS36, PS43 e BZ32 apresentaram características compatíveis com a espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Em relação ao teste de assimilação de nitrogênio, todas as leveduras avaliadas apresentaram características similares a *S. cerevisiae*. Com base nestes resultados, concluiu-se que apenas duas estirpes isoladas (PS36 e PS43) apresentaram resultados bioquímicos compatíveis com a espécie *S. cerevisiae* e para uma identificação



mais precisa das estirpes selecionadas é necessário aumentar a quantidade de fontes de carbono estudadas, ou utilizar técnicas de biologia molecular.

## ABSTRACT

SOUZA, LEANDRO MARELLI, Biólogo D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Novembro 2008. Quality and identity of the “cachaça” (sugar cane spirit) produced in the North part of Rio de Janeiro state. Professor Adviser: Karla Silva Ferreira. Committee members: Luís César Passoni e Meire Lélis Leal Martins.

This study was divided in four rehearsals. In the first two, it was made the quantification of the compositions organic ethyl alcohol, methyl alcohol, n-propyl alcohol, n-butyl alcohol, isobutyl alcohol, isoamyl alcohol (mixture of 2-methyl-butyl and 3-methyl-butyl), ethyl acetate, acetaldehyde, acetic acid, furfural, 5-hydroxymethylfurfural and acrolein, and of the minerals copper, zinc, iron, sodium and potassium, in thirty samples belonging to sixteen producing of “cachaça” (sugar cane spirit) associated of the Cooperative of the Producing of “Cachaça” and Derived of the Sugar-cane of the North part of Rio de Janeiro state—COOPCANF, comparing the results with the identity patterns and quality established by the effective legislation. Of the thirty analyzed samples, 63.3% of them presented no conformity with the national legislation in at least one of the analyzed organic components. Of this total one, the real alcoholic degree, with 30.0% of the samples below the allowed minimum, and the sum of the compositions 5-hydroxymethylfurfural and furfural, also with 30.0% of the samples above the allowed maximum, were the parameters with larger indexes of irregularities. The acetic acid and n-butyl alcohol presented contents above the maximum allowed in 13.3% and 10.0% of the samples, respectively. The compositions methyl alcohol and acrolein, as well as, superior alcohols, didn't assist to the conformity in 3.3% of the samples. All of the samples present acetaldehyde levels and ethyl acetate inside

of the limit allowed by the legislation. Already for the inorganic components, 46.7% were with copper contents above the allowed maximum limit. There was presence of zinc in all of the analyzed samples and 75.0% presented iron. Approximately, 60.0% contained sodium and 25.0% potassium was detected. In a third rehearsal, with the purpose of knowing the chemical composition of the distilled during the distillation of the wine of the sugar-cane, were quantified several composed in different fractions of the distilled collected along 160 minutes of distillation. The results indicate that the acetaldehyde contents, ethyl acetate, n-propyl alcohol and n-butyl alcohol are higher in the first moments of the distillation. The methyl alcohol was detected in  $(78 \pm 4.9)\%$  of the studied samples, with distributed presence in a lineal way along the whole distillation period. Already the compositions ethyl alcohol, isobutyl alcohol and isoamyl alcohol (mixture of 2-methyl-butyl and 3-methyl-butyl) possess smaller contents in the final phase of the distillation, with a significant lineal fall along the time. Of inverse form, the contents of n-hexanol alcohol and acetic acid were higher in the final phase of the distillation. The elements copper, zinc and iron were detected in all of the studied fractions, with medium values varying, in mg for liter of sample, between 3.55 to 54.66 for copper, 0.07 to 0.51 for zinc and 0.05 to 0.70 for iron. In the fourth rehearsal, a study was accomplished with the objective of isolating native yeasts in musts of fermentation of two stills, in order to select those with appropriate properties for the production of white rum. Of the 130 colonies that were isolated, only 25 were capable to grow in a concentration of ethyl alcohol of 10.0%. Of these, 10 that presented better growths, were selected and submitted to the morphologic and biochemical characterization. All the six isolated colonies of the distillery BZ presented incompatible results with the species *Saccharomyces cerevisiae*, in agreement with the source of carbon studied, while all the four colonies of the distillery PS (PS13, PS36, PS43 and PS46) presented results, which were compatible with the species *Saccharomyces cerevisiae*. However, in agreement with the results of the test of carbohydrate fermentation, of the ten studied colonies, just the colonies PS36, PS43 and BZ32 presented compatible characteristics with the species *Saccharomyces cerevisiae*. In relation to the test of assimilation of nitrogen, all of the appraised yeasts presented similar characteristics to *S. cerevisiae*. With base in these results, it was ended that only two isolated ancestries (PS36 and PS43) presented compatible biochemical

results with the species *S. cerevisiae* and for a more necessary identification of the selected ancestries it is necessary to increase the amount of sources of carbon study, or to use techniques of molecular biology.

## 1. INTRODUÇÃO

Com o descobrimento do Brasil, Portugal trouxe a cana-de-açúcar, originária da Ásia Meridional, sendo introduzida em solos brasileiros, entre 1532 e 1548. O solo fértil e o clima quente e úmido permitiram o rápido desenvolvimento da cultura, marcando o início de uma atividade que iria se transformar em grande fonte de riqueza para Portugal (Mutton e Mutton, 2005).

No princípio, a cana-de-açúcar era a matéria-prima para a produção do açúcar, melado, rapadura e melaço. O açúcar foi a base da economia e do comércio internacional brasileiro por muito tempo, caracterizando um dos ciclos de desenvolvimento do País: o ciclo da cana-de-açúcar (Maia e Campelo, 2006). O caldo-de-cana que “azedava” (vinho da cana) não servia para a produção de açúcar (Mutton e Mutton, 2005), porém, quando submetido à destilação, resulta em um líquido transparente, brilhante e ardente, se ingerido. No princípio foi chamado água ardente e depois, pinga, cana, caninha e, finalmente, cachaça. Bebida dos mestiços, negros e índios, dos brancos, dos primeiros brasileiros (Maia e Campelo, 2006).

A cachaça reina como nome típico e exclusivo da bebida nacional, única, feita no Brasil, com graduação alcoólica de 38 a 48 graus e características sensoriais peculiares (Brasil, 2005).

Atualmente, o mercado brasileiro movimenta um volume de, aproximadamente, 1,4 bilhões de litros de cachaça (MAPA, 2008). Em 2007 foram exportados 9,0 milhões de litros, gerando uma arrecadação de, aproximadamente 13,8 milhões de dólares (BRASIL, 2008).

No Brasil, esse destilado – que pode ser produzido artesanalmente ou em escala industrial – ocupa a segunda posição da bebida alcoólica mais apreciada, ficando atrás, somente, da cerveja. O PIB do setor é de cerca de US\$ 500 milhões, estima-se que existam mais de quatro mil marcas registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, e mais de 30 mil produtores em todo país, gerando aproximadamente 400 mil empregos diretos e indiretos (MAPA, 2008).

Como consequência do aumento da produção, surgiu uma demanda técnica e científica, desde a da cultura da cana-de-açúcar até o engarrafamento da cachaça. Muitos estudos e pesquisas foram feitos na área de fermentação do caldo de cana-de-açúcar e muitos foram os conhecimentos adquiridos quanto à extração do caldo, purificação, fermentação, desinfecção, técnicas de destilação, busca de leveduras apropriadas e selecionadas (Lima, 2001).

As características fisiológicas das espécies de leveduras isoladas do mosto fermentado têm grande relevância na compreensão dos mecanismos envolvidos na colonização do mosto e na determinação das condições ótimas para se manter uma fermentação saudável (Pataro et al., 2002). Dessa forma, a seleção do fermento é considerada uma das medidas que podem contribuir para melhoria do processo de fabricação de cachaça. O uso desta técnica, na maioria das vezes, aumenta a produtividade do alambique e melhora a qualidade do produto final, principalmente em relação aos teores de acidez e concentração de alcoóis superiores, visto que as leveduras selecionadas podem apresentar maior tolerância ao etanol, à temperatura e apresentar outras características positivas para a fabricação da cachaça (Pataro et al., 2002).

Além da fermentação, a destilação é uma etapa importante na produção de cachaça, sendo responsável por muitos dos caracteres sensoriais da bebida. O mosto fermentado ou vinho possui uma composição bastante complexa. Sob o ponto de vista da volatilidade, têm-se os constituintes de natureza volátil e fixa. Os voláteis são representados pela água, álcool etílico, aldeídos, ésteres, alcoóis superiores, ácido acético etc., enquanto que os fixos são extratos do mosto e as células de leveduras e bactérias (SEBRAE, 2004).

Muitos dos componentes voláteis são oriundos de reações que ocorrem durante os processos de fermentação, destilação e durante o armazenamento em

barris de madeira (Dias, 2006). Alguns destes são tóxicos, fazendo com que a cachaça esteja submetida à legislação nacional (Brasil, 2005) de responsabilidade do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Este estabelece a composição química, os requisitos de qualidade e a concentração máxima permitida de contaminantes, como cobre e carbamato de etila. Os padrões de identidade e qualidade, estabelecidos pela legislação, com seus respectivos limites têm a finalidade de padronizar a cachaça e proteger a saúde do consumidor. Essa padronização é essencial para que a bebida atenda aos padrões internacionais de qualidade e seja aceita pelo mercado externo, proporcionando condições de abertura e manutenção do mercado de exportação (Miranda et al., 2007).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Os dados históricos sobre bebidas alcoólicas são imprecisos, sendo difícil saber quando foram obtidas as primeiras bebidas alcoólicas fermentadas, embora haja citações sobre seu uso antes da era cristã. As descrições mais exatas são de autores árabes, do século X, supondo-se que eles tenham criado os termos álcool e alambique (Lima, 2001).

Os alambiques foram os primeiros aparelhos de destilação. A denominação alambique é de origem grega, “Ambix”, e significa um recipiente quadrado com uma pequena abertura. Os árabes alteraram o nome para “Ambic” (Dias, 2006) e descobriram os equipamentos de destilação semelhantes aos que são usados atualmente, com condensador, capitel e caldeira, a alquitara (SEBRAE, 2001) e, provavelmente, sua cultura difundiu os conhecimentos da destilação nas várias regiões da Europa (Crispim, 2000).

A destilação é uma técnica muito antiga e era utilizada, séculos antes de Cristo, por chineses, indianos, egípcios, gregos e romanos. Nesta época, estas culturas produziam um líquido, posteriormente denominado de álcool pelos árabes, cuja finalidade era a produção de medicamentos e perfumes (Dias, 2006). Os gregos registraram o processo de obtenção da água ardente (a água que pega fogo, água ardente, al kuhu). Na Idade Média, a água ardente foi para as mãos dos alquimistas, que atribuíam a ela propriedades místico-medicinais (SEBRAE, 2001). A origem da alquimia, no século III a.C., é atribuída aos árabes (Maia e Campelo, 2006). Depois, foi levada para a Europa e difundiu-se por todo o mundo. Transformou-se, assim, em água da vida (a Eau de Vie), que passou a ser receitada como elixir da longevidade (SEBRAE, 2001).



Foi no século XVII, após a obtenção do primeiro destilado a partir de grãos, que o consumo de bebidas destiladas passou a fazer parte dos hábitos do homem (Cleto, 1997). Nesta época, na Europa, as bebidas destiladas passaram a ser denominadas “espíritos”, sendo o álcool (produto de várias destilações do vinho) o “spiritus mundi” (Maia e Campelo, 2006) e a tecnologia de produção das bebidas alcoólicas espalhou-se. Na Itália, o destilado de uva fica conhecido como *grappa*. Na Escócia, o *Uísque*, destilado da cevada sacarificada. Na Rússia, a *vodka*, de centeio. Na China e Japão, o *saque*, de arroz. Em Portugal, destilado do bagaço de uva, a *bagaceira* (Lima, 2001).

Com o descobrimento do Brasil, Portugal trouxe a cana-de-açúcar, originária da Ásia Meridional entre 1532 e 1548, sendo introduzida em solos brasileiros em 1532 por Martim Afonso de Souza, na Capitania de São Vicente, atual cidade de São Paulo (Mutton e Mutton, 2005). Três anos depois, por Duarte Coelho, na Capitania de Pernambuco e em 1540 por Pedro de Góes, na Capitania da Paraíba do Sul, hoje região pertencente à cidade de Campos dos Goytacazes e adjacências, Estado do Rio de Janeiro (Maia e Campelo, 2006). O solo fértil e o clima quente e úmido permitiram o rápido desenvolvimento da cultura, marcando o início de uma atividade que iria se transformar em grande fonte de riqueza para Portugal (Mutton e Mutton, 2005).

A princípio, os portugueses tentaram utilizar a população nativa (“índios”) no trabalho braçal. Como não obtiveram sucesso, decidiram recorrer à mão-de-obra africana, já utilizada em outras colônias européias. Imensos contingentes de africanos foram trazidos para o Brasil. O açúcar produzido por escravos nos “engenhos” foi a base da economia e do comércio internacional brasileiro por muito tempo, caracterizando um dos ciclos de desenvolvimento do País: o ciclo da cana-de-açúcar (Maia e Campelo, 2006).

O caldo de cana que “azedava” (vinho da cana) não servia para a produção de açúcar e era deixado nos cochos para o consumo dos animais. Após algum tempo, este fermentava produzindo um líquido com cheiro diferente (aroma frutado), que aguçou a curiosidade dos escravos (Mutton e Mutton, 2005). Estes, logo perceberam que ao aroma agradável se associava um sabor etílico e um efeito embriagador, permitindo por momentos, esquecer a nostalgia e as condições subumanas em que viviam (Maia e Campelo, 2006).

O vinho fermentado, submetido à destilação, resultava em um líquido transparente, brilhante e ardente, se ingerido. Considerando-se que parecia com água, optou-se por chamá-la água ardente. Outro nome que lhe foi atribuído foi cachaça, por ser originado do caldo fermentado da cana (cagaça), que em espanhol era conhecida como cachaza. E, considerando-se que, durante a destilação, o líquido pingava, surgiu o nome pinga. Tipicamente brasileira, é conhecida, também, por abrideira, água que gato não bebe, água de setembro, branquinha, caninha, mata bicho, meu consolo, perigosa, sumo de cana, teimosa, uca, purinha, dentre muitos outros nomes. (Mutton e Mutton, 2005).

Dados históricos indicam o início da produção de cachaça no Brasil, por volta de 1600, no município de Parati, Estado do Rio de Janeiro. Neste mesmo período, a cachaça torna-se símbolo da resistência da cultura brasileira contra a dominação portuguesa e, também, dos ideais inconfidentes, daí um dos motivos do grande número de engenhos no Estado de Minas Gerais (MAPA, 2008). Mas, somente por volta de 1876 é que o francês Luiz Pasteur demonstrou as bases científicas do mecanismo da transformação dos açúcares em álcool sob a ação da levedura, em ausência de oxigênio. Após os estudos de Pasteur, o processo de fermentação conseguiu novos avanços quando Mëlle e Boinot (1930-40) desenvolveram o processo revolucionário de recuperação do levedo por centrifugação (Crispin, 2000).

As indústrias de cachaça até 1945 eram rurais e rudimentares, não havendo padrões de qualidade do produto. A produção doméstica aumentou bastante e desde então o processo de produção vem sendo aperfeiçoado e melhorado, o que tem acarretado melhorias no rendimento, produtividade e qualidade do produto final (Pataro *et al.*, 2002). Hoje, a produção de cachaça ocorre, principalmente, em micro, pequenas e médias empresas, que são grande fonte geradora de empregos e renda (ABRABE, 2008).

O mercado de cachaça no Brasil tem passado por recentes transformações, representada, principalmente, por uma certa elitização do consumo e por uma busca crescente de qualidade (Estanislau *et al.*, 2002). Atualmente, o mercado brasileiro da cachaça movimenta um volume de, aproximadamente, 1,4 bilhões de litros de cachaça (MAPA, 2008). Em 2007 foram exportados 9,0 milhões de litros, gerando uma arrecadação de, aproximadamente 13,8 milhões de dólares (BRASIL, 2008).

No Brasil, esse destilado – que pode ser produzido artesanalmente ou em escala industrial – ocupa a segunda posição da bebida alcoólica mais apreciada, ficando atrás, somente, da cerveja. O PIB do setor é de cerca de US\$ 500 milhões, estima-se que existam mais de quatro mil marcas registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, e mais de 30 mil produtores em todo país, gerando, aproximadamente, 400 mil empregos diretos e indiretos (MAPA, 2008).

Como conseqüência do aumento da produção, surgiu uma demanda técnica e científica, desde a da cultura da cana-de-açúcar até o engarrafamento da cachaça. Muitos estudos e pesquisas foram feitos na área de fermentação do caldo de cana-de-açúcar e muitos foram os conhecimentos adquiridos quanto à extração do caldo, purificação, fermentação, desinfecção, técnicas de destilação, busca de leveduras apropriadas e selecionadas, e outros parâmetros (Lima, 2001).

De acordo com Malta (2006), têm-se percebido ações voltadas para tornar a produção de cachaça mais eficiente e articulada, uma vez que historicamente ela se caracteriza como bastante pulverizada e com elevado índice de informalidade. Destas iniciativas, existem o Programa Brasileiro de Desenvolvimento de Aguardente de Cana (PBDAC), o Programa Especial de Exportações (PEE), o Programa dos Novos Pólos para Exportação (PNPE) e a Rede Mineira de Tecnologia da Cachaça (RTMC).

## **2.1 – Produção de cachaça**

A produção de cachaça artesanal envolve várias etapas. Deve-se examinar todo o processo, apontando os principais aspectos a serem observados, a fim de obter em cada uma de suas etapas, os melhores resultados, objetivando inserir no mercado um produto final de qualidade comprovada (Estanislau *et al.*, 2002).

A Figura – 1 ilustra o fluxograma da produção da cachaça. A cana-de-açúcar depois de colhida e transportada para a indústria é moída e separado o bagaço. O caldo bruto é submetido a uma cõa por passagem em peneiras, decantado para separação do bagacilho e diluído para ajuste do Brix. O caldo de cana-de-açúcar pronto para fermentar é denominado mosto. O mosto é colocado

para fermentar na presença do fermento, normalmente o “pé-de-cuba”. Depois de terminada a fermentação do mosto, o caldo é chamado de vinho. O vinho, depois de sedimentado é destilado. Durante a destilação, são separadas frações de “cabeça”, “coração”, “cauda” e vinhaça. A fração “coração”, denominada de cachaça, pode ser armazenada ou envelhecida e, posteriormente, engarrafada e comercializada.

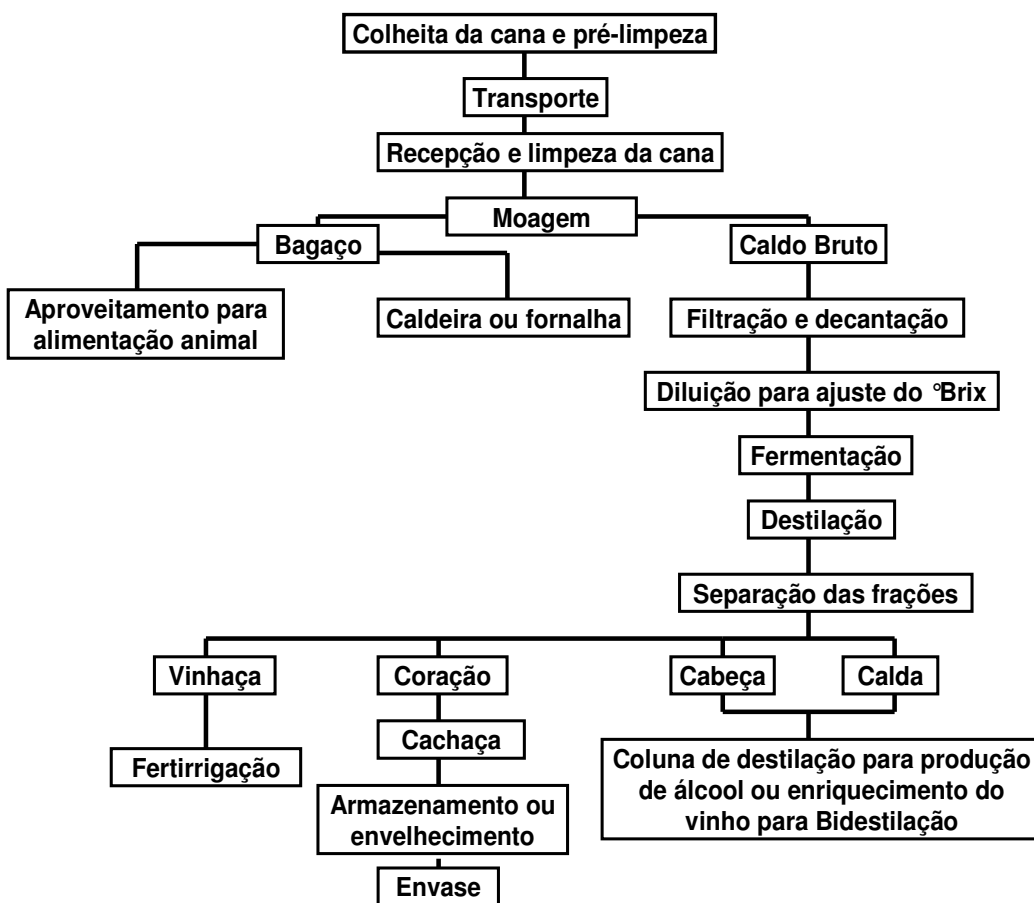


Figura 1 - Fluxograma do processo de produção de cachaça artesanal.

### 2.1.1 – Matéria-prima

A cana-de-açúcar, *Saccharum spp.* (Figura 2), apresenta seus colmos (cana) constituídos de fibras (8% - 14%) e caldo (86% - 92%). As fibras, que correspondem ao bagaço da cana, compõem-se, essencialmente, de 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina. O caldo contém 74% a 80% de água e 20% a 26% de sólidos. A fração sólida é constituída por 97% de açúcares e o restante é formado por pequenas quantidades de inúmeras substâncias orgânicas e inorgânicas (Maia e Campelo, 2006). O açúcar predominante é a sacarose (Barbosa-Filho, et al., 2000), um dissacarídeo composto de duas subunidades de monossacarídeos, uma alfa-glicose e uma beta-frutose, ligadas em uma união 1,2 (o carbono 1 da glicose liga-se ao carbono 2 da frutose, formando uma ligação  $\alpha$  para a glicose e  $\beta$  para frutose) chamada ligação glicosídica (Raven et al., 2001). A Figura 3 apresenta a estrutura química de uma molécula de sacarose.



Classificação botânica:

Divisão: *Embryophita siphonogama*

Subdivisão: *Angiospermae*

Classe: *Monocotyledoneae*

Ordem: *Glumiflorae*

Família: *Poaceae*

Gênero: *Saccharum*

Figura 2 – Colmos da cana-de-açúcar.

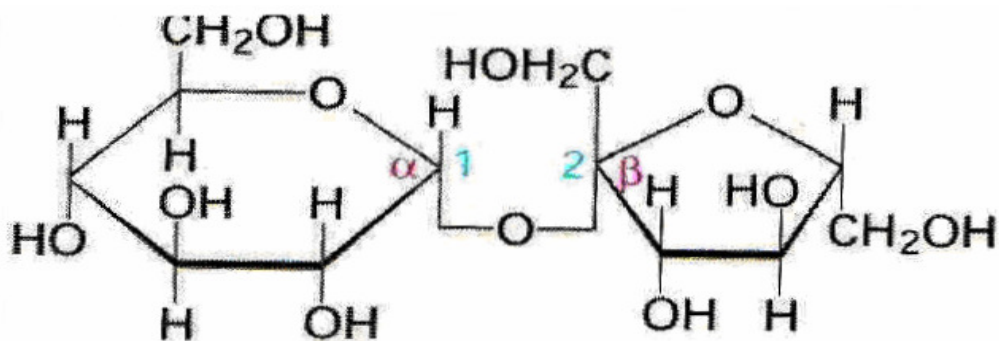


Figura 3 - Estrutura química da molécula de sacarose.

Atualmente há cerca de trinta e duas espécies conhecidas e catalogadas. Entretanto, as mais conhecidas ou importantes, em virtude de suas utilizações no trabalho de melhoramento genético são: *Saccharum officinarum* L., *Saccharum spontaneum* L., *Saccharum sinense* Roxb, *Saccharum barberi* Jesw e *Saccharum robustum* Jesw. As diversas espécies de cana-de-açúcar conhecidas atualmente têm origens diferentes. As espécies *S. officinarum* e *S. robustum* são originárias da Oceania (ilha de Nova Quiné). As espécies *S. spontaneum* e *S. barberi* da Ásia, provavelmente da Índia e a espécie *S. sinense* da China. Todas as variedades de cana-de-açúcar, hoje cultivadas em todo o mundo para fins industriais (açúcar, álcool ou cachaça), são híbridas envolvendo duas ou mais espécies diferentes (Andrade, 2006).

No ano de 2006, foi realizado um estudo por alunos da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) em parceria com a Cooperativa dos Produtores de Cachaça e derivados da cana-de-açúcar do Norte Fluminense (COOPCANF). Por meio de questionários, foi possível identificar que de toda a área destinada à plantação de cana-de-açúcar, 56,5% é ocupada pela variedade RB72-454, seguida pela variedade SP79-1011 com 20,2%. Indicando a preferência dos produtores por estas duas variedades. Depois destas encontram-se as variedades SP80-1842 e CB45-3 com cerca de 6% cada. Também, são encontradas as variedades RB73-9735 e RB8540 com menos de 2% da área total plantada. Observa-se que em 10%, aproximadamente, da área plantada, a variedade de cana-de-açúcar é desconhecida.

A escolha das variedades de cana-de-açúcar deve ser feita levando em consideração o período médio de maturação das variedades, condições climáticas e de solo (Silveira *et al.*, 2002).

Se um produtor de cachaça pretende alambicar no período de maio a novembro/dezembro, ele deve plantar variedades que apresentem três tipos de maturação: precoce, média e tardia. A maturação é o processo fisiológico de transporte e armazenamento da sacarose nas células dos colmos (Silveira *et al.*, 2002). Pode-se indicar a este produtor uma distribuição das variedades em: 20% para as precoces, 60% para as médias e 20% para as tardias. Na Tabela 1 encontram-se as principais diferenças entre o período de colheita (maturação) das diferentes variedades de cana-de-açúcar, exemplificando algumas delas.

Tabela 1 – Diferença entre os períodos de maturação de diferentes variedades de cana-de-açúcar

<b>Maturação</b>	<b>Período ótimo de colheita</b>	<b>Variedades</b>
Precoce	Adequadas para serem processadas no início da safra, entre os meses de <b>maio e junho.</b>	RB 76-5418, SP80-1842, RB 835054
Média	Indicadas para processamento no meio da safra, entre <b>julho a setembro.</b>	RB92-8064, SP 79-1011, RB85-5536
Tardia	Adequadas para o final da safra, entre <b>outubro e novembro.</b>	RB 72-454, RB 78-5148, RB 72-454, SP79-2313, SP 71-1406

A época de plantio pode variar de uma região para outra. Na Região Nordeste do Brasil, tem-se uma única época de plantio que vai de junho a setembro (épocas das chuvas), sem uso de irrigação. Visando atender às necessidades climáticas da cultura, na Região Centro-Sul do Brasil, as condições que permitem o plantio sem irrigação ocorrem nas seguintes épocas:

Janeiro a março, obtendo-se a chamada cana-de-ano-e-meio;  
 Outubro a novembro, obtendo-se a cana-de-ano.  
 Em qualquer caso, após o corte, o ciclo da soca é de doze meses.

A Figura 4 ilustra o ciclo de desenvolvimento da cana-de-ano-e-meio e a Figura 5 da cana-de-ano.

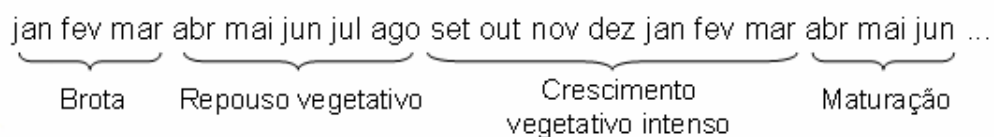


Figura 4 – Ciclo de desenvolvimento da cana-de-ano-e-meio. Fonte: Andrade, 2006.

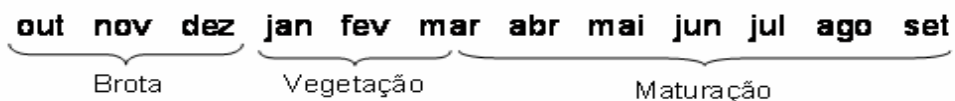


Figura 5 – Ciclo de desenvolvimento da cana-de-ano. Fonte: Andrade, 2006.



As principais vantagens da cana-de-ano-e-meio e cana-de-ano estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Principais vantagens da cana-de-ano-e-meio e cana-de-ano

<b>Época de plantio</b>	<b>Vantagens</b>
Cana-de-ano-e-meio	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maior número de meses para o crescimento vegetativo, garantindo maior produção;</li> <li>• Melhor distribuição da mão-de-obra, pois o plantio e a colheita não coincidem;</li> <li>• Melhor controle de plantas daninhas;</li> <li>• Menores problemas fitossanitários;</li> <li>• Possibilidade de rotação com culturas de ciclo curto;</li> <li>• Melhor escoamento da colheita.</li> </ul>
Cana-de-ano	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Produção mais rápida do primeiro corte;</li> <li>• Melhor brotação das socas;</li> <li>• Corte ocorre durante o período de condições climáticas favoráveis.</li> </ul>

Fonte: Andrade, 2006.

### 2.1.2 – Colheita

Segundo Oliveira et al., (2005) a cana-de-açúcar deve ser cortada bem rente ao solo, quando madura, e na quantidade suficiente para moagem do dia. Saber o momento de colher a cana-de-açúcar, também, é importante, e existem técnicas que auxiliam a estabelecer a época certa da colheita. A cana-de-açúcar é considerada madura quando o °Brix estiver em 16% ou mais. Com um sacarímetro portátil, deve-se calcular o Índice Médio de Maturação – IM, que é a razão entre o °Brix da extremidade superior (ponta) e o da extremidade inferior (base). Quando o IM estiver entre 0,8 a 1,0 a cana-de-açúcar está

madura. Se a razão for maior que 1,0 a cana-de-açúcar passou do ponto,

$$0,8 \leq \frac{\text{Brix na ponta}}{\text{Brix na base}} \leq 1$$

Após o corte, é extremamente importante que a cana-de-açúcar permaneça o menor tempo possível exposta ao sol. A luz e o calor favorecem a proliferação de bactérias, que aumentam a viscosidade do caldo, prejudicando acentuadamente o rendimento da fermentação e a decantação do fermento (Maia e Campelo, 2006).

### **2.1.3 – Moagem, decantação e ajuste de °Brix**

A seção de moagem deve ser aberta, com piso resistente e impermeável, que permita uma boa lavagem. Normalmente, o piso é de cimento, não muito liso, para evitar que fique escorregadio e provoque acidentes. O uso de revestimento com pedra é recomendado. Essa área, também, deve ser coberta, de maneira a proteger a cana-de-açúcar dos efeitos negativos da ação do sol e da chuva. Como o volume de cana-de-açúcar a ser moída é calculado a partir da produção diária, a seção de moagem deve prever áreas para estocagem, manuseio de matéria-prima, moenda, operação, filtração e decantação do caldo (Oliveira et al., 2005).

A extração por moagem é a operação que permite dividir o colmo da cana-de-açúcar em duas frações: o caldo e o bagaço (Veiga, 2006). Logo após a moagem da cana-de-açúcar, o caldo extraído atravessa uma tela fina, destinada a reter partículas sólidas e resíduos de bagaço de diâmetros maiores (Maia e Campelo, 2006). Em seguida, passa pelo decantador, onde deixa as impurezas mais finas, tais como terra e bagacilho, prejudiciais à fermentação e à qualidade da cachaça (Mutton e Mutton, 2005). Quanto ao decantador de caldo, existem cálculos matemáticos para o seu dimensionamento. A passagem do caldo pelo decantador deve ser de no máximo 20 minutos, para evitar que ocorra a proliferação de microrganismos que o acompanham (Maia e Campelo, 2006).

A limpeza do caldo é importante pelos inconvenientes que a sujidade promove, uma vez que agem como focos de contaminações, além da formação de produtos indesejáveis para a qualidade da cachaça, por exemplo, o furfural (Mutton e Mutton, 2005).

Depois de decantado, o caldo de cana-de-açúcar deverá passar por tanques para ajuste do °Brix, antes de iniciar a fermentação nas dornas. Esta indicação justifica-se, pois, a fermentação ideal ocorre quando a concentração de açúcares está entre 14° e 16° Brix. Acima de 16° Brix é necessário diluir o caldo, para garantir a estabilidade do fermento ao longo de todo o período fermentativo; se não diluído pode acarretar fermentações mais lentas e freqüentemente incompletas, acarretando perda de qualidade da cachaça (Veiga, 2006).

#### **2.1.4 – Fermentação do mosto**

O termo fermentação é derivado do verbo latim *fervere*, que significa ferver, o que descreve a aparência da ação das leveduras no mosto (Schwan et. al., 2006). Todo processo de fermentação é causado por microrganismos vivos, sejam bactérias, fungos ou leveduras (Mutton e Mutton, 2005). A grande maioria dos organismos fermentadores tem em comum o fato de metabolizar a fonte de carbono até o piruvato e, deste, sintetizar outros compostos orgânicos, tais como ácido láctico (fermentação láctica) etanol (fermentação alcoólica), ácido propiônico e outros (Lehninger et al., 2000).

A fermentação alcoólica é o processo de oxidação anaeróbica parcial da glicose. Os microrganismos mais comumente usados na fermentação alcoólica são as leveduras, fundamentalmente a espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Do ponto de vista bioquímico, a fermentação consiste na conversão da hexose em álcool. No caldo de cana-de-açúcar, estas hexoses, glicose e frutose, são obtidas pela hidrólise da sacarose por meio da enzima invertase. No caso de sucos extraídos de frutas, o açúcar predominante é a frutose. Durante o transporte para dentro das células, essas hexoses são fosforiladas, iniciando a glicólise. A glicólise está ilustrada na Figura 6, assim como rotas simplificadas de formação do etanol e de outros compostos (Cunha, 2004). Pela via glicolítica, a glicose é convertida em duas moléculas de piruvato por meio de dez reações catalisadas por diferentes enzimas (Figura 6).

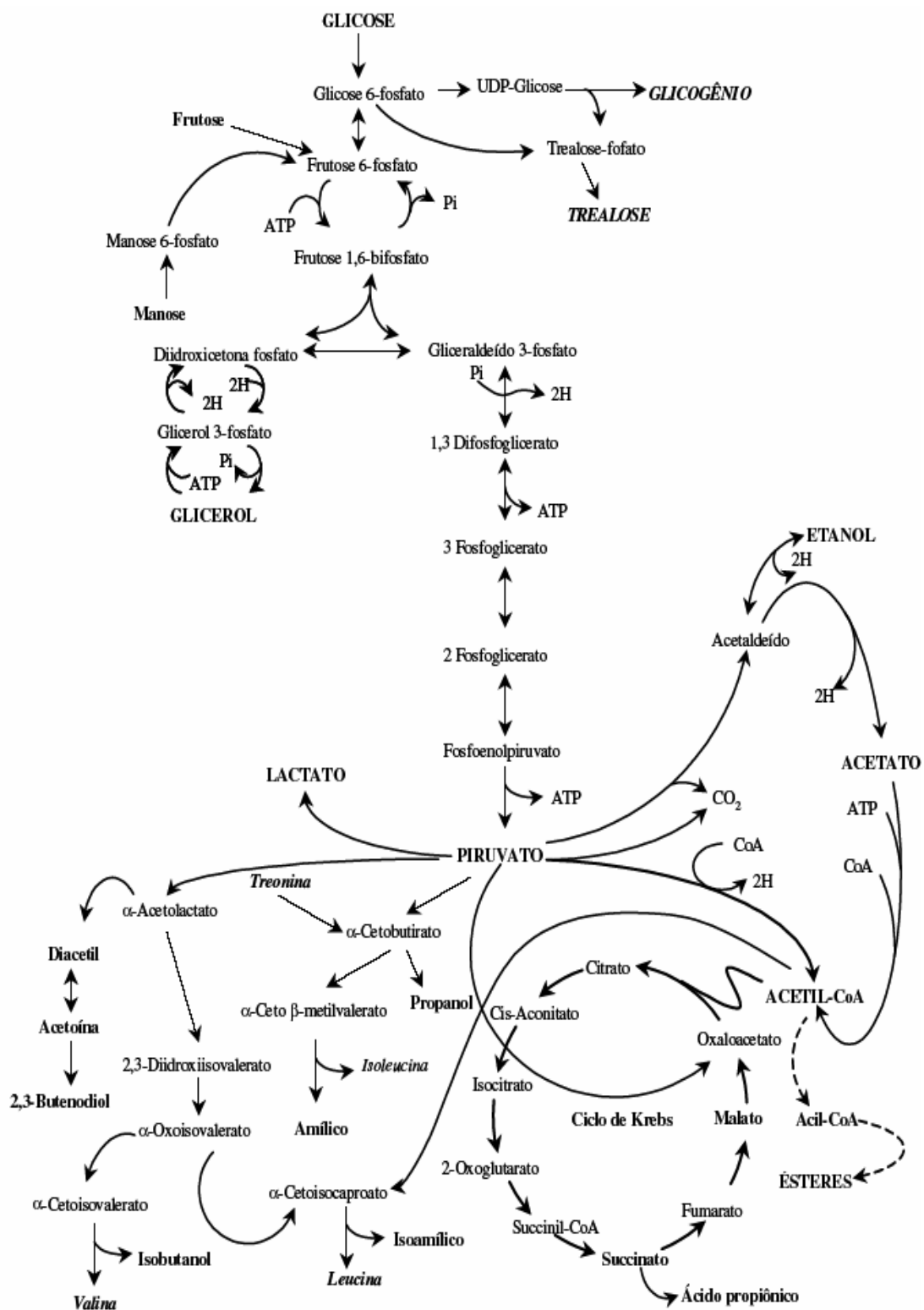


Figura 6 – Esquema simplificado da formação de compostos em processos fermentativos. Fonte: Dias, 2001.

Em leveduras ocorre a formação de etanol a partir do piruvato por duas etapas. A primeira consiste na sua descarboxilação para formar acetaldeído e  $\text{CO}_2$ . Esta reação é catalizada pela enzima piruvato descarboxilase. Na segunda reação, o acetaldeído é reduzido a etanol por ação da enzima álcool desidrogenase I (ADH1). O esgotamento da glicose ativa, nas leveduras, a transcrição do gene da desidrogenase 2 (ADH2). A enzima ADH2 oxida o etanol a acetaldeído, o qual é posteriormente convertido a acetato, passando então para as etapas posteriores do ciclo de Krebs (Cambell, 2000; Tortora et al., 2000). A Figura 7 ilustra o esquema da fermentação e da respiração. Quando há o esgotamento da glicose é ativada a via representada pelas setas pontilhadas (oxidação do etanol), seguindo para a via respiratória. Existem dois tipos de enzima, a álcool desidrogenase (I e II), codificadas por genes diferentes (em *itálico*). Todas as enzimas da via estão sublinhadas.

Além do álcool etílico e  $\text{CO}_2$ , outros metabólicos são produzidos durante a fermentação alcoólica, como glicerol, ácidos orgânicos (succínico, acético, pirúvico e outros), alcoóis superiores, acetaldeído, acetoína, butilenoglicol etc (Schwan et. al., 2006). Segundo Lima (2001), além das rotas que levam a formação do etanol, rotas alternativas são utilizadas para a formação de materiais necessários à constituição de biomassa (polissacarídeos, lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e outros), além de produtos necessários à adaptação e sobrevivência das leveduras (Figura 6).

No início da fermentação, quando o açúcar disponível para as leveduras for a sacarose, esta é quase imediatamente hidrolisada à glicose e frutose pela ação da enzima invertase. A maioria das linhagens de leveduras é glicofílica, ou seja, fermenta a glicose em taxas mais rápidas que a frutose e outros monossacarídeos (Schwan et. al., 2006). Em condições industriais, há desvio de 10% do açúcar consumido para a formação de produtos secundários (co-produtos) da fermentação (Lima, 2001). Na Figura 8 encontram-se as vias básicas para a formação dos componentes secundários ou compostos de sabor formados, representando eventos que ocorrem durante a fermentação alcoólica. Estes compostos pertencem às classes: aldeídos, ácidos, ésteres, alcoóis superiores, terpenos, lactonas, furanos, pirazinas, dentre outros. Os teores destes compostos na fermentação alcoólica são geralmente inferiores a 0,1%, existindo alguns em quantidades menores ainda, inferiores a 0,001% (Maia, 1994).

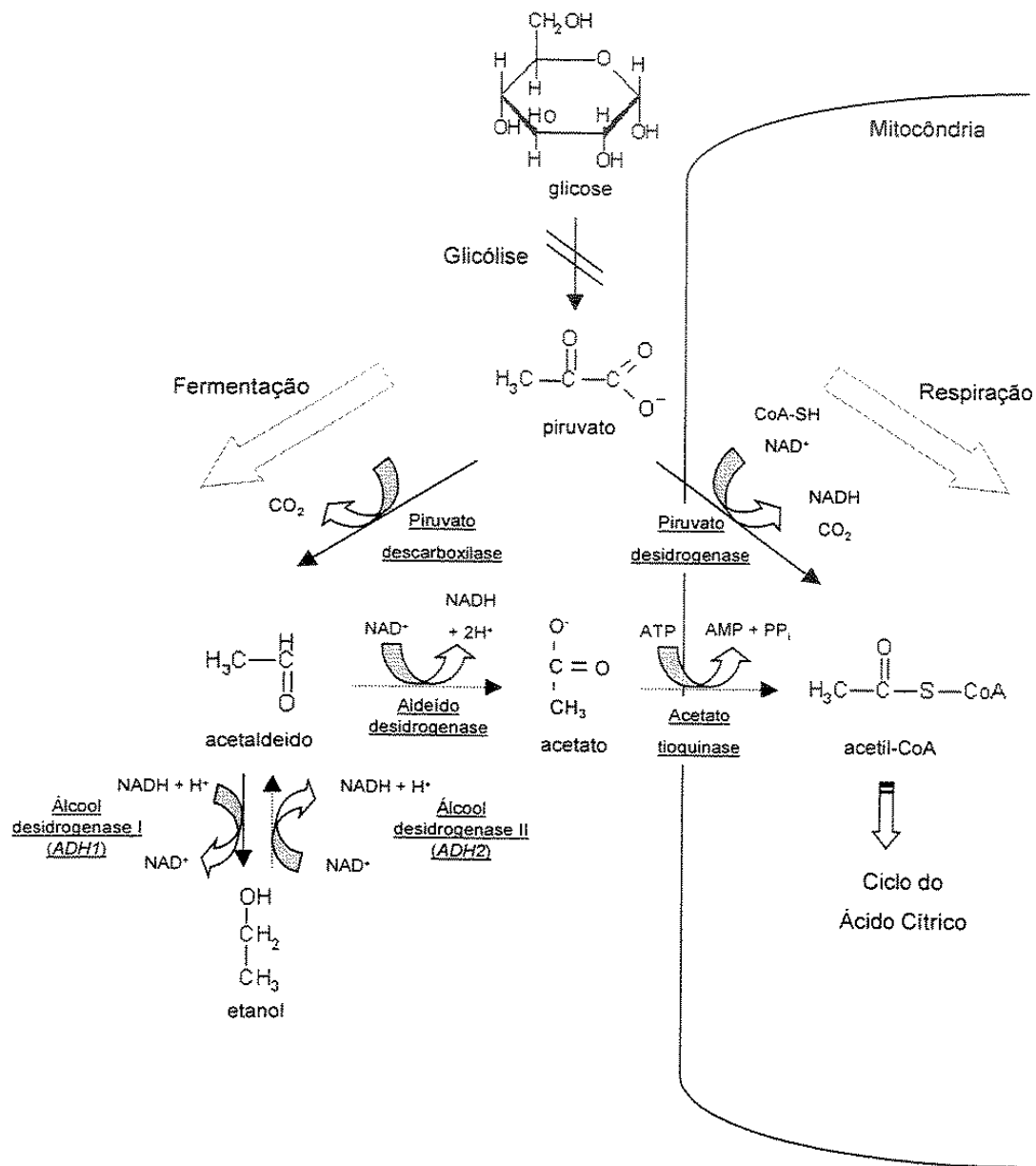


Figura 7 – Esquema da fermentação e da respiração. Fonte: Cunha, 2004.

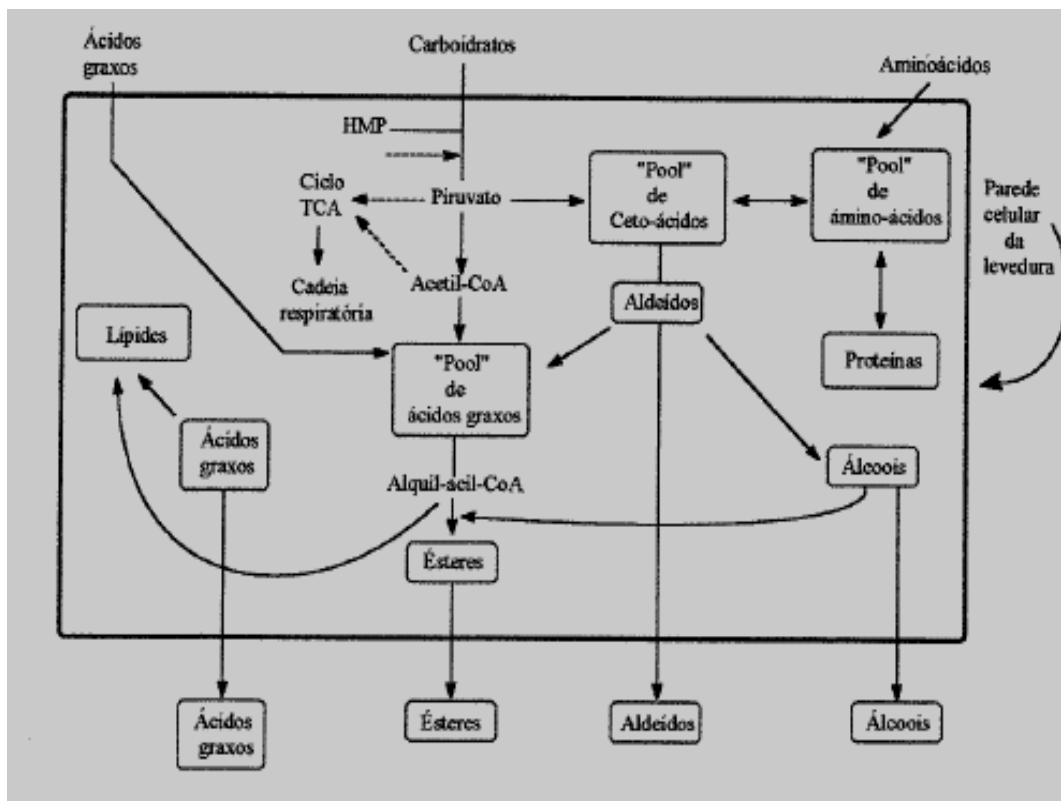


Figura 8 – Vias básicas para formação dos compostos do sabor durante a fermentação. Fonte: Berry, 1995; citado por Oliveira, 2001.

Compostos carbonílicos, tais como o diacetil e aldeídos, compõem a fração mais volátil das bebidas alcoólicas (Oliveira, 2001). De modo geral, os aldeídos com até 8 átomos de carbono têm aroma penetrante e geralmente enjoativo, e são considerados indesejáveis em bebidas destiladas. O principal aldeído associado à fermentação alcoólica é o acetaldeído (Maia, 1994). O acetaldeído, junto com os 2-cetoácidos, são compostos chave nas reações bioquímicas de produção de álcoolis fúsel a partir de aminoácidos e açúcares, pelas leveduras. São formados dentro das células e então transferidos ao meio de fermentação (Oliveira, 2001).

O acetaldeído é formado no penúltimo estágio da via glicolítica (Figura 7). Além de ser reduzido a etanol, uma pequena parcela do acetaldeído produzida é oxidada a ácido acético, reação esta influenciada pela concentração do etanol presente (Macdonald et al., 1984 citado por Oliveira, 2001).

Segundo Yokoya (1995), outros aldeídos além do acetaldeído podem ser obtidos, provavelmente, a partir da oxidação de alcoóis superiores provenientes da degradação de aminoácidos gerados pela hidrólise de proteínas (Figura 9). O furfural e o hidroximetilfurfural, aldeídos de presença rara em algumas cachaças, são resultantes da decomposição química de carboidratos. Estes compostos podem aparecer no caldo de cana-de-açúcar, quando a colheita da cana-de-açúcar é precedida da queima da folhagem, o que acarreta a desidratação parcial de uma pequena fração de açúcares presentes (Cardoso, 2006).

A desidratação parcial de pentoses produz o 2-furfuraldeído (furfural) e a desidratação de hexoses leva a formação do 5-hidroximetil-2-furfuraldeído ou hidroximetilfurfural (Novaes et al., 1974 citado por Oliveira, 2001). Estes compostos, principalmente o furfural, podem ser formados, também, pela pirogenação da matéria orgânica depositada no fundo de alambiques. A sua formação é evitada pela destilação do vinho limpo, livre de substâncias orgânicas em suspensão. Nas cachaças envelhecidas, o furfural pode ser oriundo da ação de ácidos sobre pentoses e seus polímeros, como hemiceluloses (Yokoya, 1995).

Os ácidos orgânicos encontrados nas bebidas alcoólicas são importantes sob vários aspectos. Primeiro, são componentes de um dos principais grupos do sabor. Todos ácidos orgânicos têm o atributo da acidez em grau variado, mas alguns têm suas características próprias de sabor. Por exemplo, o ácido cítrico tem um sabor “ácido fresco”. Em segundo lugar, os ácidos diferem muito na sua utilização metabólica por microrganismos, particularmente pelas bactérias lácticas; o ácido succínico não é facilmente metabolizado anaerobiamente, enquanto o ácido málico e cítrico são prontamente metabolizados anaerobiamente (Oliveira, 2001).

Entre os ácidos orgânicos, produtos secundários da fermentação alcoólica, o ácido acético tem sido, quantitativamente, o principal componente da fração ácida das aguardentes, expresso em acidez volátil (Cardoso et al., 2005).

O termo acidez volátil está completamente difundido, mas refere-se a compostos que podem ser vaporizados com o álcool e água e coletados no destilado, apesar de apresentarem ponto de ebulição mais alto do que a água. Na acidez volátil das bebidas alcoólicas, além do ácido acético e láctico, que são subprodutos normais da fermentação alcoólica, estão presentes, também, os ácidos fórmico, butírico, propiônico, e outros



em quantidades ínfimas (Oliveira, 2001).

A produção de compostos que fazem parte da acidez volátil depende do processo fermentativo, e o controle dos fatores: cepa da levedura utilizada, pureza da fermentação, tempo, temperatura da fermentação, manejo do mosto e, principalmente, higienização, são essenciais para minimizar a ocorrência dos mesmos (Pereira et al., 2003).

Processos fermentativos realizados por culturas homogêneas de leveduras produzem menor quantidade de acidez volátil quando comparados aos processos naturais de fermentação. Por este motivo, fermentações alcoólicas conduzidas em boas condições de higiene proporcionam a produção de cachaças com acidez relativamente baixa (Lima e Nóbrega, 2004).

A acidez de uma cachaça é de grande importância, constituindo um fator de qualidade, uma vez que, durante sua produção, os ácidos reagem com os alcoóis presentes, aumentando a formação dos ésteres, que são um dos constituintes responsáveis pelo aroma. No entanto, o excesso de acidez promove sabor indesejado e ligeiramente “agressivo” na cachaça, depreciando a qualidade da bebida (Cherubin, 1998). Altas concentrações de ácido acético provocam sensações de ardor na garganta e odor de vinagre (Lima e Nóbrega, 2004). Tal característica pode ser proveniente de fermentações alcoólicas contaminadas com bactérias acéticas (Crispim, 2000).

A contaminação por bactérias acéticas e outras, pode ser atribuída à contaminação da cana-de-açúcar ou do próprio mosto fermentativo, seja na estocagem ou no próprio caldo, elevando, assim, a acidez e diminuindo o rendimento da produção de etanol (Cardoso, 2006). O ácido acético é produzido pela oxidação do acetaldeído (Berry, 1995).

A formação de ésteres, pelas leveduras, é extensamente discutida na literatura. A Figura 8 ilustra, de forma resumida, as diversas rotas de formação dos ésteres pelas leveduras. A quantidade de ésteres específicos produzidos é dependente da abundância relativa dos alcoóis correspondentes e da acil-CoA produzida pelas leveduras. Desde que a acetil-CoA e o etanol são os mais abundantes, o acetato de etila é normalmente o éster predominante (Berry, 1995).

O acetato de etila é, também, formado por reações químicas durante o armazenamento das bebidas alcoólicas. Parazzi et al., (2008) observaram um aumento significativo nos teores de acetato de etila em função do tempo de

armazenamento. Tais incrementos ocorrem por meio de reações de esterificação, entre alcoóis e ácidos carboxílicos durante o processo oxidativo (Cardoso, 2006).

O aroma típico, agradável, pungente e suave que a aguardente adquire com o envelhecimento deve-se, principalmente, à formação de ésteres relativamente aromáticos, os quais contribuem para a formação do buquê (Cardoso, 2006).

Segundo Lima et al. (2006), os principais alcoóis superiores produzidos por leveduras são os alcoóis alifáticos, n-propanol, iso-butanol (2-metil-1-propanol), álcool amílico ativo (2-metil-1-butanol) e álcool iso-amílico (3-metil-1-butanol). De acordo com Gutierrez (1993), a formação de alcoóis superiores por leveduras ocorre a partir do desvio do metabolismo dos aminoácidos, ocasião em que o ceto-ácidos envolvido é descarboxilado a aldeído, com posterior redução, por meio da enzima álcool desidrogenase, a álcool superior (Figura 8). A formação de alcoóis superiores a partir dos aminoácidos ocorre através de reações de desaminação e descarboxilação. Esse processo é conhecido como via catabólica de Ehrlich (Figura 9).

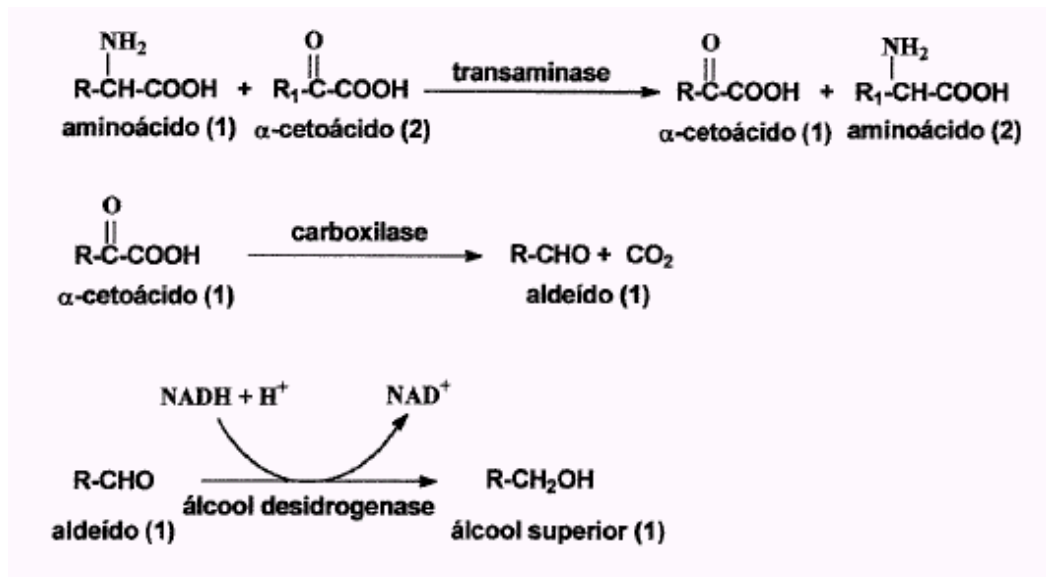


Figura 9 – Esquema de formação de álcoois superiores nas leveduras pela via de Ehrlich (catabólica). Fonte: Oliveira, 2001.

Os alcoóis com até cinco átomos de carbono apresentam odores característicos (buquê) tradicionalmente associados com bebidas destiladas. Eles são responsáveis diretos pelo odor da bebida, possuindo aromas característicos, destacando-se os alcoóis amílico e propílico, e seus respectivos isômeros. Com o aumento do número de carbonos, o aroma modifica-se substancialmente e os alcoóis tornam-se oleosos, chamado óleo fúsel. Alguns deles lembram fortemente o aroma de flores (Cardoso, 2006).

Os alcoóis fúsel têm um aroma característico e exercem uma grande influência no sabor das bebidas destiladas, sendo indesejável sua presença em cachaça. O termo fúsel refere-se ao gosto e aroma de queimado destes alcoóis (Oliveira, 2001).

#### **2.1.4.1 – Propagação do Fermento**

A levedura utilizada no processo de fermentação deve apresentar determinadas características que garantam o rendimento fermentativo. Entre as características pretendidas, a cepa de levedura escolhida deverá apresentar alta velocidade de fermentação, boa tolerância ao álcool, resistência à acidez e à temperatura elevada e estabilidade genética (Mutton e Mutton, 2005).

A Grande maioria dos produtores de cachaça não trabalha com cepas de leveduras isoladas, mas sim, com um grupo de cepas, normalmente, conhecidas como “pé de cuba”. Na prática, os fermentos mais utilizados são: fermentos naturais (selvagens), fermentos prensados, fermentos mistos e fermentos secos (granulados). O fermento natural (selvagem) é constituído por células de leveduras que já estão naturalmente adaptadas ao ambiente. Vivem na superfície dos colmos da cana-de-açúcar. Pelo fato de não terem sofrido alterações genéticas programadas ou melhoramentos, são chamadas leveduras naturais, nativas ou selvagens (Schwan et al., 2006).

O inóculo natural, chamado “pé de cuba” é usualmente preparado pelo método conhecido como fermento caipira, que consiste em uma mistura de caldo de cana-de-açúcar não diluído, farelo de arroz, fubá ou farelo de soja, com adição de suco de limão ou laranja azeda para abaixar o pH. São feitas adições diárias de caldo de cana-de-açúcar no período de cinco a sete dias, quando as leveduras estão se reproduzindo e o volume de massa celular está

aumentado (Ribeiro, 2002). Desta forma, o inóculo é obtido a partir da fermentação espontânea dos microrganismos presentes no caldo da cana-de-açúcar, nos equipamentos e nas dornas de fermentação. Nas fermentações espontâneas, um grande número de espécies de microrganismos pode estar envolvido, com predominância de *Saccharomyces cerevisiae* (Pataro et al., 2000).

Para que ocorra uma multiplicação vigorosa das células é necessário que as exigências nutricionais das leveduras sejam supridas, permitindo assim a reprodução e garantindo a viabilidade celular (Schwan et al., 2006). Dentre os nutrientes requeridos pelas leveduras, e freqüentemente presentes na cana-de-açúcar em quantidades insuficientes, encontram-se substâncias minerais e algumas orgânicas. As substâncias orgânicas requeridas são as vitaminas e ácidos graxos insaturados que são responsáveis pela manutenção da fisiologia celular (Lima, 2001).

Além dos requerimentos nutricionais, fatores físico-químicos, a concentração de substrato e a presença de microrganismos contaminantes podem afetar a fermentação alcoólica, diminuindo a eficiência do processo fermentativo ou a qualidade do produto final (Schwan et al., 2006). Por exemplo:

#### **A) Aeração e agitação na fermentação alcoólica**

Para preparação de culturas “starter” (ou inóculo) e no controle da fermentação alcoólica, é importante considerar a função do oxigênio no controle do metabolismo e crescimento da levedura (Henick-Kling, 1988 citado por Malta, 2006). A levedura possui dois tipos de metabolismo celular: oxidativo e fermentativo. O metabolismo oxidativo ocorre na presença de oxigênio, quando a levedura oxida os carboidratos por respiração, estimulando, assim, sua multiplicação intensa (Schwan et al., 2006). O metabolismo celular oxidativo permite uma maior produção de biomassa, e a síntese de materiais de reserva, como esteróis e ácidos graxos. Desta forma, a aeração é usada na preparação de culturas “starter” quando uma quantidade maior de biomassa é requerida (Henick-Kling, 1988 citado por Malta, 2006).

#### **B) pH do mosto durante a fermentação alcoólica**

Existe uma correlação entre acidez ionizável do mosto e a velocidade de crescimento da levedura (Oliveira et al., 2005). A acidez ionizável de um meio pode ser definida como sendo a concentração hidrogeniônica desse meio e essa concentração hidrogeniônica efetiva de uma solução é expressa em termos de

pH (potencial hidrogeniônico), que para fins didáticos, considera-se a atividade de  $H^+$  como a própria concentração hidrogeniônica (Gomes, 2003). As leveduras atingem seu ótimo crescimento entre pH 5,0 e 6,0. Para a produção de cachaça, o pH do mosto durante a fermentação deve situar-se na faixa de 4,0 a 5,0. Uma colheita cuidadosa, sem queimar a cana-de-açúcar, uma boa limpeza e diluição do caldo, um acompanhamento da vitalidade do fermento e ajustamento da quantidade do “pé-de-cuba”, são cuidados que, normalmente, suprem a necessidade de correção do pH (Oliveira et al., 2005).

### **C) Temperatura nas dornas de fermentação**

Pataro *et al.* (1998) estudaram o crescimento de 210 linhagens de leveduras isoladas de uma indústria de cachaça de alambique do Estado de Minas Gerais. A maioria das linhagens foi fisiologicamente adaptada às condições ambientais observadas nas dornas de fermentação. Elas foram capazes de crescer a 35 °C, em meio contendo até 25% de glicose e em concentração de 5 % (v/v) de etanol.

De modo geral, o crescimento das leveduras ocorre entre (20-30) °C e a fermentação na faixa (30-40) °C. É importante que o produtor fique atento à evolução do processo em sua própria fábrica. Existem centenas de cepas distintas, que respondem de modo característico às peculiaridades de cada região (Maia e Campelo, 2006). Stupiello e Horii (1981) afirmam que a reprodução de células pode ocorrer em temperaturas máximas próximo a 38 °C, havendo inibição da multiplicação a 40 °C e na presença de 8 a 9 % v/v de etanol.

### **D) Contaminantes durante extração e fermentação do caldo**

Certa presença de bactérias no mosto é inevitável (a menos que o caldo seja esterilizado, o que não é prática comum). Mas, se as bactérias nocivas tiverem seu crescimento favorecido, podem comprometer seriamente a fermentação, a composição química e as características sensoriais do mosto fermentado e da cachaça (Maia e Campelo, 2006). As bactérias podem desviar os açúcares usados pelas leveduras para outras vias metabólicas, resultando na formação de diversos compostos como os ácidos láctico, acético, fórmico e butírico, os aldeídos e os ésteres. Estes, além de reduzirem o rendimento alcoólico, provocam alterações nas propriedades sensoriais da cachaça, com conseqüente depreciação do produto (Pataro et al., 2002).

As bactérias lácticas podem se multiplicar ao final da fermentação, utilizando o etanol como fonte de energia. No mosto, a presença dessas bactérias é devido à sua resistência a altas temperaturas e baixos valores de pH. Isso faz com que, ao final da fermentação, as bactérias lácticas possam produzir compostos secundários que irão aumentar os níveis de acidez da cachaça (Pataro et al., 2002).

#### **E) Fonte de Carbono na produção de cachaça**

A concentração de açúcar no caldo de cana-de-açúcar deve ser diferente nas duas etapas distintas do processo fermentativo. A primeira está relacionada com a propagação das leveduras que é feita sob intensa aeração. Normalmente é recomendado que o teor de açúcar não seja superior a (2-3) % (p/v), já que concentrações mais altas prejudicam a respiração da célula, que é indispensável para um crescimento eficiente. A segunda etapa está relacionada com a fermentação propriamente dita, ou seja, a conversão de açúcar em etanol e CO<sub>2</sub>. Nesta etapa, o teor médio de açúcar tolerado pela levedura é em torno de 15% (p/v). Este limite pode ser variável de acordo com a levedura e as demais condições do processo fermentativo (Schwan e Castro, 2001).

O efeito “Crabtree” é descrito como o efeito repressor da atividade respiratória pela glicose livre. Assim, cepas de *S cerevisiae* seriam “sensíveis” à glicose, pois em concentrações de 100 a 200 mg/L já é iniciada a fermentação (Maia, 2002). Devido à formação de etanol diminuir o rendimento em biomassa, é necessário controlar a taxa de alimentação de açúcar, nas dornas de propagação ou na preparação do “pé-de-cuba”, para minimizar a produção de etanol. Desta forma, a concentração de açúcar é o parâmetro principal para efetiva produção de massa celular de levedura (Miskiewicz e Kasperski, 2000).

#### **F) Fonte de Nitrogênio na produção de cachaça**

As leveduras geralmente podem sintetizar todos os aminoácidos e bases nitrogenadas necessárias para seu crescimento celular a partir do íon amônio. O crescimento é acelerado quando aminoácidos são disponibilizados no meio de crescimento. Estes são utilizados na síntese de enzimas celulares e componentes estruturais (Henick-Kling, 1988 citado por Malta, 2006). No entanto, Alves (1994) descreve que a utilização de sulfato de amônio como fonte nitrogenada resulta em maior acidez do meio, que embora possa favorecer o controle da contaminação bacteriana (e conseqüente redução da formação de ácido láctico e acético), causa

estresse à levedura, diminuindo a viabilidade e multiplicação.

A reprodução de cepas de *S. cerevisiae* varia em função do nível de nutrientes encontrados na matéria-prima (caldo de cana-de-açúcar), e dentre estes o nitrogênio é o que apresenta uma resposta mais significativa. A levedura não assimila, instantaneamente, o nitrogênio quando adicionado na forma de uréia ou sulfato de amônio (Pinotti, 1991 citado por Malta, 2006).

Jerônimo (2004) testou três fontes de nitrogênio protéico, dentre elas, um isolado protéico de soja (denominado comercialmente de SUPRO 780 – anteriormente denominado Samprosoy 90 LH produzido pela Bunge Alimentos), obtendo uma boa multiplicação e viabilidade da levedura, propiciando assim, melhor qualidade no fermento reciclado. Neste experimento, a viabilidade manteve-se elevada até o final do experimento (6 ciclos), e a massa celular produzida também. Segundo esta autora, o nitrogênio protéico original do caldo de cana-de-açúcar foi praticamente todo consumido, o que significa estar em forma assimilável pela levedura. Do ponto de vista nutricional da levedura, os resultados deste trabalho mostram que o nitrogênio protéico presente no caldo é insuficiente para suprir a nutrição da levedura durante o período de fermentação.

#### **G) Fonte de Minerais na produção de cachaça**

As leveduras exigem diversos minerais. Estes possuem função importante no metabolismo celular, principalmente, devido à sua atuação como co-fatores de várias enzimas (Stehlik-Tomas *et al.*, 2004). Os íons metálicos são vitais para todos os organismos, e desta forma, fontes destes íons têm papel crucial na manutenção da homeostase. Todavia, quantidades excessivas de alguns destes elementos, são tóxicos e podem causar danos às células (Nelson, 1999 citado por Malta, 2006).

Segundo Lima (2001), a adição de sais minerais é vantajosa para corrigir deficiências que o caldo de cana-de-açúcar normalmente apresenta. De um modo geral, a adição não é feita em todo o volume do mosto, mas nos “pés-de-cuba”, ou periodicamente, nas dornas de fermentação.

#### **2.1.4.2 – *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação alcoólica**

As leveduras são tradicionalmente caracterizadas, classificadas e identificadas por meio de características morfológicas e fisiológicas. Para a

identificação específica, estudos bioquímicos e de exigências nutricionais são mais relevantes que traços morfológicos e sexuais, os quais são importantes na determinação genérica. Diferenças na fermentação e assimilação de compostos de carbono são critérios importantes na taxonomia e identificação de leveduras, pois estes microrganismos apresentam uma variação na habilidade de fermentação de açúcares. Alguns grupos apresentam fermentação vigorosa da glicose como *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Torulaspota* e *Zygosaccharomyces*, enquanto outros, como *Lipomyces* e *Sterigmatomyces* são estritamente não-fermentativos. Normalmente, apresentam habilidades de assimilar amônia, mas nem sempre de assimilar nitratos, nitritos, aminas ou alguns aminoácidos. Muitos gêneros como *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* e *Debaryomyces*, são caracterizados pela incapacidade de utilizar o nitrato, enquanto que nos gêneros *Hansenula*, *Pachysolen*, *Citeromyces* e *Wickerhamiella*, todas as espécies utilizam o nitrato. Entre as leveduras imperfeitas podem ocorrer linhagens nitrato-positivo, como nos gêneros *Cândida* e *Trichosporon* (Matienzo, 2002).

Métodos moleculares têm sido desenvolvidos recentemente com o propósito de apresentar um único padrão de DNA fingerprinting, sendo eles: PCR – Reação em cadeia da polimerase, PFGE – Eletroforese em gel de campo pulsado, RAPD – DNA polimórfico amplificado ao acaso e RFLP – Polimorfismo de tamanho de fragmento restrito. Entre estas técnicas, as mais utilizadas para identificação de cepas de levedura estão: PCR e RFLP de DNA mitocondrial e nuclear (Guimarães, 2005).

O gênero *Saccharomyces* vem tendo inúmeras mudanças taxonômicas ao longo dos anos. Quando a primeira publicação sobre taxonomia de leveduras foi realizada por Guilliermond, em 1912, o gênero *Saccharomyces* compreendia 46 espécies divididas em 06 grupos separados de acordo com a atividade fermentativa sobre os açúcares. Em 1952, o número total de espécies deste gênero foi reduzido a 30, uma vez que várias espécies foram agrupadas como sinônimos em *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* variedade *elipsoideus*, *Saccharomyces carlsbergensis* ou *Saccharomyces willianus*, enquanto novas espécies foram introduzidas ao gênero. Entretanto, várias outras divisões ocorreram e outras novas espécies foram descritas, obtendo-se como resultado, em 1970, 41 espécies dentro do gênero



*Saccharomyces* (Walt e Yarrow, citados por Guimarães 2005). Atualmente, de acordo com a última revisão taxonômica, 14 espécies são aceitas dentro do gênero *Saccharomyces* (Guimarães, 2005).

#### **2.1.4.3 – Processo Fermentativo**

O ideal é que a fermentação se encerre no intervalo de 14 a 18 horas, deixando 6 a 10 horas para as demais operações que acontecem dentro da dorna de fermentação (decantação do fermento, separação do vinho, revigoramento do “pé-de-cuba”), ficando, assim, todo o ciclo ajustado para ocorrer em um intervalo médio de 24 horas (Maia e Campelo, 2006). Em geral, a fermentação pode ser conduzida por três diferentes sistemas: “batelada-simples” (sistema descontínuo), “batelada-alimentada” (sistema semicontínuo) e contínuo. Os produtores de cachaça artesanal adotam, comumente, o sistema de “batelada-simples”, que consiste em colocar o inóculo e todo o meio a ser fermentado na dorna de fermentação. Após 24 horas, destila-se o vinho, inicia-se um novo ciclo, utilizando-se para isso o inóculo que permanece na dorna de fermentação, o “pé-de-cuba” (Pataro et al., 2002a).

O sistema batelada alimentada tem sido usado, atualmente, por alguns produtores de cachaça. Este processo consiste na transferência do caldo de cana-de-açúcar para a dorna já contendo as leveduras (“pé-de-cuba”), lentamente, em um intervalo de 6 a 8 horas. Este sistema é mais eficiente que a “batelada-simples”, quando o caldo é rapidamente transferido para a dorna de fermentação, prejudicando a atuação das leveduras que compõem o “pé-de-cuba” (Maia e Campelo, 2006).

#### **2.1.5 – Destilação do vinho**

A destilação consiste em aquecer um líquido até a fervura, gerando vapores que, ao serem condensados, constituirão um novo líquido, com teores mais altos dos componentes mais voláteis que o líquido original (Mutton e Mutton, 2005). Ao estilar o vinho da cana-de-açúcar, contendo aproximadamente 8,0% de etanol, obtém-se um novo líquido com teor alcoólico cinco a seis vezes mais alto, a cachaça. Na fabricação artesanal, a destilação é

feita em alambiques. Durante a destilação o vinho é separado em 4 frações: “cabeça”, “coração”, “cauda” e vinhoto. O “coração” é a fração que representa a cachaça, normalmente comercializada (Maia e Campelo, 2006).

O alambique pode ter diversas configurações, mas os componentes básicos são sempre: a panela onde se coloca o vinho a ser aquecido; a coluna, situada acima da panela, que recebe os vapores do vinho e a alonga. A alonga é ligada à parte mais alta da coluna, a partir da qual os vapores são resfriados, até serem recolhidos na extremidade inferior, já no estado líquido (Maia e Campelo, 2006).

Os aparelhos de destilação simples, os tradicionais alambiques, são construídos, principalmente, de cobre e os destiladores de colunas de aço inoxidável e cobre (Veiga, 2006). Mas, existem vários produtores de cachaça que usam aparelhos de destilação produzidos com panela feita em aço inoxidável contendo algumas peças em cobre, como o deflegmador e a serpentina, que compõem a coluna do destilador (Crispim, 2000).

O cobre metálico é insolúvel em água e em álcool. No entanto, em contato com ar úmido, ocorre a formação de carbonato e hidróxido de cobre que compõem o azinhavre (de cor azul-esverdeada). Esses componentes se acumulam no interior da alonga, e especialmente dentro da serpentina de resfriamento, sendo arrastados para a cachaça durante a destilação (Maia e Campelo, 2006).

Os alambiques tradicionais são aquecidos por fogo direto, utilizando, geralmente, o bagaço da própria cana-de-açúcar na queima. O controle do refluxo (“vômito do vinho”), porém, fica facilitado quando se emprega uma caldeira, que efetua o aquecimento do vinho mediante vapor. Este vapor atravessa uma espiral situada no fundo da panela. A panela é dotada de dispositivo para controle de temperatura e vazão e a caldeira permite ajustar a intensidade do aquecimento do vinho, dosando com precisão a quantidade de calor requerida em cada etapa (Maia e Campelo, 2006).

### **2.1.6 – Pós-Destilação do vinho**

Da destilação dos vinhos (caldo de cana-de-açúcar fermentado), obtém-se um produto constituído basicamente por água, alcoóis, aldeídos, ácidos,

etonas, ésteres, entre outros. Na sua composição média, predomina-se a água (59%), o álcool etílico (40%), além de 1% de outros compostos, como: acetaldeído, acetato de etila, propanol, butanol, isoamílico, amílico e, ácido acético, conhecidos por compostos majoritários (estão presentes em maiores concentrações), além dos minoritários (compostos sulfurados e nitrogenados). Esta bebida, recém-destilada, apresenta-se incolor, com gosto ardente, agressivo, sabor repugnante, além de buquê irregular, não sendo recomendado o seu consumo imediato (Mutton e Mutton, 2005).

A bebida obtida pela destilação deve ser armazenada com a finalidade de estabilização química, em recipientes de vidro, aço inox ou madeira (Crispim, 2000). Quando o armazenamento da bebida se dá em recipientes de vidro ou aço inox, diz que a mesma sofreu o processo de maturação. A maturação corresponde a um período de armazenamento, dois a seis meses, suficiente para suavizar (“amaciar”) o aroma e o sabor da cachaça. Quimicamente, o efeito decorre da oxidação dos aldeídos oriundos da fermentação e concentrados na destilação, principalmente o acetaldeído (Maia e Campelo, 2006).

O envelhecimento consiste no armazenamento do destilado em recipientes de madeira, de qualquer tipo (Mutton e Mutton, 2005). Durante o envelhecimento, que deve ser feito em recipientes com capacidade não superior a 700 litros, ocorrem reações químicas e alterações físicas que conferem à bebida qualidades (características) sensoriais que esta não possuía anteriormente. A citação dos diferentes tipos de envelhecimento no rótulo da cachaça (**Cachaça Envelhecida, Cachaça Premium e Cachaça Extra Premium**) só pode ser feito em produtos cujo processo de envelhecimento tenha sido acompanhado e certificado pela fiscalização do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA (Botelho, 2006).

O uso das expressões “Prata”, “Clássica” ou “Tradicional” refere-se aos produtos sem alteração visível na sua coloração após a destilação, que tenham sido armazenados em recipientes de madeira ou não. Já a expressão “Ouro” é dada para a cachaça que tenha sido armazenada em recipiente de madeira e com alteração da sua coloração (Botelho, 2006).

Após a maturação ou envelhecimento, dependendo da opção do produtor, a cachaça deverá ser padronizada por lotes e por safra. Por lote entende-se

“a quantidade de um produto elaborado em um ciclo de produção, identificado por número, letra ou a combinação de ambos, cuja característica é a homogeneidade” (Botelho, 2006). A safra e o conjunto dos lotes idênticos engarrafados a cada ano (Maia e Campelo, 2006).

Antes do engarrafamento, a bebida deve ser filtrada. A filtração consiste na passagem do destilado obtido, após destilação, por filtros ou membranas, com o objetivo de eliminar possíveis impurezas oriundas dos processos de armazenamento, preparo dos lotes e homogeneização, dando ao destilado maior limpidez, transparência e brilho, ou corrigir possíveis defeitos, como elevados teores de cobre (Maia e Campelo, 2006; Mutton e Mutton, 2005).

O engarrafamento é a operação que consiste no acondicionamento da aguardente em embalagens de volumes variáveis. Normalmente esse volume varia de 600 a 1.000 mL, e a embalagem, geralmente, é de vidro. Este processo pode ser manual ou mecânico, seguido do fechamento da garrafa com a tampa e a colocação do rótulo com as características da bebida, local de produção, grau alcoólico, identificação do produtor, entre outras informações. Comercializar a cachaça engarrafada agrega valor ao produto (Mutton e Mutton, 2005).

## **2.2 – Padrões de identidade e qualidade de aguardente**

A aguardente de cana e a cachaça estão submetidas à legislação nacional (BRASIL, 2005), de responsabilidade do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que estabelece os padrões de identidade e qualidade destes produtos, conforme descritos nas Tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3 – Padrões de identidade da aguardente de cana-de-açúcar e da cachaça

Componentes	Unidade	Limite	
		Mínimo	Máximo
Graduação alcoólica de aguardente	% em volume de álcool etílico a 20 °C	38	54
Graduação alcoólica de cachaça	% em volume de álcool etílico a 20 °C	38	48
Sacarose, em açúcar refinado, cristal, invertido ou glicose**	g.L <sup>-1</sup>	6,0	30,0
Congêneres*	mg.100mL <sup>-1</sup> álcool anidro	200	650
Álcool metílico	mg.100mL <sup>-1</sup> álcool anidro	---	20
Cobre	mg.L <sup>-1</sup>	---	5
Carbamato de etila	µg.L <sup>-1</sup>	---	150
Partículas em suspensão (resíduo sólido)	-----	ausentes	ausentes

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

\*\* Acima de 6 g.L<sup>-1</sup> (seis gramas por litro) deve aplicar a palavra “adoçada” no rótulo.

Fonte: BRASIL, 2005.

Tabela 4 – Limites para os congêneres estabelecidos pela legislação brasileira

Componente	Limite (mg.100 <sup>-1</sup> mL de álcool anidro)	
	mínimo	máximo
Acidez volátil, em ácido acético	---	150
Ésteres, em acetato de etila	---	200
Aldeídos, em acetaldeído	---	30
Furfural + Hidroximetilfurfural	---	5
Alcoóis superiores*	---	360

\*Alcoóis superiores = soma dos alcoóis isobutílico (2-metil-propanol), isoamílicos (2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol) e n-propílico (1-propanol).

Fonte: BRASIL, 2005.

Tabela 5 – Limites máximos permitidos de contaminantes na cachaça estabelecidos pela legislação brasileira

<b>Contaminante</b>	<b>Unidade</b>	<b>Limite Máximo</b>
Álcool metílico (metanol)	mg.100 mL <sup>-1</sup> de álcool anidro	20
Carbamato de etila*	µg.L <sup>-1</sup> da bebida	150
Acroleína (2-propenal)	mg.100 mL <sup>-1</sup> de álcool anidro	5
Álcool sec-butílico (2-butanol)	mg.100 mL <sup>-1</sup> de álcool anidro	10
Álcool n-butílico (1-butanol)	mg.100 mL <sup>-1</sup> de álcool anidro	3
Cobre	mg.L <sup>-1</sup> da bebida	5
Chumbo	µg.L <sup>-1</sup> da bebida	200
Arsênio	µg.L <sup>-1</sup> da bebida	100

\*entra em vigor a partir de julho de 2010.

Fonte: BRASIL, 2005.

A legislação brasileira admite uma concentração máxima de cobre de 5 mg/L (cinco miligramas por litro). O excesso de cobre pode ser tóxico devido à afinidade do cobre com grupos S-H de muitas proteínas e enzimas. Sua presença em excesso está associada a várias doenças, como a epilepsia, melanoma e artrite reumatóide, bem como à perda do paladar (Sargentelli, 1996).

Apesar de a legislação permitir a presença de metanol na cachaça, até 20 mg.100 mL<sup>-1</sup> de álcool etílico anidro, o ideal é que esteja ausente, visto sua toxicidade para o organismo humano. Esse álcool é originado da degradação da pectina, um polissacarídeo presente na cana-de-açúcar, cuja unidade monomérica é o ácido galacturônico (Cardoso et al., 2005). As pectinas naturais apresentam mais que 50% dos resíduos de ácido galacturônico esterificados com metanol, os quais são liberados durante o processo de fermentação (Raven et al., 2001). Os fatores que propiciam a formação do metanol são: queima da cana-de-açúcar para colheita, uso de acrescentar frutas ao caldo e limpeza inadequada do alambique, deixando resíduos de bagacilhos nas paredes internas do mesmo (Maia e Campelo, 2006).

O metanol é absorvido e metabolizado pelo organismo humano da mesma forma que o etanol. No organismo, o metanol é oxidado a ácido fórmico e posteriormente a  $\text{CO}_2$ , provocando uma acidose grave (diminuição do pH sanguíneo), afetando o sistema respiratório e podendo levar ao coma e até mesmo à morte (Cardoso et al., 2005). Um dos métodos de tratamento é utilizar doses elevadas de etanol, porque este compete com o metanol pela álcool-desidrogenase, impedindo a formação do aldeído e do ácido fórmico, que são os responsáveis pela intoxicação. Os sintomas de intoxicação pelo metanol são: cefaléia, vertigem, vômitos, dor intensa na porção superior do abdômen, dor nas costas, dispnéia, agitação motora e visão embaçada (Cardoso, 2006).

Os aldeídos são produtos normais da fermentação alcoólica (Yokoya, 1995), entretanto, a legislação estabelece um limite para estas substâncias, visto acarretarem problemas relacionados com o sistema nervoso central (Cardoso, 2006).

Os padrões de identidade e qualidade, estabelecidos pela legislação, com seus respectivos limites têm a finalidade de padronizar a cachaça e proteger a saúde do consumidor. Essa padronização é essencial para que a bebida atenda aos padrões internacionais de qualidade (Miranda, et al., 2007).

### 3. TRABALHOS

#### **TEORES DE COMPOSTOS ORGÂNICOS EM CACHAÇAS PRODUZIDAS NA REGIÃO NORTE FLUMIENSE - RJ**

**Leandro Marelli de Souza<sup>\*</sup> e Karla Silva Ferreira**

Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego, 2000, 28013-602, Campos dos Goytacazes – RJ.

**Luís César Passoni, Alice Barreto Bevitori e Karen Vieira Melo**

Departamento de Ciências Químicas, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego, 2000, 28013-602, Campos dos Goytacazes – RJ.

**Arivaldo Ribeiro Viana**

Estação Experimental de Campos, Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro, Avenida Francisco Lamego, 134, 28080-000, Campos dos Goytacazes – RJ.

---

\*e-mail: marelli@uenf.br



## RESUMO

Este trabalho teve o objetivo de quantificar alguns compostos orgânicos nas cachaças produzidas pelos cooperados da Cooperativa dos Produtores de Cachaça e Derivados da Cana-de-Açúcar do Norte Fluminense, do Estado do Rio de Janeiro. O álcool etílico foi quantificado por densimetria, após destilação. O ácido acético, metanol, 1-propanol, 1-butanol, iso-butanol, iso-amílico, acetato de etila e acetaldeído foram determinados por Cromatografia Gasosa (CG) e o furfural, 5-hidroximetilfurfural e acroleína por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Das 30 amostras analisadas, 63,3% delas apresentaram não conformidade com a legislação nacional em pelo menos um dos componentes analisados. Deste total, o grau alcoólico real, com 30% das amostras abaixo do mínimo permitido, e a soma dos compostos 5-hidroximetilfurfural e furfural, também com 30% das amostras acima do máximo permitido, foram os parâmetros com maiores índices de irregularidades. O ácido acético e 1-butanol apresentaram teores acima do máximo permitido em 13,3% e 10% das amostras, respectivamente. Os compostos metanol e acroleína, assim como, alcoóis superiores, não atenderam a conformidade em 3,3% das amostras. Todas as amostras estão com níveis de acetaldeído e acetato de etila dentro do limite permitido pela legislação.

Palavras-chave: aguardente, alcoóis, bebida.

## ABSTRACT

This work aimed to quantify some organic compounds in “cachaças” (sugar cane spirit) produced by the cooperators from the North part of Rio de Janeiro state “Cachaca” and Sugar-Cane Derivatives Producers Cooperative. The ethyl alcohol was quantified by densimetry, after distillation. The acetic acid, methyl alcohol, n-propyl alcohol, n-butyl alcohol, isobutyl alcohol, isoamyl alcohol (mixture of 2-methyl-butyl and 3-methyl-butyl), ethyl acetate and acetaldehyde were determined by Gas Chromatography (GC) and the furfural, 5-hydroxy-methylfurfural and acrolein by High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

From the 30 samples analyzed, 63.3% showed non-conformity with national legislation regarding at least one of the analyzed components. From this total, the real alcoholic degree – being 30% of the samples below the minimum permitted - and the sum of 5-hydroxy-methylfurfural and furfural compounds - having 30% of the samples above the maximum permitted – were the parameters with greater irregularities rates. The acetic acid and n-butyl alcohol presented contents above the maximum permitted level in 13.3% and 10% of the samples, respectively. The methyl alcohol and acrolein compounds, as well as superior alcohols, did not show conformity in 3.3% of the samples. All the samples present acetaldehyde and ethyl acetate within the limit permitted by legislation.

Key-words: spirits, alcohols, beverages

## INTRODUÇÃO

A produção de cachaça representa um importante segmento do setor industrial brasileiro de bebidas, sendo a segunda bebida alcoólica mais apreciada no Brasil, perdendo apenas para a cerveja. O PIB do setor é de cerca de US\$ 500 milhões. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, são produzidos, aproximadamente, 1,4 bilhões de litros de cachaça por ano no Brasil.<sup>1</sup> Em 2007 foram exportados 9,0 milhões de litros, gerando uma arrecadação de, aproximadamente, 13,8 milhões de dólares.<sup>2</sup>

Existem mais de quatro mil marcas registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e mais de 30 mil produtores em todo País, gerando aproximadamente 400 mil empregos diretos e indiretos.<sup>1</sup> Dentre estas empresas, destacam-se as micro, pequenas e médias empresas.<sup>3</sup>

Durante a fermentação alcoólica ocorre formação de dois produtos principais: álcool etílico e dióxido de carbono. Além desses, há, normalmente a formação de pequenas quantidades de outros componentes, os quais recebem a denominação de produtos secundários da fermentação alcoólica, tais como ácidos carboxílicos, ésteres, aldeídos e alcoóis superiores.<sup>4</sup>

A cachaça é regulamentada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da Instrução Normativa N°13<sup>5</sup>. Tal Normativa estabelece a composição química, os requisitos de qualidade e a concentração

máxima permitida de contaminantes, como cobre e carbamato de etila. Os padrões de identidade e qualidade, estabelecidos pela legislação, com seus respectivos limites têm a finalidade de padronizar a cachaça e proteger a saúde do consumidor. Essa padronização é essencial para que a bebida atenda aos padrões internacionais de qualidade e seja aceita pelo mercado externo, proporcionando condições de abertura e manutenção do mercado de exportação,<sup>6</sup> além de proporcionar aceitação, no mercado interno, pelas classes de maior poder aquisitivo, as quais exigem bebidas com maior controle de qualidade.

A região Norte do Estado do Rio de Janeiro se destaca pelo plantio de cana-de-açúcar. Além da produção de açúcar e álcool por grandes usinas, há vários produtores de cachaça. Grande parte deles são cooperados da Cooperativa dos Produtores de Cachaça e Derivados da Cana-de-Açúcar do Norte Fluminense (COOPCANF). Este estudo objetiva-se quantificar alguns compostos orgânicos em cachaças produzidas por estes cooperados e avaliar sua conformidade com os padrões de identidade e qualidade estabelecidos pela legislação vigente.

## **PARTE EXPERIMENTAL**

### **Amostras**

Foram coletadas 30 amostras de volume variando entre 600 mL a 1000 mL de cachaça de dezesseis associados da Cooperativa dos Produtores de Cachaça e Derivados da Cana-de-Açúcar do Norte Fluminense (COOPCANF) do Estado do Rio de Janeiro que estavam produtivos ou que tinham produtos no mercado, no segundo semestre de 2006 e primeiro semestre de 2007. As amostras foram adquiridas por meio de compra no comércio de Campos dos Goytacazes – RJ ou diretamente nos alambiques. O número de amostras de cada Marca variou de uma a seis amostras, dependendo da existência de cachaças com diferentes características na época da pesquisa. Na Tabela 1 estão descritas as características de cada amostra.

Tabela 1 – Relação das amostras de cachaça analisadas, respectivas indústrias e o critério de diferenciação

Indústria	Amostras	Critério de diferenciação
Marca 1	1	Prata, armazenada por seis meses em reservatório de aço carbono.
	2	Prata, armazenada por um ano em reservatório de aço carbono.
	3	Prata, armazenada por dois anos em reservatório de aço carbono.
	4	Prata sem identificação quanto ao ano de produção.
	5	Armazenada por dois anos em barril de cerejeira.
	6	Armazenada por dois anos em barril de carvalho.
Marca 2	7	Armazenada por um ano em barril de carvalho e produzida em 2006.
	8	Armazenada por dois anos em barril de carvalho e produzida em 2005.
	9	Armazenada por dois anos em barril de carvalho e produzida em 2001.
Marca 3 (Orgânica)	10	Armazenada por uma semana em barril de balsamo.
	11	Blend (safra 2006 com 2007) e armazenada em barril de balsamo.
	12	Armazenada por quatro anos em barril de carvalho.
	13	Armazenada em barril de carvalho (tempo não especificado).
Marca 4	14	Armazenada por dois anos em barril de carvalho.
	15	Armazenada por quatro anos em barril de carvalho.
	16	Armazenada por cinco anos em barril de carvalho.
Marca 5	17	Prata produzida em 2007.
	18	Safra 2006, armazenada por um ano em barril (madeira desconhecida).
	19	Envelhecida (madeira e tempo desconhecidos).
Marca 6	20	Prata produzida no ano de 2006.
Marca 7	21	Prata produzida no ano de 2006.
Marca 8	22	Armazenada em barris de balsamo e carvalho por tempo desconhecido.
Marca 9	23	Prata produzida no ano de 2006.
Marca 10	24	Prata sem identificação quanto ao ano de produção.
Marca 11	25	Prata sem identificação quanto ao ano de produção.
Marca 12	26	Prata sem identificação quanto ao ano de produção.
Marca 13	27	Prata sem identificação quanto ao ano de produção.
Marca 14	28	Envelhecida (madeira e tempo desconhecidos).
Marca 15	29	Prata produzida no ano de 2007.
Marca 16	30	Prata produzida no ano de 2002.

## Reagentes e padrões

Os padrões metanol, etanol, 1-propanol, 1-butanol, iso-butanol, iso-amílico, acetato de etila, acetaldeído e ácido acético foram de grau cromatográfico (Fluka e Sigma) e acroleína (Fluka), furfural e 5-hidroximetilfurfural (Chem service).

O reagente 2,4-dinidrofenilidrazina (Chem Service) foi purificado por três sucessivas recristalizações em etanol. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico (Merck e Sigma).

## Metodologias analíticas

A quantificação do teor alcoólico real foi realizada por densimetria após destilação, de acordo com o Manual de Métodos de Análises de Bebidas e Vinagres do Ministério da Agricultura.<sup>7</sup>

O ácido acético, metanol, 1-propanol, 1-butanol, iso-butanol, iso-amílico (3-metil-1-butanol + 2-metil-1-butanol), acetato de etila e acetaldeído foram determinados diretamente, sem concentração prévia da amostra, por cromatografia gasosa (*GC = Gas Chromatography*), usando cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-17A, equipado com um detector de ionização em chama (*FID = Flame ionization detection*) e separados em uma coluna capilar polar LM-100, série CB (35 m x 0,25 mm x 0,25 µm). As temperaturas do detector e do injetor foram fixadas em 250°C e o modo de injeção com divisão de fluxo (*split*) de 1:25 com um volume de injeção de 1,00 µL da amostra (cachaça). Todas as análises, tanto das curvas analíticas, quanto das amostras, foram feitas em duplicatas, e quando apresentavam discrepância, em triplicatas. O fluxo do gás de arraste na coluna (H<sub>2</sub>) foi de 1,0 mL/min. A temperatura da coluna seguiu uma programação. O programa de temperatura utilizado na coluna foi: 35°C (isoterma de 7 min), 7°C/min até 90°C (isoterma de 5 min), e 15 °C/min até 120 °C (1,0 min).

As curvas analíticas foram preparadas contendo cinco pontos, nas seguintes faixas de concentração, em mg.100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro: acetaldeído (7,5 a 37,5), acetato de etila (50 a 250), metanol (5 a 25), 1-propanol (30 a 150), iso-butanol (30 a 150), 1-butanol (0,75 a 3,75),

iso-amílico (30 a 150) e ácido acético (37,5 a 187,5) em meio hidroalcoólico (etanol 40% v/v), procurando-se reproduzir as condições da matriz analisada. Utilizou-se a regressão linear, plotando-se a relação área dos picos dos padrões/área do padrão interno versus concentração. Os coeficientes de correlação foram sempre bem próximos à unidade. O 4-metil-2-pentanol, grau UV/HPLC foi o padrão interno usado.

O cromatograma dos padrões do acetaldeído, acetato de etila, ácido acético, os alcoóis (metanol, etanol, 2-butanol, 1-propanol, iso-butanol, 1-butanol e iso-amílico) e o padrão interno 4-metil-2-pentanol obtidos por cromatografia gasosa (*GC = Gas Chromatography*), equipado com um detector de ionização em chama (*FID = Flame ionization detection*) em uma coluna capilar polar LM-100 e a identificação dos picos encontram-se na Figura 1.

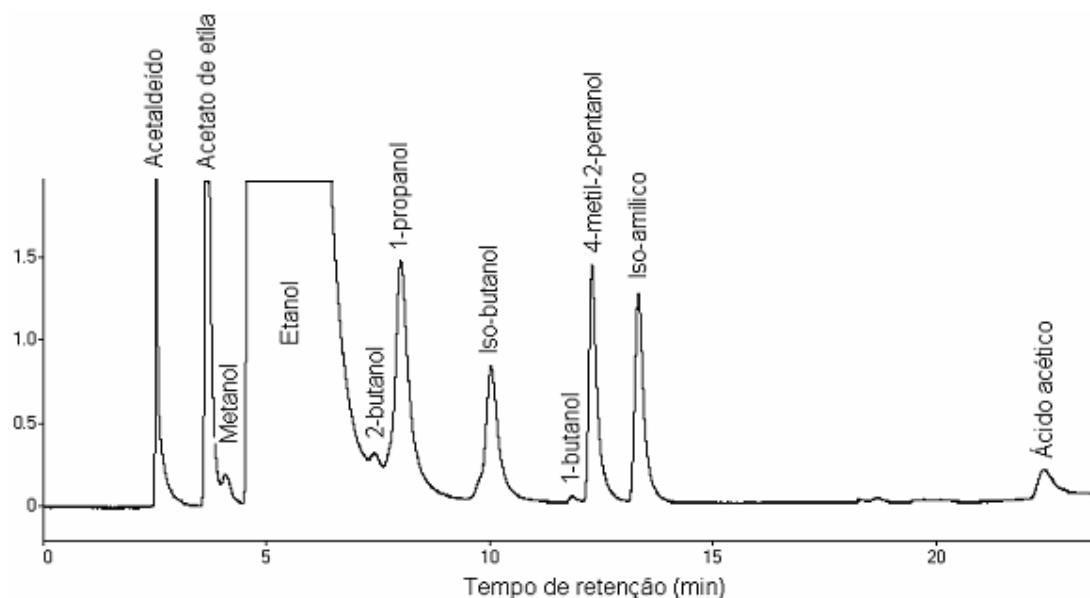


Figura 1 - Cromatograma dos padrões obtido por GC-FID em coluna polar LM-100.

Os compostos acroleína, furfural e 5-hidroximetilfurfural foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*HPLC = High Performance Liquid Chromatography*) em Cromatógrafo Shimadzu (modelo LC-10AD), com Injetor Shimadzu (loop de 20  $\mu$ L), detector espectrofotométrico UV-Visível, (modelo SPD-M10A) e coluna SUPELCOSIL<sup>TM</sup> LC-18 (5 micra),

com 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno. Todas as amostras e fase móvel foram degaseificadas em lavadora ultra-sônica, marca Ultra Sonic Cleaner. Aproximadamente, 1,0 mL de cada amostra, no momento da injeção, foi filtrado em filtro PTFE para filtrações de solventes orgânicos, com 0,45 micra de diâmetro de poro, marca Millipore. Todas as injeções, tanto das curvas analíticas, quanto das amostras, foram feitas em duplicatas, e quando apresentavam discrepância, em triplicatas, com um volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ .

A fase móvel usada foi metanol:água. O metanol de grau UV/HPLC e a água utilizada purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore - Bedford, USA). O gradiente de eluição empregado foi metanol:água (65:35 v/v) por 5 min, metanol:água (85:15 v/v) em 10 min e metanol:água (65:35 v/v) em 15 min e o fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. Os derivados foram quantificados a 365 nm e o tempo de corrida foi de 15 min.

Os derivados carbonílicos da 2,4-dinitrofenilidrazina (2,4 DNPH) foram obtidos conforme descritos anteriormente,<sup>8</sup> com modificações. Para cada um dos padrões pesou-se 0,40 g de 2,4 DNPH, posteriormente, dissolvidos em ácido sulfúrico concentrado (2,0 mL) e água destilada (3,0 mL). Nestas soluções foram adicionados 0,10 g de cada padrão, dissolvido em etanol (15,0 mL). Os padrões 5-hidroximetilfurfural e acroleína, com pureza de 99,5% e furfural com 98,9%. Este material foi centrifugado a 1800 RPM por 5,0 minutos e sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com 5,0 mL de etanol absoluto e centrifugado a 1800 RPM durante 5,0 minutos. Esse processo foi repetido por duas vezes. Após a centrifugação, o precipitado foi deixado durante quatro dias em temperatura de 30 °C, dentro de um béquer coberto com filme plástico com pequenos furos, para a evaporação do etanol. Este material foi diluído em etanol-água (40:60 v/v) para o preparo da solução estoque de acroleína-DNPH, furfural-DNPH e 5-hidroximetilfurfural-DNPH com concentração 1000 mg.L<sup>-1</sup>. As curvas analíticas foram construídas usando-se cinco pontos com faixa de concentração de 5 a 25 mg.L<sup>-1</sup>. Para a análises destes compostos nas cachacas, 4,0 mL de cada amostra foi colocada em tubo de ensaio de 50 mL, adicionando-se 1,00 mL de solução 0,4% de 2,4-DNPH diluído em acetonitrila e 50,0  $\mu\text{L}$  de HClO<sub>4</sub> 1,0 mol.L<sup>-1</sup>. A solução resultante foi agitada e mantida à temperatura ambiente por 40 minutos até a injeção no cromatógrafo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 são apresentados os valores máximos, mínimos, médio e desvio padrão dos componentes detectados nas amostras de cachaça e na Tabela 3 o número e percentagem de amostras que não atendem aos parâmetros de identidade e qualidade segundo a Instrução Normativa N° 13.<sup>5</sup> A Figura 2 ilustra o grau alcoólico das diferentes amostras analisadas.

Tabela 2 – Limites máximos e mínimos, composição físico-química, média e desvio padrão dos componentes analisados

Componentes	Unidades	Limites*		Valor máximo <sup>1</sup>	Valor mínimo <sup>1</sup>	Valor médio ± desvio padrão
		Mínimo	Máximo			
Grau alcoólico	% em volume de álcool etílico a 20 °C	38	48	46,0	32,0	38,8 ± 2,7
Furfural+ hidroximetilfurfural	mg.100mL <sup>-1</sup> álcool anidro	---	5,0	9,5	1,1	4,2 ± 2,0
Acidez volátil, em ácido acético	mg.100mL <sup>-1</sup> álcool anidro	---	150	186,3	N.D	98,8 ± 41,9
1-Butanol	mg.100mL <sup>-1</sup> álcool anidro	---	3,0	3,2	N.D	1,3 ± 0,9
Álcool metílico (Metanol)	mg.100mL <sup>-1</sup> álcool anidro	---	20	28,9	N.D	5,7 ± 4,7
Alcoóis superiores**	mg.100mL <sup>-1</sup> álcool anidro	---	360	554,5	120,8	236,1 ± 82,7
Acroleína	mg.100mL <sup>-1</sup> álcool anidro	---	5	7,9	N.D	0,5 ± 1,5
Aldeídos, em acetaldeído	mg.100mL <sup>-1</sup> álcool anidro	---	30	22,2	7,4	14,9 ± 3,4
Ésteres, em acetato de etila	mg.100mL <sup>-1</sup> álcool anidro	---	200	170,8	27,4	58,5 ± 33,5

<sup>1</sup>Média das duplicatas; (N.D) Não detectado.

\*Limites estabelecidos pela Instrução Normativa N°13.<sup>5</sup>

\*\*Alcoóis superiores = soma dos alcoóis iso-butílico (2-metil-propanol), iso-amílicos (2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol) e n-propílico (1-propanol).



Tabela 3 – Número de amostras de cachaça das 30 analisadas que não atendem aos parâmetros de identidade e qualidade proposto pela Instrução Normativa N° 13<sup>5</sup>

Componentes	Número de amostras irregulares*	Porcentagem
Grau alcoólico real	9	30 %
Furfural+hidroximetilfurfural	9	30%
Ácido acético	4	13,3%
1-Butanol	3	10%
Metanol	1	3,3%
Alcoóis superiores**	1	3,3%
Acroleína	1	3,3%
Acetaldeído	-	0%
Acetato de etila	-	0%

\*Amostras irregulares conforme Instrução Normativa N°13.<sup>5</sup>

\*\*Alcoóis superiores = soma dos alcoóis iso-butílico (2-metil-propanol), iso-amílicos (2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol) e n-propílico (1-propanol).

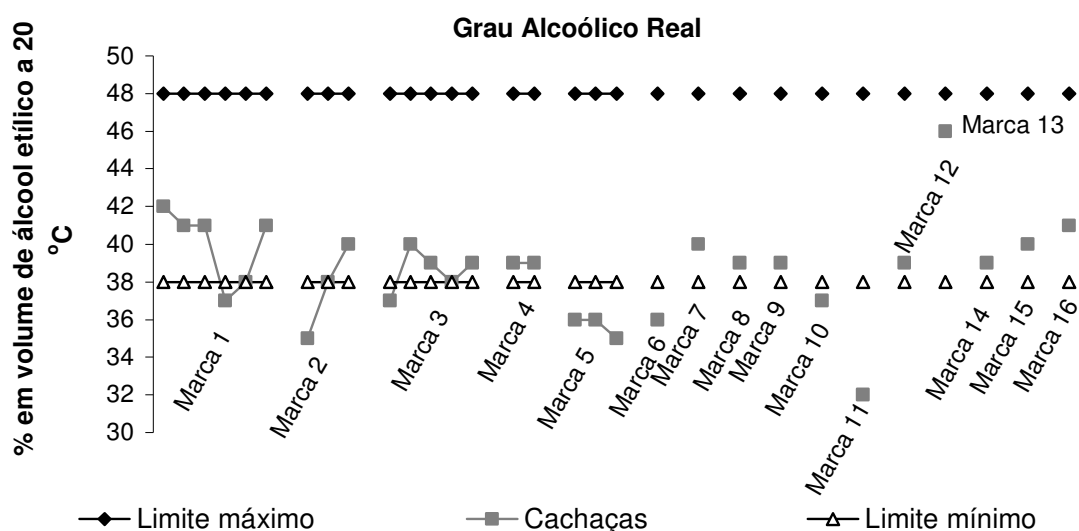


Figura 2 – Valores de grau alcoólico das diferentes amostras analisadas e limite mínimo e máximo para um destilado ser considerado cachaça, conforme Instrução Normativa N° 13.<sup>5</sup>

Os estudos demonstraram a existência de nove amostras, 30%, com teor alcoólico abaixo do aceitável pela legislação e apenas uma amostra apresentava o teor real de etanol encontrado idêntico ao informado no rótulo (Marca 12). Discrepância entre o teor real de etanol e o informado no rótulo das cachaças, na maioria das vezes, ocorre por negligência do produtor. A principal delas é a temperatura do destilado no momento da medida do grau alcoólico, que deve ser de 20 °C. Caso não seja possível ajustar a temperatura do destilado, o produtor deve efetuar a correção da temperatura no momento da leitura usando tabelas de conversão para 20 °C.<sup>9</sup>

Em um estudo investigando os parâmetros de qualidade em aguardentes de cana produzidas no Estado da Paraíba, os autores descrevem uma não conformidade em 20% das amostras estudadas, referente à graduação alcoólica.<sup>10</sup> Outros estudos indicaram valores próximos a 10%.<sup>6-11</sup>

A soma dos teores de furfural e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) variaram de 1,1 a 9,5 mg.100mL<sup>-1</sup> álcool etílico anidro, sendo que nove amostras (30%) continham teores acima do máximo permitido. Estudos detectaram teores máximos de 8,8 mg.100mL<sup>-1</sup> álcool etílico anidro para o composto furfural em amostras de cachaça artesanal de cana não queimada.<sup>12</sup> Análises de 31 amostras de cachaça pertencentes ao acervo do Laboratório de Biotecnologia (Labiotec/Detal/UFC) continham teores máximos, em mg.L<sup>-1</sup> de cachaça, próximos a 19,05 para o 5-HMF e 9,6 para furfural.<sup>13</sup>

A presença de furfural e 5-HMF em bebidas podem estar relacionadas à queima do palhiço da cana-de-açúcar, à presença de açúcares residuais e de bagacilhos. A temperatura elevada associada ao baixo pH do mosto acarreta desidratação dos açúcares e hidrólise de polissacarídeos dos bagacilhos (celulose, hemicelulose, pectina e outros) formando furfural e 5-HMF.<sup>14</sup> As pentoses, formam furfural como principal produto de degradação, enquanto as hexoses formam 5-HMF (Figura 3). Outros fatores, como o envelhecimento da bebida sob condições irregulares e a adição de caramelo, também, podem contribuir para o aumento no teor destes componentes.<sup>13-15</sup>

O cromatograma da Figura 4 ilustra os picos correspondentes para acetaldeído, acetato de etila, ácido acético, os alcoóis (metanol, etanol, 1-propanol, iso-butanol, 1-butanol, iso-amílico) e o padrão interno 4-metil-2-pentanol identificados em amostras de cachaças.

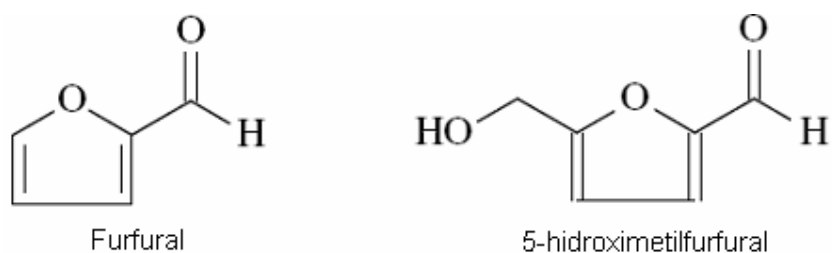


Figura 3 – Estrutura química do furfural e do 5-hidroximetilfurfural.

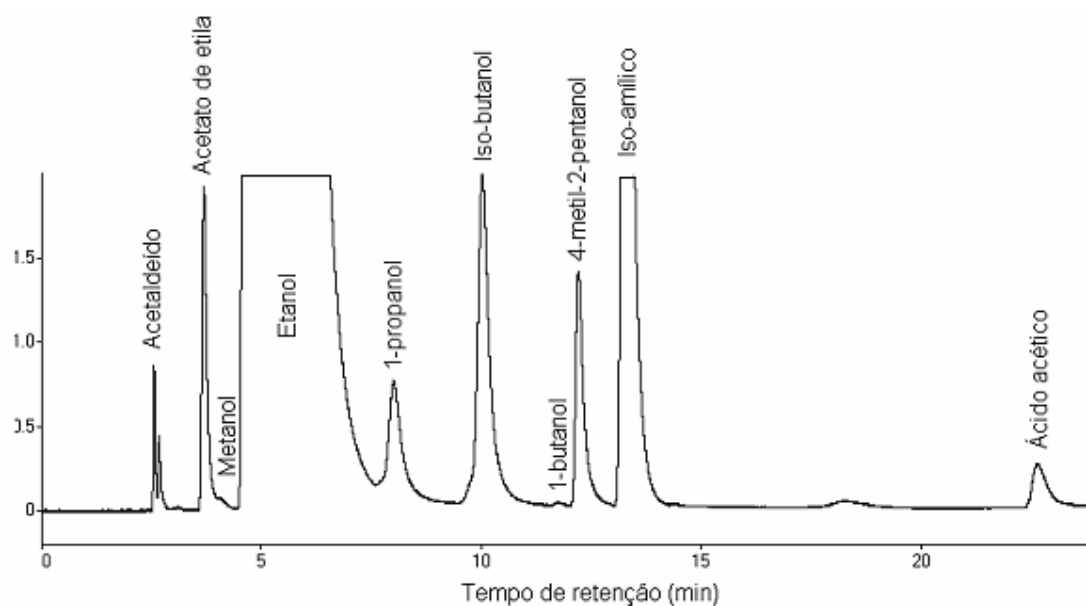


Figura 4 – Cromatograma típico de amostras de cachaça obtido por GC-FID em coluna polar LM-100. As condições cromatográficas estão descritas em materiais e métodos.

A Instrução Normativa N° 13,<sup>5</sup> estabelece uma concentração máxima de acidez volátil, em ácido acético de  $150 \text{ mg} \cdot 100\text{mL}^{-1}$  álcool etílico anidro. Neste estudo, quatro amostras apresentaram teores de ácido acético acima do permitido, representando 13,3% das amostras analisadas. O teor máximo encontrado em  $\text{mg} \cdot 100\text{mL}^{-1}$  álcool etílico anidro foi de 186,3 na amostra 15 (Marca 4). Outras amostras em excesso são: amostra 16 (160,8), 24 (165,2) e 28 (165,2). Estudos usando amostras de cachaças da região Noroeste do Rio Grande do Sul apresentam dados de acidez volátil de algumas amostras acima do

máximo estabelecido por lei.<sup>16</sup> Este estudo<sup>16</sup> descreve valores máximos, em  $\text{mg}\cdot 100\text{mL}^{-1}$  álcool etílico anidro, de 185,8 para cachaças produzidas na microrregião de Cruz Alta e 180,0 para as amostras produzidas na microrregião de Santa Rosa. Outras pesquisas utilizando noventa e quatro cachaças comerciais<sup>6</sup> e investigações de compostos secundários em 45 diferentes cachaças comerciais produzidas no Estado de Minas Gerais,<sup>17</sup> também, apresentam resultados com amostras (8,5% e 6,7%, respectivamente) excedendo o teor máximo permitido pela legislação vigente.

A acidez em cachaças pode ser devido à contaminação da cana-de-açúcar ou do próprio mosto fermentado por bactérias acéticas (*acetobacter*), tanto na estocagem da cana-de-açúcar quanto do próprio caldo.<sup>4</sup> A acidez volátil, também, aumenta com o aumento do tempo de armazenamento da cachaça em barris de madeira.<sup>18</sup> Estes autores<sup>18</sup> verificaram aumento na acidez volátil de 14,3  $\text{mg}\cdot 100\text{mL}^{-1}$  álcool etílico anidro em destilados após 36 meses de armazenamento em barris de carvalho com capacidade para 250 L. Já outros trabalhos mostraram que o descarte das frações dos destilados “cabeça” e “cauda”, especialmente da última, reduz a acidez das aguardentes.<sup>19-20</sup>

O 1-butanol e metanol são contaminantes de cachaça e, conseqüentemente, não devem ser encontrados ou somente detectados em valores baixos. A instrução Normativa N° 13 permite o valor máximo do 1-butanol de 3,0  $\text{mg}\cdot 100\text{mL}^{-1}$  álcool etílico anidro.<sup>5</sup> Três amostras apresentaram teores acima do permitido, em  $\text{mg}\cdot 100\text{mL}^{-1}$  álcool etílico anidro, mas muito próximos do limite máximo. São elas: amostra 9 (3,1), amostra 15 (3,2) e amostra 21 (3,1). Em 16,7% das amostras o teor de 1-butanol não foi detectado. O principal fator para formação de 1-butanol em cachaças é a contaminação por bactérias *acetobutílicas* durante o processo de fermentação. Esta contaminação pode ser reduzida não deixando a cana-de-açúcar próxima a estábulos e locais de ordenha.<sup>21</sup>

O teor de metanol foi superior ao estabelecido pela legislação apenas na amostra 24 (Marca, 10) com 28,9  $\text{mg}\cdot 100\text{mL}^{-1}$  álcool etílico anidro. Nas demais amostras, os teores detectados foram abaixo de 10  $\text{mg}\cdot 100\text{mL}^{-1}$  álcool etílico anidro, correspondendo a 50 % do valor máximo permitido pela Instrução Normativa N° 13.<sup>5</sup> Trabalhos atuais não têm detectado teores de metanol acima

do máximo permitido pela legislação.<sup>12-16-18-22</sup> Dentre estes, alguns resultados são muito próximos ao encontrado no presente estudo.<sup>22</sup>

O metanol presente na cachaça origina-se do metabolismo secundário das leveduras. Os fatores que propiciam sua formação são a queima da cana-de-açúcar no momento da colheita, o acréscimo de frutas ao caldo-de-cana durante a fermentação e limpeza inadequada do alambique, deixando resíduos de bagacilhos nas paredes internas do mesmo.<sup>21</sup> Os bagacilhos são ricos em substâncias pécticas, polímeros de ácidos galacturônico com grau variável de metoxilação.<sup>23</sup> A atuação de enzimas pécticas das leveduras liberam o metanol.<sup>24</sup> No organismo, o metanol é oxidado a ácido fórmico e posteriormente a CO<sub>2</sub>, provocando acidose (diminuição do pH sanguíneo) e afetando o sistema respiratório, podendo levar ao coma e até mesmo à morte.<sup>23</sup> O teor de metanol em cachaças, também, pode estar relacionado com o material utilizado na fabricação do alambique, sendo superior em aguardentes destiladas em alambiques de cobre, quando comparados com alambiques de aço inox.<sup>25</sup>

O limite máximo para os alcoóis superiores foi elevado de 300<sup>26</sup> para 360 mg.100mL<sup>-1</sup> álcool etílico anidro,<sup>5</sup> permitindo o comércio de uma bebida mais “encorpada”. Os valores dos alcoóis superiores foram obtidos pela soma dos alcoóis iso-butílico (2-metil propanol), iso-amílicos (2-metil -1-butanol e 3-metil-1-butanol) e propílico (1- propanol). Apenas a Marca 10 (amostra 24), excedeu ao limite máximo permitido pela legislação atual, sendo que em todas as demais cachaças os teores deste composto apresentavam-se dentro dos limites estipulados pela legislação. Houve uma grande variação no teor de alcoóis superiores (em mg.100mL<sup>-1</sup> álcool etílico anidro), com mínima de 120,8 e máxima de 554,5 (Tabela 2). Estudos realizados por Miranda e colaboradores<sup>6</sup> detectaram quatro amostras com os teores destes alcoóis fora do limite estabelecido pela legislação em um universo de 94 amostras. Porém, Barcelos e colaboradores<sup>27</sup> não detectaram amostras irregulares, mas observaram diferença significativa entre os teores detectados nas amostras do Sul de Minas (média de 176,6 mg.100mL<sup>-1</sup> álcool etílico anidro) quando comparados com as produzidas no Vale do Jequitinhonha (média de 235,1 mg.100mL<sup>-1</sup> álcool etílico anidro). Amostras coletadas na Zona da Mata apresentam valores intermediários (média de 221,9 mg.100mL<sup>-1</sup> álcool etílico anidro).

A formação de alcoóis superiores é maior quando o fermento apresenta atividade fraca, ocasionando demora no processo fermentativo.<sup>28</sup> As condições do meio de fermentação, a temperatura e o teor alcoólico final do vinho são fatores que interferem na concentração de alcoóis superiores em destilados.<sup>27</sup> Outras variáveis, como a concentração de aminoácidos e pH do mosto, o intervalo de tempo entre a fermentação e a destilação e o tempo prolongado de armazenamento da cana-de-açúcar, também, interferem no teor de alcoóis superiores.<sup>29</sup>

A acroleína é extremamente tóxica por todas as vias de administração e tem mostrado características mutagênicas, além de provocar irritação no trato respiratório de animais e humanos.<sup>15</sup> Neste estudo, apenas a amostra 22 (com 7,9 mg.100mL<sup>-1</sup> álcool etílico anidro) excedeu o limite permitido pela legislação (Tabela 2). Nascimento e colaboradores<sup>30</sup> descrevem em seus resultados um teor máximo de 0,7 mg.100mL<sup>-1</sup> álcool etílico anidro. A produção de acroleína pela transformação de 3-hidroxiopropanal é comum em cidras e provoca uma alteração indesejada, responsável pelo aroma de pimenta nas bebidas. Nos vinhos, este metabolismo é associado à presença das bactérias termofermentativas: *Bacillus amaracrylus* e *Lactobacillus colinoides*.<sup>15</sup>

Os teores dos compostos acetaldeído e acetato de etila não excederam o valor máximo permitido pela legislação<sup>5</sup> em nenhuma das amostras. Estes resultados condizem com os estudos realizados com amostras de cachaças produzidas na Região Noroeste do Rio Grande do Sul<sup>16</sup> e amostras coletadas em diferentes unidades produtoras da região de Araras, Estado de São Paulo, provenientes de destilação em colunas de fluxo contínuo.<sup>18</sup> Entretanto, em noventa e quatro amostras de cachaças produzidas em diferentes Regiões Brasileiras foram detectadas seis amostras com teores de acetato de etila acima do limite permitido e dezesseis com excesso de acetaldeído.<sup>6</sup> Altos teores de aldeídos nas cachaças podem ser indicação de oxidação espontânea ou devido à atividade de bactérias contaminantes,<sup>28</sup> podendo influenciar negativamente o sabor da aguardente por ocasionar aumento do sabor pungente das bebidas alcoólicas.<sup>31</sup>

Estudos indicam o aumento significativo nos teores de acetaldeído e acetato de etila após 36 meses de envelhecimento em barris de madeira<sup>18</sup>. Segundo estes autores<sup>18</sup>, recipientes de madeira transferem compostos

existentes em sua estrutura à bebida e que teores mais elevados de acetaldeído e acetato de etila são indicativos de envelhecimento das cachaças. Estes dados condizem com os resultados obtidos neste estudo, quando foi possível comparar amostras com características diferentes, pertencentes a uma mesma Marca, as armazenadas em barril de madeira por períodos mais longos, apresentavam teores destes compostos superiores aos de amostras com menor tempo de armazenamento.

Um outro fator importante na composição química das cachaças é o material utilizado para fabricação do alambique. Nascimento e colaboradores<sup>25</sup> ao estudarem a influência do material do alambique, detectaram maiores teores de acetaldeído nas cachaças destiladas em alambiques de cobre. As aguardentes destiladas nesse tipo de alambique apresentaram teores médios de aldeídos, aproximadamente, 50 % superior as destiladas em alambique de aço inox.

## CONCLUSÕES

Em relação aos atuais padrões de identidade e qualidade para a cachaça estabelecidos na legislação brasileira, apenas 36,7% das amostras estão em conformidade com a legislação<sup>5</sup> em todos os itens analisados. O grau alcoólico real e a soma dos compostos 5-hidroximetilfurfural e furfural, foram os parâmetros com maiores índices de irregularidades apresentados pelas amostras, em seguida, encontra-se o ácido acético. Os alcoóis superiores (soma dos alcoóis iso-butílico, iso-amílicos e propílico), o ácido acético e o acetato de etila foram os componentes que apresentaram os maiores desvio padrão, refletindo as dificuldades enfrentadas pelos produtores em garantir a qualidade e a padronização da bebida em todas as etapas da produção. O alto índice de amostras (63,3%) que revelaram em não conformidade com a legislação<sup>5</sup> em pelo menos um dos componentes analisados compromete as exportações e dificulta o crescimento do mercado interno da cachaça. A cachaça pertencente à Marca dez se destacou em relação às demais amostras, por obter o maior índice de irregularidade, com teores de ácido acético, metanol e alcoóis superiores acima do limite máximo permitido e, ainda, teor alcoólico real abaixo do permitido.

## AGRADECIMENTOS

A FAPERJ pelo Auxílio Pesquisa para a execução do projeto e bolsa do doutorando, e aos produtores pelas amostras de cachaça cedidas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. <http://www.agricultura.gov.br>, acessada em julho de 2008.
2. <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br>, cessada em julho de 2008.
3. <http://www.abrabe.org.br/cachaca.php>, cessada em julho de 2008.
4. Cardoso, M. G., Ed.; *Produção de aguardente de cana*, 2º ed., Editora UFLA: Lavras, 2006, cap. 5.
5. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Instrução Normativa N° 13, de 29 de junho de 2005. Publicado no D.O. U. de 30/6/2005.
6. Miranda, M. B.; Martins, N. G. S.; Belluco, A. E. S.; Horii, J.; Alcarde, A. R.; *Cienc. Tecnol. Aliment.* **2007**, *27*, 897.
7. BRASIL. *Metodologias de análises de bebidas e vinagres*. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br>, atualizado em 14/07/2005.
8. Saczk, A. A.; Okumura, L. L.; Oliveira, M. F.; Zanoni, M. V. B.; Stradiotto, N. R.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 1619.
9. Dias, S. M. B. C. Em *Produção de aguardente de cana*; Cardoso, M. G., Ed.; 2º ed., Editora UFLA: Lavras, 2006.
10. Lima, A.K.S.; Nóbrega, I.C.C.; *B.CEPPA* **2004**, *22*, 85.
11. Vilela, F. J.; Cardoso, M. G.; Masson, J.; Anjos, J. P.; *Cienc. Agrotec.* **2007**, *31*, 1089.
12. Masson, J.; Cardoso, M. G.; Vilela, F. J.; Pimentel, F. A.; Moraes, A. R.; Anjos, J. P.; *Cienc. Agrotec.* **2007**, *31*, 1805.
13. Aquino, F. W. B.; Nascimento, R. F.; Rodrigues, S.; Casemiro, A. R. S.; *Cienc. Tecnol. Aliment.* **2006**, *26*, 145.
14. Maia, A. B. R.; *STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos*, **1994**, *12*, 29.
15. Azevêdo, L. C.; Reis, M. M.; Silva, L. A.; Andrade, J. B.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1968.



16. Bogusz Junior, S.; Ketzer, D. C. M.; Gubert, R.; Andrades, L.; Gobo, A. B.; *Cienc. Tecnol. Aliment.* **2006**, *26*, 793.
17. Pereira, N. E.; Cardoso, M. G.; Azevedo, S. M.; Morais, A. R.; Fernandes, W.; Aguiar, P. M.; *Cienc. Agrotec.* **2003**, *27*, 1068.
18. Parazzi, C.; Arthur, C. M.; Lopes, J. J. C.; Borges, M. T. M. R.; *Cienc. Tecnol. Aliment.* **2008**, *28*, 193.
19. Boza, Y.; Horii, J.; *Cienc. Tecnol. Aliment.* **1998**, *18*, 391.
20. Boza, Y.; Horii, J.; *B.CEPPA* **2000**, *18*, 85.
21. Maia, A. B. R. A.; Campelo, E. A. P.; *Tecnologia da Cachaça de Alambique*, Editora SEBRAE/MG; SINDBEBIDAS: Belo Horizonte, 2006.
22. Miranda, M. B.; Horii, J.; Alcarde, A. R.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2006**, *26*, 772.
23. Cardoso, M. G.; Campos, G. A.; Silva, R. A.; Santos, C. D.; Pinto, A. P. S.; Silva, C. F.; *PROEX/UFLA*. Disponível em <http://www.editora.ufla.br>, acessado julho 2005.
24. Raven, P. H.; Evert, R. F.; Eichhorn, S. E.; *Biologia Vegetal*, 6° ed., Editora Guanabara Koogan, 2001.
25. Nascimento, R. F., Cardoso, D. R., Lima Neto, B. S., Franco, D. W. *Quim. Nova* **1998**, *21*, 737.
26. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Portaria N° 371, de 18 de setembro de 1974. Publicado no D.O.U. de 19/09/1974.
27. Barcelos, L. V. F.; Cardoso, M. G. C.; Vilela, F. J.; Anjos, J. P.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1009.
28. Yokoya, F.; *Fabricação de aguardente de cana*. Campinas: Campinas, 1995.
29. Crowell, E. A.; *Amer. J. Eco. Viticul.* **1961**, *12*, 111.
30. Nascimento, R. F.; Marques, J. C.; Lima Neto, B. S.; Keukeleire, D. D.; Franco, D. W.; *J. Chromatogr.* **1997**, *782*, 13.
31. Oliveira, E. S. *Tese Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2001.

## **TEORES DE COBRE, ZINCO, FERRO, SÓDIO E POTÁSSIO EM CACHAÇAS**

**Leandro Marelli de Souza<sup>1\*</sup>, Karla Silva Ferreira<sup>1</sup> e Luís César Passoni<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Av. Alberto Lamego, N° 2000, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes – RJ, Brasil. E-mail: marelli@uenf.br, karlasf@uenf.br

<sup>2</sup>Laboratório de Ciências Químicas. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Av. Alberto Lamego, N° 2000, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes – RJ, Brasil. E-mail: ipassoni@uenf.br

## RESUMO

A composição mineral pode servir como indicativo de contaminação da cachaça durante e após a destilação. Com o objetivo de conhecer alguns aspectos da qualidade da cachaça produzida na região Norte do Estado do Rio de Janeiro foram determinados os teores de cobre, zinco, ferro, sódio e potássio em cachaças produzidas pelos associados da Cooperativa dos Produtores de Cachaça e Derivados da Cana-de-Açúcar do Norte Fluminense. Os teores de cobre, ferro e zinco foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica e os de sódio e potássio por fotometria de chama. As amostras foram preparadas com oxidação da matéria orgânica por via úmida. Das 30 amostras estudadas, 46,7% estavam com teores de cobre acima do limite máximo permitido pela legislação. Houve presença de zinco em todas as amostras analisadas e 75% apresentaram ferro. Aproximadamente, 60% das amostras continham sódio e em 25% detectou-se potássio.

Termos para indexação: aguardente, análise de bebidas, absorção atômica, fotometria de chama.

## ABSTRACT

Mineral composition can serve as an indicative of "cachaça" (sugar cane spirit) contamination during and after the destillation. Aiming to know some of the aspects of "cachaça" quality produced in the northern region of Rio de Janeiro State, it has been determined the contents of copper, zinc, iron, sodium and potassium in "cachaças" produced by associates of Norte Fluminense "Cachaça" and Sugar-Cane Derivatives Producers Cooperative. The copper, zinc and iron contents have been determined by atomic absorption spectrophotometry, and the sodium and potassium contents by flame photometry. The samples have been separated with oxidation of organic matter through wet method. From the 30 studied samples, 46.7% has presented copper contents above the maximum limit allowed by legislation. There has been zinc presence in all the samples analyzed and 75%

has presented iron. Approximately, 60% of the samples have contained sodium, and potassium has been detected in 25% of them.

Key-words: aguardente, beverage analysis, atomic absorption, flame photometry.

## INTRODUÇÃO

Cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38% a 48% v/v, a 20 °C, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até seis gramas por litro, expressos em sacarose (BRASIL, 2005).

Na fabricação artesanal da cachaça, a destilação é feita em alambiques. Os tradicionais alambiques são construídos, principalmente, de cobre (Veiga, 2006), embora sejam encontrados, também, em aço inoxidável (SEBRAE, 2004). Existem, ainda, vários produtores que usam aparelhos de destilação produzidos com panela feita em aço inoxidável contendo algumas peças em cobre, como o deflegmador e a serpentina, que compõem a coluna do destilador (Crispim, 2000).

Há indicações de que o cobre contribui para a obtenção de uma cachaça de melhor qualidade, visto ser ele catalisador de certas reações químicas no decorrer da destilação, sendo que, sua ausência no processo acarreta o aparecimento de um odor desagradável na bebida, proveniente de derivados de enxofre, denominados sulfetos. Mas, também, destiladores feitos de cobre podem acarretar a presença de sais de cobre na cachaça (SEBRAE, 2004).

Os sais de cobre são insolúveis em água e em álcool. No entanto, em contato com ar úmido, ocorre a formação de carbonato e hidróxido de cobre, componentes do azinhavre (de cor azul-esverdeada). Esses componentes se acumulam no interior da alonga, e especialmente dentro da serpentina de resfriamento, sendo arrastados para a cachaça durante a destilação (Maia & Campelo, 2006). A legislação brasileira admite uma concentração máxima de cobre de 5 mg.L<sup>-1</sup> de cachaça (BRASIL, 2005).

A presença de elevadas concentrações de cobre na cachaça é indesejável e pode ser reduzida com assepsia adequada dos alambiques, após o

término diário do procedimento de alambicagem. Sua ingestão em excesso é tóxica para o ser humano devido à afinidade com grupos S-H de muitas proteínas e enzimas, acarretando várias doenças, por exemplo, epilepsia, melanoma, artrite reumatóide e perda do paladar (Sargentelli et al., 1996).

A Instrução Normativa N° 13 estabelece limites máximos apenas para o cobre, chumbo e arsênio (BRASIL, 2005). Mesmo não havendo limites estabelecidos em legislação para os minerais ferro, zinco, sódio e potássio, sua quantificação pode servir como indicativo de contaminação durante e após a destilação. Com o objetivo de conhecer o perfil da cachaça produzida na região Norte do Estado do Rio de Janeiro, em relação à sua composição mineral, foram determinados os teores de cobre, zinco, ferro, sódio e potássio em cachaças produzidas pelos associados da Cooperativa dos Produtores de Cachaça e Derivados da Cana-de-Açúcar do Norte Fluminense (COOPCANF).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram coletadas 30 amostras de volume variando entre 600 mL a 1000 mL de cachaça de dezesseis associados da Cooperativa dos Produtores de Cachaça e Derivados da Cana-de-Açúcar do Norte Fluminense (COOPCANF) do Estado do Rio de Janeiro, que estavam produtivos ou que tinham produtos no mercado, no segundo semestre de 2006 e primeiro semestre de 2007. As amostras foram adquiridas por meio de compra no comércio de Campos dos Goytacazes – RJ ou diretamente nos alambiques. O número de amostras de cada marca variou de uma a seis amostras, dependendo da existência de cachaças com diferentes características na época da pesquisa. Na Tabela 1 estão descritos os critérios de diferenciação de cada mostra.

Os teores de cobre, ferro e zinco foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica com chama de ar-acetileno em um espectrofotômetro de absorção atômica, marca ZEISS, modelo AAS4. Os teores de sódio e potássio por fotometria de chama em fotômetro de chama da marca ANALYSER, modelo 910M. 10 mL de cada amostra, em triplicata, foram levados para oxidação da matéria orgânica por via úmida usando “erlenmeyer” de 250 mL, adicionando 5,0 mL de ácido nítrico e 1,0 mL de ácido perclórico.

Logo após, os frascos foram aquecidos em chapa aquecedora acoplado a um exaustor (capela de exaustão), a temperatura de, aproximadamente, 180 °C. Após algum tempo, toda matéria orgânica foi completamente digerida, o que pôde ser identificado pelos vapores exalados que passaram a exibir coloração branca. Todo conteúdo dos frascos foi evaporado até restar, aproximadamente, 1,0 mL de amostra que, posteriormente, foi levada para volume final de 50,0 mL com água desmineralizada. Foram utilizados frascos de polietileno para acondicionamento das amostras até o momento das análises.

As curvas de calibração dos minerais foram feitas a partir de soluções estoque, próprias para absorção atômica, diluídas em água desmineralizada.

Todas as vidrarias utilizadas foram higienizadas com detergente neutro e enxaguadas em água corrente, e posteriormente deixadas de molho em solução ácida preparada com ácido clorídrico (0,1 mol e pH < 1,0) durante uma noite, em seguida, enxaguadas três vezes com água desionizada.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os teores dos minerais detectados nas amostras de cachaça da Região Norte Fluminense, bem como o critério de diferenciação pra cada amostra, estão apresentados na Tabela 1.

1 – Teores de minerais nas amostras de cachaça (mg.L<sup>-1</sup> de cachaça) e o critério de diferenciação

Indústria	Amostras	Cobre*	Zinco*	Ferro*	Sódio*	Potássio*	Critério de diferenciação
Marca 1	1	<b>8,50</b> <sup>1</sup>	0,81	0,75	N.D.	N.D.	Prata, armazenada por seis meses em reservatório de aço carbono.
	2	<b>11,94</b> <sup>1</sup>	0,78	1,66	7,50	2,50	Prata, armazenada por um ano em reservatório de aço carbono.
	3	4,88	0,28	0,48	N.D.	N.D.	Prata, armazenada por dois anos em reservatório de aço carbono.
	4	<b>10,78</b> <sup>1</sup>	0,48	0,23	5,00	N.D.	Prata sem identificação quanto ao ano de produção.
	5	<b>6,44</b> <sup>1</sup>	0,14	1,86	N.D.	N.D.	Armazenada por dois anos em barril de cerejeira.
	6	4,49	0,02	0,23	5,00	N.D.	Armazenada por dois anos em barril de carvalho.
Marca 2	7	<b>6,08</b> <sup>1</sup>	0,64	0,07	10,00	5,00	Armazenada por um ano em barril de carvalho e produzida em 2006.
	8	1,71	0,11	4,44	5,00	N.D.	Armazenada por dois anos em barril de carvalho e produzida em 2005.
	9	4,70	0,10	0,76	7,50	2,50	Armazenada por dois anos em barril de carvalho e produzida em 2001.
Marca 3 (Orgânica)	10	<b>7,46</b> <sup>1</sup>	0,08	0,53	2,50	N.D.	Armazenada por uma semana em barril de balsamo.
	11	<b>7,11</b> *	0,10	1,71	2,50	N.D.	Blend (safra 2006 com 2007) e armazenada em barril de balsamo.
	12	3,42	0,10	0,47	2,50	N.D.	Armazenada por quatro anos em barril de carvalho.
	13	3,03	0,16	1,65	7,50	2,50	Armazenada em barril de carvalho (tempo não especificado).
Marca 4	14	2,97	0,07	0,29	5,00	N.D.	Armazenada por dois anos em barril de carvalho.
	15	<b>7,21</b> <sup>1</sup>	0,32	3,43	2,50	N.D.	Armazenada por quatro anos em barril de carvalho.
	16	<b>6,87</b> <sup>1</sup>	0,19	3,11	N.D.	N.D.	Armazenada por cinco anos em barril de carvalho.
Marca 5	17	<b>6,59</b> <sup>1</sup>	1,64	N.D.	N.D.	N.D.	Prata produzida em 2007.
	18	<b>5,75</b> <sup>1</sup>	0,55	0,09	N.D.	N.D.	Safra 2006, armazenada por um ano em barril (madeira desconhecida).
	19	<b>5,41</b> <sup>1</sup>	0,31	N.D.	N.D.	N.D.	Envelhecida (madeira e tempo desconhecidos).
Marca 6	20	<b>6,59</b> <sup>1</sup>	1,65	N.D.	5,00	2,50	Prata produzida no ano de 2006.
Marca 7	21	4,80	0,17	0,79	7,50	2,50	Prata produzida no ano de 2006.
Marca 8	22	4,32	0,16	0,85	7,50	N.D.	Armazenada em barris de balsamo e carvalho por tempo desconhecido.
Marca 9	23	2,54	1,61	N.D.	N.D.	N.D.	Prata produzida no ano de 2006.
Marca 10	24	4,91	0,15	0,50	10,00	5,00	Prata sem identificação quanto ao ano de produção.
Marca 11	25	1,99	0,16	N.D.	N.D.	N.D.	Prata sem identificação quanto ao ano de produção.
Marca 12	26	2,54	0,13	0,20	10,00	N.D.	Prata sem identificação quanto ao ano de produção.
Marca 13	27	2,44	0,10	N.D.	2,50	—	Prata sem identificação quanto ao ano de produção.
Marca 14	28	<b>7,24</b> <sup>1</sup>	0,30	1,38	N.D.	N.D.	Envelhecida (madeira e tempo desconhecidos).
Marca 15	29	4,47	0,31	0,12	N.D.	N.D.	Prata produzida no ano de 2007.
Marca 16	30	2,95	2,07	0,05	10,00	2,50	Prata produzida no ano de 2002.
Valor médio ± desvio padrão (amostras)		5,34±2,48	0,46±0,56	1,07±1,17	6,05±2,8	3,13 ± 1,16	
Limite máximo permitido <sup>2</sup>		5,0	----	----	----	----	

\*Média das triplicatas; (N.D) Não detectado.

<sup>1</sup>Concentração acima do limite máximo permitido pela Normativa N° 13 (BRASIL, 2005).<sup>2</sup>Apenas o cobre, dentre os minerais estudados, possui limite estabelecido pela Normativa N° 13 (BRASIL, 2005).

A Instrução Normativa N° 13 estabelece limite máximo de  $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de cachaça, para o mineral cobre (BRASIL, 2005). Das amostras analisadas, 46,7% apresentaram teores de cobre acima do limite máximo permitido. Percebe-se, ainda, que mesmo entre as amostras de uma mesma Marca, nem todas apresentaram teores de cobre acima do limite estabelecido pela legislação vigente. Estas amostras diferem quanto à data de fabricação, tempo de armazenamento e madeira utilizada.

Cavalheiro et al. (2003) ao estudarem a influência do envelhecimento no teor de cobre em cachaças, concluíram que o processo de envelhecimento da cachaça em tonéis de madeira pode promover uma redução de até 75,0% no teor de cobre. Dentre as amostras da Marca 3, o teor mais elevado foi encontrado na amostra recém-produzida, com teores bem inferiores, nas amostras armazenadas por períodos de tempo maiores, em barris de madeira.

Garbin et al. (2005) estudando os níveis de cobre em amostras de cachaça produzidas na região noroeste do Rio Grande do Sul, encontraram níveis de cobre acima do permitido pela legislação em 25,0% das amostras provenientes da microrregião Cruz Alta, 57,1 % para amostras adquiridas na microrregião Santa Rosa e 60,0% para as da microrregião Três Passos. Do total das noventa e quatro amostras de cachaça comerciais estudadas por Miranda et al. (2007), 15% apresentaram teor de cobre acima do limite estabelecido e o valor máximo quantificado foi de  $12,0 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Estudos realizados por Azevedo et al. (2003) e Labanca et al. (2006) em amostras de cachaças produzidas no Estado de Minas Gerais indicam teores de cobre acima do máximo permitido entre 6,0% a 7,0% do total de amostras analisadas. Ambos descrevem em seus resultados que o cobre foi detectado em todas as amostras estudadas. Nos resultados de Labanca et al. (2006), os teores variaram, em miligrama por litro de amostra, entre 0,05 a 8,10, com média de 2,30.

Atualmente existe maior preocupação por parte da maioria dos produtores em diminuir a contaminação por cobre de suas cachaças, buscando atender as exigências legais. Observa-se que a assepsia adequada dos alambiques, após o término diário do procedimento de alambicagem, reduz consideravelmente os teores de cobre nos destilados (Sargentelli et al., 1996). Lima & Nóbrega (2004) ao avaliarem os parâmetros de qualidade em aguardentes de cana produzidas no



Estado da Paraíba descrevem que a separação das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”, nas destilações fazem parte dos diversos procedimentos que podem controlar os níveis de cobre nas cachaças. Uma alternativa ainda pouco conhecida e estudada a fim de diminuir a contaminação de cobre em cachaças, é a utilização de carvão ativado. Segundo estudo realizado por Lima et al. (2006), o carvão ativado mostrou-se eficiente na remoção do cobre, sendo 12,0 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado e tempo acima de 60 minutos mais recomendado para uma cachaça cujos teores de cobre estejam próximos a 9,0 mg.L<sup>-1</sup>.

A presença de alguns minerais não citados pela legislação podem ser indícios de contaminação durante e após a destilação. Nascimento *et al.* (1999), avaliaram o perfil de íons metálicos em sessenta e nove cachaças, sendo dezesseis amostras tipo exportação, trinta e sete comercializadas no mercado interno e dezesseis produzidas de forma artesanal. Os teores médios de zinco foram 0,14 mg.L<sup>-1</sup> para as amostras tipo exportação, 0,15 mg.L<sup>-1</sup> para as de mercado interno e 0,13 mg.L<sup>-1</sup> para as fabricadas artesanalmente. Estes dados indicam teores médios inferiores ao encontrados neste trabalho, mas ambos indicam a presença de zinco em todas as amostras analisadas.

O bronze é uma liga metálica de cobre e zinco e muito utilizado, principalmente, em válvulas, tampas e peças moldáveis das usinas (Veiga, 2006). Provavelmente, a fonte de zinco encontrada nas amostras se deve a estes componentes, que fazem parte de destiladores e, muitas vezes, de embalagens usadas no armazenamento a granel de cachaças.

Há certo interesse na quantificação do elemento ferro na cachaça, pois este pode alterar as características sensoriais da bebida. Os teores de ferro variaram de não detectável a 4,44 mg.L<sup>-1</sup>, com média de 1,07 mg.L<sup>-1</sup> de cachaça. Uma amostra da Marca 2 e as duas amostras da Marca 4, apresentaram teores bem acima da média geral, entre 3,11 a 4,44 mg.L<sup>-1</sup> de cachaça (Tabela 1). Teores médios variando entre 0,11 a 0,35 mg.L<sup>-1</sup> de cachaça foram detectados por Nascimento *et al.*, (1999). As possíveis fontes deste mineral em cachaças são as peças utilizadas no processo de destilação, engarrafamento e armazenamento. Também, pode estar presente em embalagens usadas no armazenamento a granel de cachaças.

Das trinta amostras analisadas, aproximadamente, 60% apresentaram sódio. O teor mais elevado de sódio foi 10,0 mg.L<sup>-1</sup>. Quanto ao potássio, foi

detectado em apenas oito amostras, com um teor máximo de  $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de cachaça.

Nascimento *et al.* (1999), em seus estudos, encontraram teores de sódio médios de  $10,20 \text{ mg.L}^{-1}$  em aguardente de cana tipo exportação,  $6,72 \text{ mg.L}^{-1}$  em cachaças comercializadas no mercado interno e  $3,87 \text{ mg.L}^{-1}$  para cachaças produzidas artesanalmente. Para os teores de potássio, os valores foram  $8,64 \text{ mg.L}^{-1}$  nas exportadas,  $3,05 \text{ mg.L}^{-1}$  nas comercializadas no mercado interno e  $5,07 \text{ mg.L}^{-1}$  nas produzidas de forma artesanal.

Possíveis fontes de sódio e potássio em cachaças são os equipamentos e utensílios usados nos processos subseqüentes à destilação contaminados com estes elementos. A assepsia dos tonéis de armazenamento, dos recipientes utilizados na blendagem (mistura de destilados de diversas graduações alcoólicas), dos equipamentos utilizados na filtragem, no envase e na embalagem utilizados para comercialização, normalmente, são feitos com água não destiladas e detergentes contendo sódio. Além disso, os vegetais contêm teores elevados de potássio em sua constituição, de forma que os tonéis de madeiras mais novos poderiam liberar potássio para as cachaças.

## CONCLUSÕES

Das amostras analisadas, 46,7% apresentavam teores de cobre acima do limite máximo permitido pela legislação. A presença dos minerais zinco, ferro, sódio e potássio, detectados em algumas amostras indicam contaminações durante e, ou após a destilação da cachaça. Estes dados indicam que os produtores desta região necessitam de assistência técnica para melhorar a tecnologia para produção de suas cachaças.

## AGRADECIMENTOS

A FAPERJ, pelo Auxílio Pesquisa para a execução do projeto e bolsa do doutorando; ao Professor Pedro H. Monnerat e ao técnico de nível superior José

Accacio da Silva, pela leitura dos teores de cobre, zinco e ferro das amostras; e aos produtores pelas amostras de cachaça cedidas.

## REFERÊNCIAS

AZEVEDO, A.M., CARDOSO, M.G., PEREIRA, N.E., RIBEIRO, C.F.S., SILVA, V.F., AGUIAR, F.C. Levantamento da contaminação por cobre nas aguardentes de cana-de-açúcar produzidas em minas gerais. **Ciências Agrotecnológicas**, Lavras – MG, v. 27, n. 3, p. 618-624, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 13, de 29 de junho de 2005. **Diário Oficial da União. Brasília**, 30 de junho de 2005.

CAVALHEIRO, S.F.L., SOBRINHO, L.G.A., FARIA, J.B., CARDELLO, H.M.A. Influência do envelhecimento no teor de cobre em cachaças. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da Universidade Federal do Paraná (B.CEPPA)**, Curitiba – PR, v. 21, n. 1, p. 99-108, 2003.

CRISPIM, J.E. **Manual da produção de aguardente de qualidade**. Guaíba – RS; Editora Agropecuária LTDA, 2000, 333 p.

GARBIN, R., BOGUSZ JUNIOR, S., MONTANO, M.A. Níveis de cobre em amostras de cachaça produzidas na região noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1436-1440, 2005.

LABANCA, R.A., GLÓRIA, M.B.A., GOUVEIA, V.J.P., AFONSO, R.J.C., Determinação dos teores de cobre e grau alcoólico em aguardentes de cana produzidas no Estado de Minas Gerais. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1110-1113, 2006.

LIMA, A.K.S., NÓBREGA, I.C.C. Avaliação de parâmetros de qualidade em aguardente de cana produzidas no Estado da Paraíba. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da Universidade Federal do Paraná (B.CEPPA)**, Curitiba – PR, v. 22, n. 1, p. 85-96, 2004.

LIMA, A.J.B., CARDOSO, M.G.C., QUERREIRO, M.C., PIMENTEL, F.A. Emprego do carvão ativado pra remoção do cobre em cachaça. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 247-250, 2006.

- MAIA, A.B.R.A., CAMPELO, E.A.P. **Tecnologia da cachaça de alambique**. SEBRAE/MG; SINDBEBIDAS – Belo Horizonte – MG, 2006, 129 P.:il.
- MIRANDA, M.B., MARTINS, N.G.S., BELLUCO, A.E.S., HORII, J., ALCARDE, A.R. Qualidade química de cachaças e de aguardentes brasileiras. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas – SP, v. 27, n. 4, p. 897-901, 2007.
- NASCIMENTO, R.F., BEZERRA, C.W.B., FURUYA, S.M.B., SCHULTZ, M.S., POLASTRO, L.R., LIMA NETO, B.S., FRANCO, D.W. Mineral profile of brazilian cachaças and other international spirits. **Journal of Food Composition and Analysis**, n.12, p.17-25, 1999.
- SARGENTELLI, V., MAURO, A.E., MASSABNI, A.C. Aspectos do metabolismo do cobre no homem. **Química Nova**, São Paulo, v.19, n. 3, p. 290-293, 1996.
- SEBRAE, Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Cachaça: um negócio brasileiro**. São Paulo – SP, 1ª Ed, 2004, 66p.
- VEIGA, J.F. Equipamentos para produção e controle de operação da fábrica de cachaça. In: CARDOSO, M.G. (ed.) **Produção de aguardente de cana**. 2º ed. Editora UFLA – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2006, p. 68-100.

**COMPONENTES ORGÂNICOS E INORGANICOS AO LONGO DA  
DESTILAÇÃO DO VINHO DO CALDO-DE-CANA PARA PRODUÇÃO DE  
CACHAÇA**

**Leandro Marelli de Souza<sup>1</sup>, Karla Silva Ferreira<sup>1</sup>, Luís César Passoni<sup>2</sup>,**

<sup>1</sup>Laboratório de Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Av. Alberto Lamego, N° 2000, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes – RJ, Brasil. E-mail: marelli@uenf.br

<sup>2</sup>Laboratório de Ciências Químicas. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Av. Alberto Lamego, N° 2000, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes – RJ, Brasil.

## RESUMO

A destilação é uma etapa importante na produção de cachaça, sendo responsável por muitas das características sensoriais da bebida. Com a finalidade de conhecer a composição química do destilado durante a destilação do vinho da cana-de-açúcar, foram quantificados diversos compostos em diferentes frações do destilado coletadas ao longo de 160 minutos de destilação. Utilizou-se a cromatografia gasosa na quantificação do etanol, metanol, 1-propanol, 1-butanol, iso-butanol, iso-amílico, 1-hexanol, acetato de etila, acetaldeído e ácido acético e os teores de cobre, ferro e zinco foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica. Os teores de acetaldeído, acetato de etila, 1-propanol e 1-butanol foram mais elevados nos primeiros momentos da destilação, e apenas, o 1-butanol apresenta teores detectáveis após a primeira hora de destilação. O metanol foi detectado em  $(78 \pm 4,9)\%$  das amostras estudadas e observou-se que ao longo da destilação, ocorreu uma redução progressiva dos teores de etanol, iso-butanol e iso-amílico (2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol), indicando um perfil bem similar entre eles. A regressão linear ajuda a explicar esta similaridade, indicando que ocorreu uma diminuição dos teores destes alcoóis ao longo da destilação. Observa-se um incremento nos teores de 1-hexanol e ácido acético, mostrando que maiores concentrações são encontradas na fase final da destilação. Os minerais cobre, zinco e ferro foram detectados em todas as frações estudadas, com valores médios variando, em  $\text{mg.L}^{-1}$  de amostra, entre 3,55 a 54,66 para cobre, 0,07 a 0,51 para zinco e 0,05 a 0,70 para ferro.

Palavras-chave: aguardente, destilados, alcoóis, cromatografia, bebida.

## ABSTRACT

Distillation is an important stage in “cachaça” (sugar cane spirit) production, being responsible for many of the sensorial characteristics of beverage. Aiming to know the distillate chemical composition during the sugar-cane wine distillation, it was quantified several compounds from its different fractions, collected along its 160 minutes of distillation. A Gas Chromatography (GC) was used to quantify the

ethyl alcohol, methyl alcohol, n-propyl alcohol, n-butyl alcohol, isobutyl alcohol, isoamyl alcohol (mixture of 2-methyl-butyl and 3-methyl-butyl), n-hexanol alcohol, ethyl acetate, acetaldehyde and acetic acid; whereas the copper, iron and zinc contents were determined by atomic absorption spectrophotometry. The acetaldehyde, ethyl acetate, n-propyl alcohol, n-butyl alcohol were higher on the first moments of distillation, and only the n-butyl alcohol presents detectable contents after 1 hour of distillation. Methyl alcohol was detected in  $(78 \pm 4.9)\%$  of the studied samples and it has been observed that, along the distillation, a progressive reduction of the ethyl alcohol, isobutyl alcohol and isoamyl alcohol (mixture of 2-methyl-butyl and 3-methyl-butyl), indicating a very similar profile among them. The linear regression helps to explain this similarity, by indicating that a diminishment of these alcohols contents occurred along distillation. It has been observed an increment of n-hexanol alcohol and acetic acid contents, which shows that the greater concentrations are found on the final phase of the process. The minerals copper, iron and zinc were detected in all the studied fractions, having average values varied from, in  $\text{mg.L}^{-1}$  of sample, between 3.55 and 54.66 for copper; 0.07 and 0.51 for zinc; and 0.05 and 0.70 for iron.

Key-words: aguardente, distillates, alcohols, chromatography, beverage.

## INTRODUÇÃO

Ao destilar o vinho da cana-de-açúcar, obtém-se um novo líquido com teor alcoólico cinco a seis vezes superior (Maia e Campelo, 2006). O mosto fermentado ou vinho possui uma composição bastante complexa. Sob o ponto de vista da volatilidade, têm-se os constituintes de natureza volátil e fixa. Os voláteis são representados pela água, álcool etílico, aldeídos, ésteres, alcoóis superiores, ácido acético etc., enquanto que os fixos são extratos do mosto e as células de leveduras e bactérias. A água é o componente majoritário, em torno de 89% a 92% do vinho, e o álcool etílico, seu principal componente, representa de 5% a 8% em volume (SEBRAE, 2004). Outras substâncias estão presentes em menores proporções, os componentes secundários, por exemplo, acetaldeído, ácido succínico, ácido acético, ácido butírico, glicerina, furfural, alcoóis superiores, entre outros. Os componentes secundários são oriundos de reações que ocorrem durante os processos de fermentação, destilação e durante o armazenamento em

barris de madeira (Dias, 2006). Alguns destes são tóxicos e a legislação brasileira (BRASIL, 2005) estabelece limites para eles visando à segurança ao consumidor.

Durante o processo de destilação muitas reações ocorrem. Algumas reações são conhecidas, como a hidrólise, esterificação, acetalização, reações com o cobre, e produção de furfural, entre outras. Quando se aquece uma mistura de substâncias líquidas, a proporção entre as moléculas de cada substância que passa ao estado vapor é diferente da preexistente no estado líquido (Maia e Campelo, 2006). Da condensação destes vapores, obtém-se um produto líquido de composição diferente do líquido que o originou (Crispin, 2000). No caso da fabricação da cachaça, o destilado deve ser recolhido em um intervalo de 150 a 160 minutos. A separação das frações do destilado em “cabeça”, “coração” (cachaça) e “cauda”, durante a destilação é de fundamental importância na produção de cachaça. A fração “cabeça” é recolhida nos primeiros minutos da destilação. Essa fração é a que contém o teor alcoólico mais elevado, geralmente, acima de 60 °GL e representa cerca de 5% do volume total do destilado. O “coração” é a cachaça propriamente dita e deve ser recolhido por um tempo aproximado de 2 horas, representando 80% do volume total do destilado. Os 15% restantes representam a fração final da destilação, a cauda, geralmente com graduação alcoólica abaixo de 38 °GL (Maia e Campelo, 2006).

No processo de destilação, o controle dos teores de componentes secundários na cachaça está diretamente relacionado a características do vinho a ser destilado, separação das frações durante a destilação, tipo do destilador (alambique ou coluna), tamanho do destilador, temperatura gerada pela fonte de aquecimento duração da destilação e limpeza do alambique (Dias, 2006).

Com a finalidade de quantificar componentes orgânicos e inorgânicos com concentrações controladas pelo MAPA, em sua Normativa n° 13 (BRASIL, 2005), esta pesquisa monitorou o processo de destilação do vinho da cana-de-açúcar para produção de cachaça, em três diferentes alambiques, durante 160 minutos de destilação, com amostras coletas em 23 pontos ao longo da destilação, em tempos predeterminados.



## MATERIAL E MÉTODOS

Foram monitoradas duas destilações, em três diferentes alambiques, que diferiam com relação à fonte de alimentação de calor e ao tamanho e material usado na fabricação das peças dos mesmos, conforme descrito abaixo.

Alambique 1: alambique composto de uma panela com capacidade para 1000 L ligada a uma caldeira, que efetua o aquecimento do vinho mediante vapor. Este vapor atravessa uma espiral situada no fundo da panela. A panela é dotada de dispositivo para controle de temperatura e vazão e a caldeira permite ajustar a pressão de vapor que irá aquecer o vinho. A panela, a espiral para aquecimento a vapor dentro da panela e a coluna situada acima da panela, que recebe os vapores do vinho, são constituídas de aço inoxidável. O aço inoxidável é uma liga de ferro e cromo, podendo conter também níquel, molibdênio e outros elementos, que apresenta propriedades físico-químicas superiores aos aços comuns, sendo a alta resistência à oxidação atmosférica a sua principal característica. Já a “alonga”, que se encontra ligada à parte mais alta da coluna, a partir da qual os vapores são resfriados até serem recolhidos na extremidade inferior no estado líquido, é toda de cobre. A Figura 1 ilustra o conjunto referente a este alambique.

Alambique 2: alambique composto de uma panela com capacidade para 150 L aquecida por fogo direto produzido pela queima de madeira. Todos os componentes do alambique (panela, coluna, alonga e as demais peças que compõem o conjunto) são de cobre. A Figura 2 ilustra o conjunto referente ao alambique 2.

Alambique 3: é idêntico ao segundo quanto à constituição das peças e à fonte de calor, mas diferindo no tamanho da panela, que possui capacidade para 500 L. A Figura 3 ilustra o conjunto referente a este alambique.



Figura 1 - Alambique 1.

Legenda: (A) panela, (B) coluna, (C) preaquecimento do vinho para próxima destilação, (D) condensador, (E) sistema de corte do destilado.



Figura 2 - Alambique 2.  
Legenda: (A) panela, (B) coluna, (C) alonga, (D) condensador.



Figura 3 - Alambique 3.  
Legenda: (A) panela, (B) coluna, (C) alonga, (D) condensador.

Foram coletadas frações de 100 mL do destilado em cada um destes três alambiques, em duas destilações efetuadas em diferentes dias. As amostras foram coletadas em tempos predeterminados (0, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 144, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160 minutos), durante a destilação. As coletas das amostras dos alambiques 1 e 2, foram realizadas no segundo semestre de 2007 e as do alambique 3 no primeiro semestre de 2008. Nestas amostras foi quantificado os componentes orgânicos etanol, metanol, 1-propanol, 1-butanol, iso-butanol, iso-amílico (3-metil-1-butanol + 2-metil-1-butanol), 1-hexanol, acetato de etila, acetaldeído, ácido acético, e os inorgânicos cobre, ferro e zinco.

### **Reagentes e padrões**

Os padrões metanol, etanol, 1-propanol, 1-butanol, iso-butanol, iso-amílico, 1-hexanol, acetato de etila, acetaldeído e ácido acético foram de grau cromatográfico (Vetec, Nuclear e Sigma). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico (Merck e Sigma).

### **Metodologias analíticas**

Os compostos orgânicos foram determinados, sem concentração prévia da amostra, por cromatografia gasosa (*GC = Gas Chromatography*), usando cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-17A, equipado com um detector de ionização em chama (*FID = Flame ionization detection*) e separados em uma coluna capilar polar LM-100, série CB (35 m x 0,25 mm x 0,25 µm). As temperaturas do detector e do injetor foram fixadas em 250°C e o modo de injeção com divisão de fluxo (*split*) de 1:25 com um volume de injeção de 1,00 µL da amostra (cachaça). Todas as análises, tanto das curvas analíticas, quanto das amostras, foram feitas em duplicatas, e quando apresentavam discrepância, em triplicatas. O fluxo do gás de arraste na coluna (H<sub>2</sub>) foi de 1,0 mL/min. A temperatura da coluna seguiu uma programação. O programa de temperatura utilizado na coluna foi: 35°C (isoterma de 7 min), 7°C/min até 90°C (isoterma de 5 min), e 15 °C/mim até 120 °C (1,0 min).

As curvas analíticas foram preparadas contendo cinco pontos, nas seguintes faixas de concentração, em  $\text{mg}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$  de álcool anidro: acetaldeído (7,5 a 37,5), acetato de etila (50 a 250), metanol (5 a 25), 1-propanol (30 a 150), iso-butanol (30 a 150), 1-butanol (0,75 a 3,75), iso-amílico (30 a 150), 1-hexanol (5 a 30) e ácido acético (37,5 a 187,5) em meio hidroalcolóico (etanol 40% v/v), procurando-se reproduzir as condições da matriz analisada. Utilizou-se a regressão linear, plotando-se a relação área dos picos dos padrões/área do padrão interno versus concentração. Os coeficientes de correlação foram sempre bem próximos à unidade. O 4-metil-2-pentanol, grau UV/HPLC foi o padrão interno usado.

O cromatograma dos padrões do acetaldeído, acetato de etila, ácido acético, os alcoóis (metanol, etanol, 2-butanol, 1-propanol, iso-butanol, 1-butanol, iso-amílico e 1-hexanol) e o padrão interno 4-metil-2-pentanol obtidos por cromatografia gasosa (*GC = Gas Chromatography*), equipado com um detector de ionização em chama (*FID = Flame ionization detection*) em uma coluna capilar polar LM-100 e a identificação dos picos encontram-se na Figura 4.

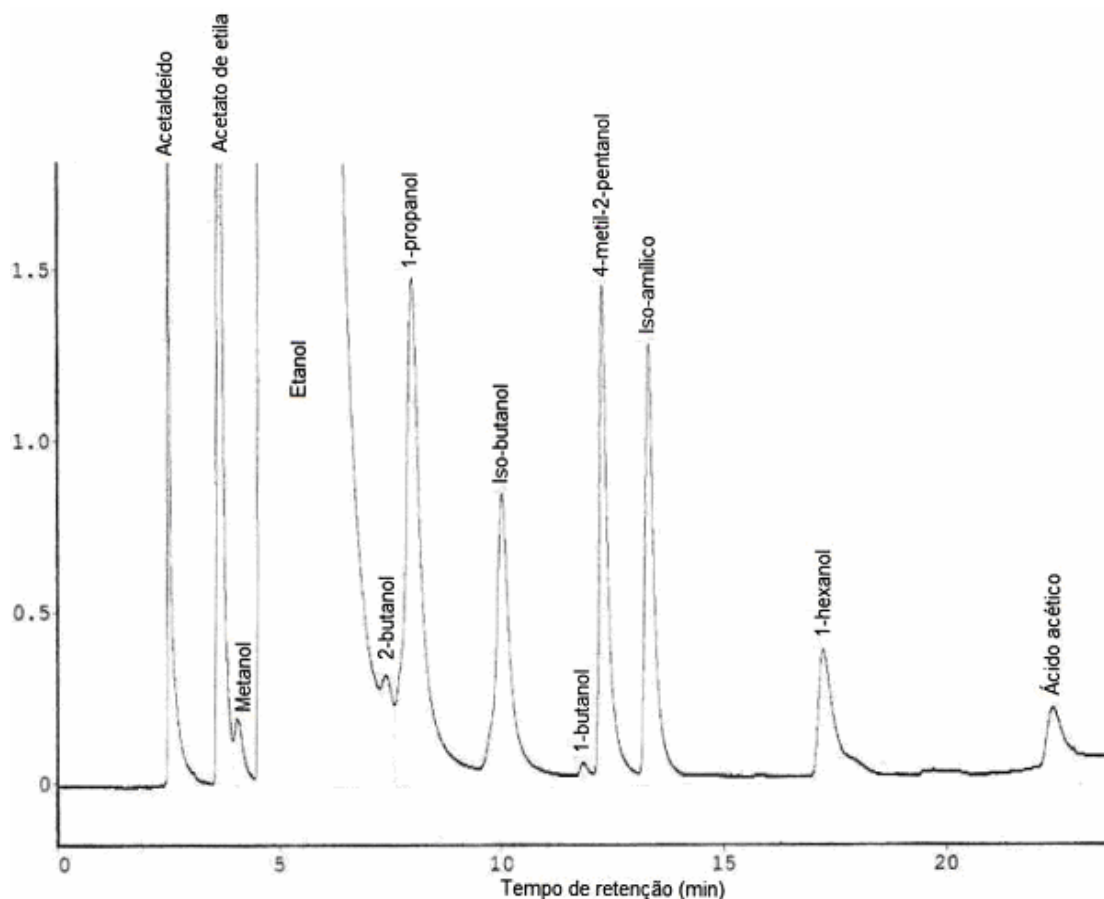


Figura 4 - Cromatograma dos padrões obtidos por GC-FID em coluna polar LM-100.

Os componentes inorgânicos foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica com chama de ar-acetileno em um espectrofotômetro de absorção atômica, marca ZEISS, modelo AAS4. 10 mL de cada amostra, em triplicata, foram levados para oxidação da matéria orgânica por via úmida usando “erlenmeyer” de 250 mL, adicionando 5,0 mL de ácido nítrico e 1,0 mL de ácido perclórico. Logo após, os frascos foram aquecidos em chapa aquecedora acoplado a um exaustor (capela de exaustão), à temperatura de, aproximadamente, 180 °C. Após algum tempo, toda matéria orgânica foi completamente digerida, o que pôde ser identificado pelos vapores exalados que passaram a exibir coloração branca. Todo conteúdo dos frascos foram evaporados até restar, aproximadamente, 1,0 mL de amostra que, posteriormente, foi levada para volume final de 50,0 mL com água

desmineralizada. Foram utilizados frascos de polietileno para acondicionamento das amostras até o momento das análises.

As curvas de calibração dos minerais foram feitas a partir de soluções estoque, próprias para absorção atômica, diluídas em água desmineralizada.

Todas as vidrarias utilizadas foram higienizadas com detergente neutro e enxaguadas em água corrente, e posteriormente deixadas de molho em solução ácida preparada com ácido clorídrico (0,1 mol e pH < 1,0) durante uma noite, em seguida, enxaguadas três vezes com água desionizada.

Nas análises dos resultados, considerou-se o planejamento estatístico de Amostragem Simples ao Acaso (ASA). Aplicou-se o modelo linear de primeiro grau a fim de estudar a tendência dos resultados. Verificou-se a proporção de resultados nulos de alguns compostos que apresentaram índices seqüenciais de resultados com valores considerados zero e, fez-se um estudo de correlações entre os teores de cobre e acetaldeído. Todas as análises foram elaboradas utilizando o programa estatístico Software *Analysis and Experimentation Group* (SAEG, 2005), em nível de probabilidade de erro ( $\alpha$ ) de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cromatograma da Figura 5 ilustra os picos correspondentes para acetaldeído, acetato de etila, ácido acético, os alcoóis (metanol, etanol, 1-propanol, iso-butanol, 1-butanol, iso-amílico e 1 hexanol) e o padrão interno 4-metil-2-pentanol identificados em amostras de cachaças.



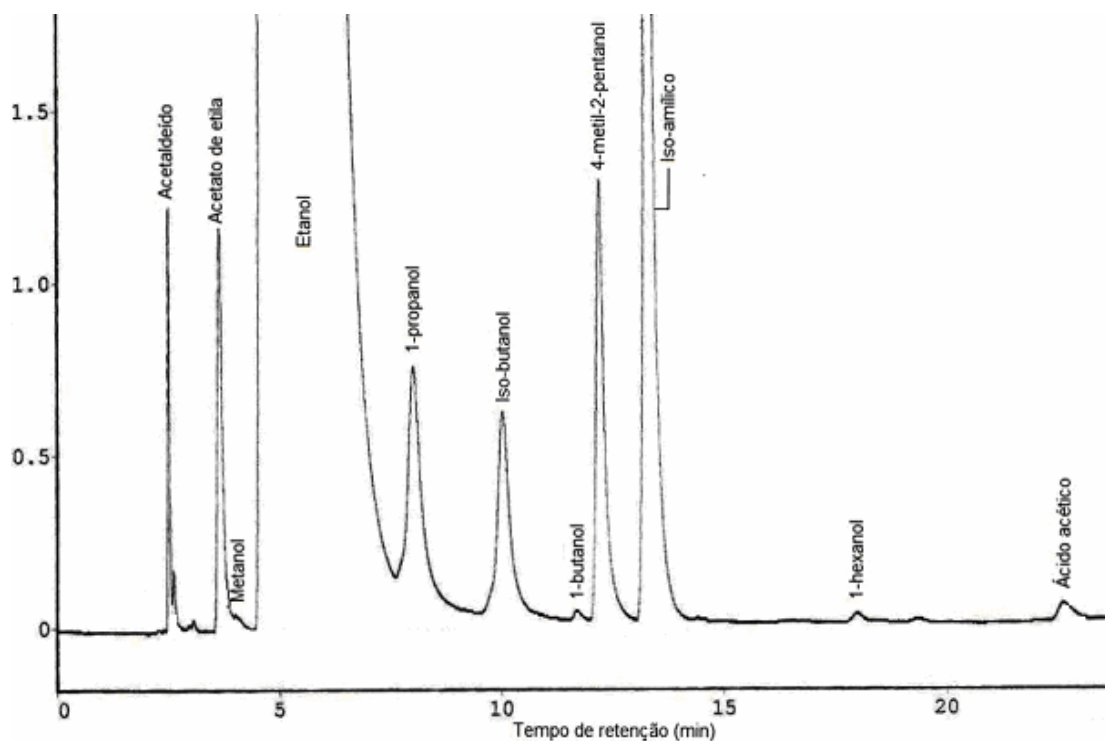


Figura 5 – Cromatograma típico de amostras de cachaça obtido por GC-FID em coluna polar LM-100. As condições cromatográficas estão descritas em materiais e métodos.

As Figuras 6, 7, 8 e 9 ilustram a variação dos teores de acetaldeído, acetato de etila, 1-propanol e 1-butanol nas frações seqüenciais das destilações. O ponto de corte da fração “cabeça”, realizado normalmente nestas indústrias, está delimitado pela linha vertical de cor vermelha plotada nos gráficos.

Os teores destes compostos foram mais elevados nos primeiros momentos da destilação, e a maioria não apresentou teores detectáveis após a primeira hora de destilação, o que indicou que estes compostos são típicos da fração do destilado de “cabeça”. Segundo Dias (2006), os produtos de “cabeça” são compostos totalmente ou parcialmente solúveis no álcool, sendo destilado quando o vapor contém alta concentração de álcool. Maia e Campelo (2006) citam o acetaldeído e o acetato de etila como sendo os principais compostos voláteis secundários da fração “cabeça”.

A análise de regressão linear foi significativa para os compostos acetaldeído, acetato de etila e 1-propanol, em todas as destilações estudadas, indicando uma queda linear nos seus teores. A investigação da proporção

dos resultados considerados nulos indica a ausência do composto acetato de etila em  $(65 \pm 5)\%$  das amostras analisadas, o acetaldeído não foi detectado em  $(62 \pm 4,5)\%$ , 1-propanol em  $(60 \pm 5)\%$  e o 1-butanol em  $(69 \pm 5)\%$ . Observa-se uma queda média nos teores de acetaldeído, acetato de etila e 1-propanol próximos a 50% nos primeiros 12 minutos de destilação, conforme ilustram as Figuras 6, 7 e 8.

Não houve homogeneidade nos teores de 1-butanol nas diferentes frações do destilado. Porém, após 80 minutos de destilação, esse composto não foi mais detectado, exceto no alambique 1 (Figura 9). A legislação atual permite que esse contaminante esteja presente na fração “coração” do destilado na concentração máxima de  $3,0 \text{ mg} \cdot 100\text{mL}^{-1}$  álcool etílico anidro (BRASIL, 2005). O principal fator para formação de 1-butanol nas fermentações alcoólicas é a contaminação por bactérias *acetobutílicas* (Maia e Campelo, 2006).

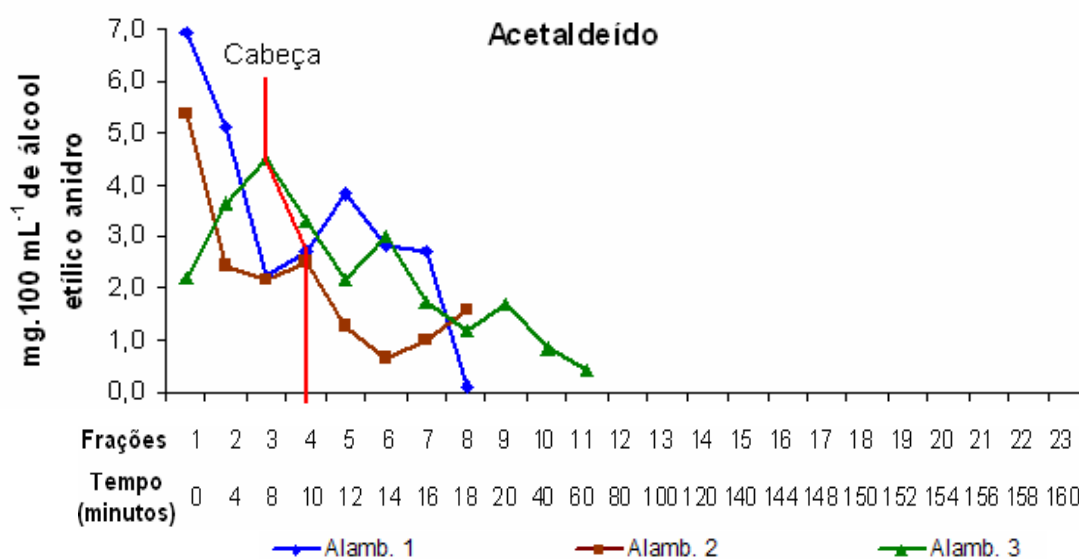


Figura 6 – Variação dos teores de acetaldeído durante a destilação.

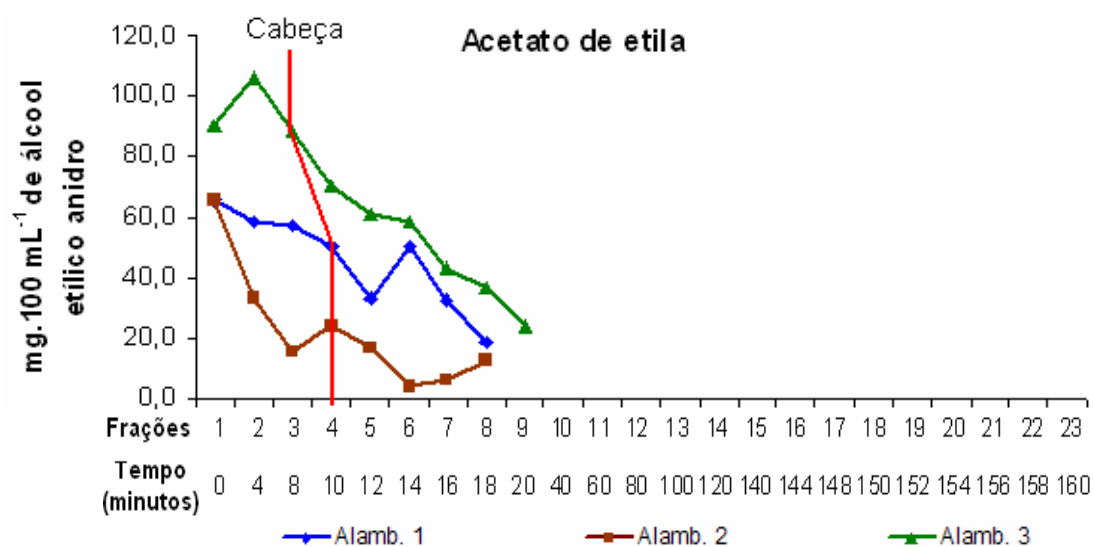


Figura 7 – Variação dos teores de acetato de etila durante a destilação.

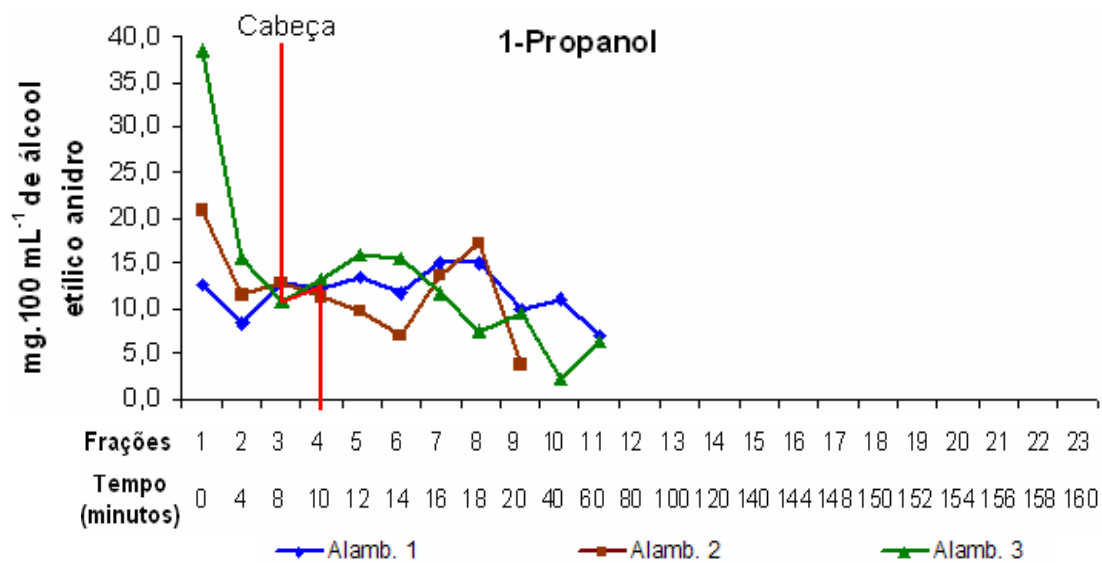


Figura 8 – Variação dos teores de 1-propanol durante a destilação.

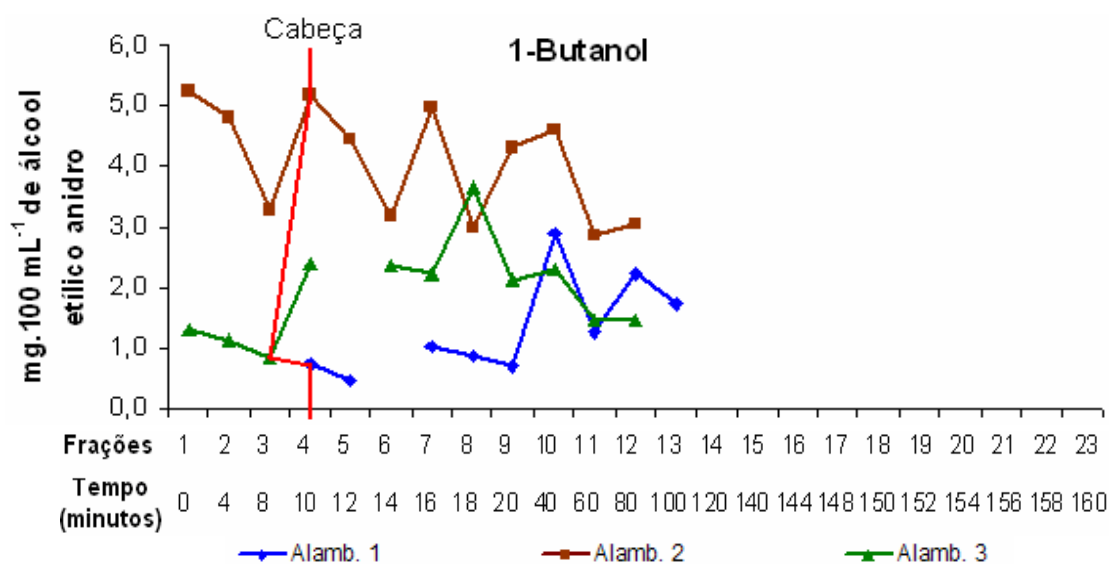


Figura 9 – Variação dos teores de 1-butanol durante a destilação.

Segundo Maia e Campelo (2006), o metanol é um composto típico do destilado de “cabeça”. Estes dados divergem dos encontrados neste estudo, que detectou o metanol ao longo da destilação, conforme ilustra a Figura 10. Investigando a proporção de resultados considerados nulos, foi observada a ausência do composto metanol em  $(22 \pm 4,9)\%$  do total de observações, indicando que este composto está presente na maioria das frações. De acordo com Dias (2006), os compostos solúveis em água e álcool etílico, com ponto de ebulição abaixo de  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$  são destilados do começo ao fim da destilação. O álcool metílico é solúvel tanto em água quanto em álcool etílico e seu ponto de ebulição é  $65,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

O metanol presente na cachaça origina-se a partir do metabolismo secundário das leveduras que fazem a fermentação das bebidas alcoólicas. Na cachaça, ele é formado principalmente quando não se tem o cuidado de separar, por filtragem, os fragmentos da cana-de-açúcar que se originam no momento da moagem (Crispim, 2000). Estes fragmentos, também conhecidos como bagacilhos, são ricos em pectina. A pectina é um polissacarídeo cuja unidade monomérica é o ácido galacturônico (Cardoso et al., 2005).

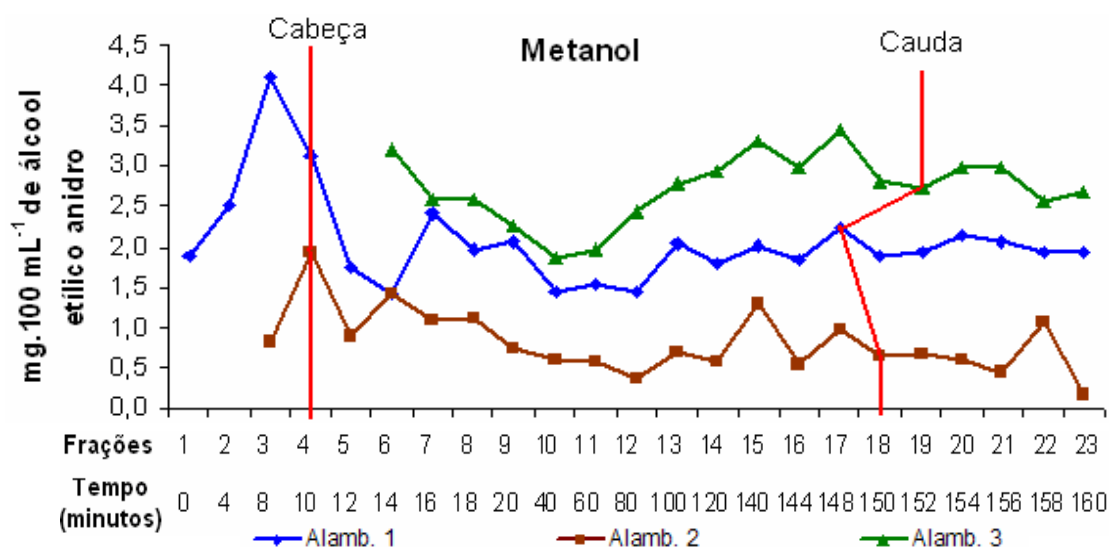


Figura 10 – Variação dos teores de metanol durante a destilação.

Ao longo da destilação, ocorre um abaixamento progressivo do teor alcoólico do destilado, conforme ilustra a Figura 11. Segundo Maia e Campelo (2006), uma boa destilação ocorre quando as primeiras frações do destilado possuem um teor de etanol acima de 70 °GL e se encerra em um teor abaixo de 20 °GL. Quando a eficiência é mais baixa, nota-se uma acentuada redução no teor alcoólico do destilado de “cabeça”, acompanhada de um aumento no teor alcoólico no destilado de “cauda”. A eficiência da destilação depende dos critérios operacionais e da geometria do alambique, que determinam a eficiência do refluxo dentro da coluna.

Um dos critérios operacionais é a intensidade da fonte de calor na panela do alambique. Quanto menor for essa fonte, maior será o teor de etanol nas primeiras frações, e as substâncias mais voláteis são mais destiladas; e aumentando a intensidade da fonte de calor, ocorre menor teor de etanol no destilado e, conseqüentemente, uma diminuição na destilação das substâncias mais voláteis nas diferentes frações (Dias, 2006).

A regressão linear foi significativa para todos os alambiques estudados, indicando que ocorre uma diminuição progressiva do teor de etanol ao longo da destilação. O perfil de destilação dos alambiques teve comportamento similar, entretanto, o alambique 2 aparentou ser o menos eficiente entre os três estudados.

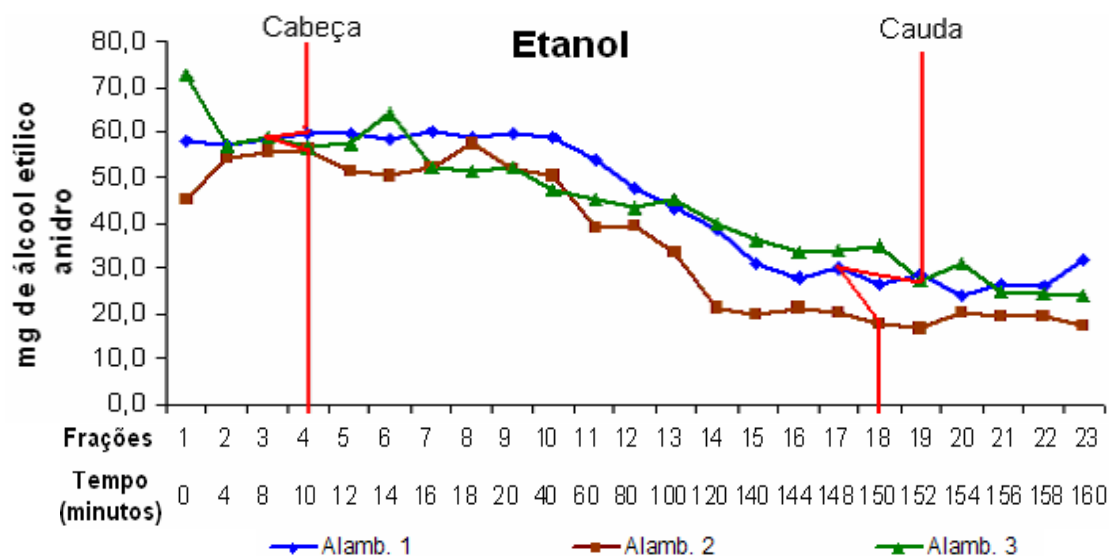


Figura 11 – Variação dos teores de etanol durante a destilação.

Observa-se que ao longo da destilação, ocorre um abaixamento progressivo dos teores de iso-butanol e iso-amílico (2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol), indicando um perfil bem próximo ao do etanol, conforme ilustram as Figuras 12 e 13. Segundo Maia e Campelo (2006), os alcoóis superiores têm afinidade semelhante pelo etanol e pela água. Por isso, saem ao longo de toda a destilação, com um perfil de concentração semelhante ao do próprio etanol. Estes dados condizem com os resultados encontrados neste estudo, onde a regressão linear ajuda a identificar esta similaridade, pois, assim como ocorreu com o etanol, ela foi significativa para todos os alambiques estudados, indicando que ocorre uma diminuição progressiva do teor destes alcoóis ao longo da destilação.

Os teores de compostos extremamente voláteis, tais como os alcoóis superiores, no destilado irão depender das condições do vinho do caldo de cana-de-açúcar associado às condições de destilação (Dias, 2006). A formação destes compostos é maior quando o fermento apresenta atividade fraca, ocasionando demora no processo fermentativo (Yokoya, 1995), assim como, as condições do meio de fermentação, a temperatura e o teor alcoólico final do vinho (Barcelos et al., 2007). Outras variáveis, como a concentração de aminoácidos e pH do mosto, tempo prolongado de armazenamento da cana-de-açúcar, também, interferem no teor de alcoóis superiores (Crowell, 1961).

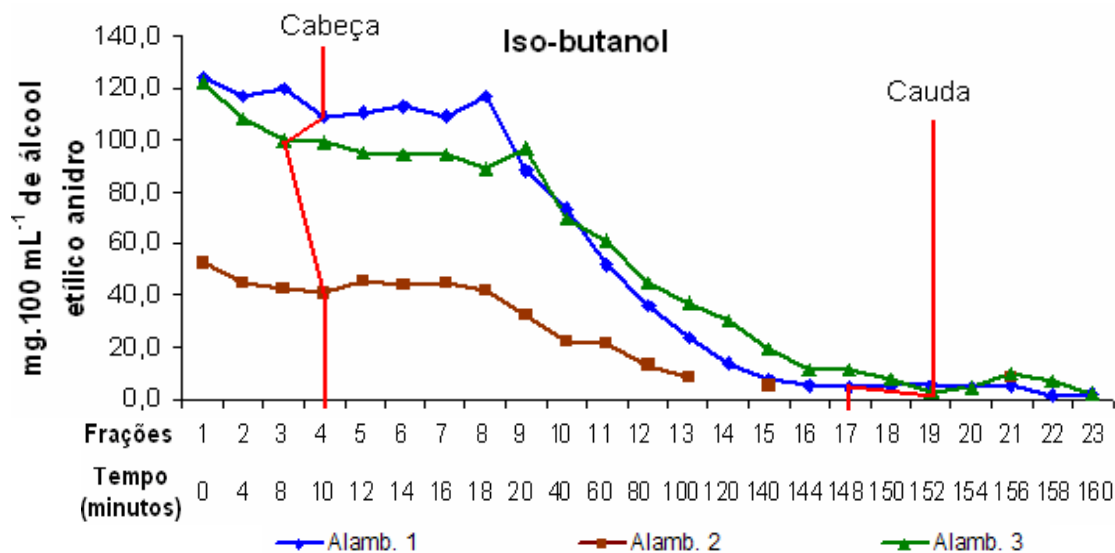


Figura 12 – Variação dos teores de iso-butanol durante a destilação.

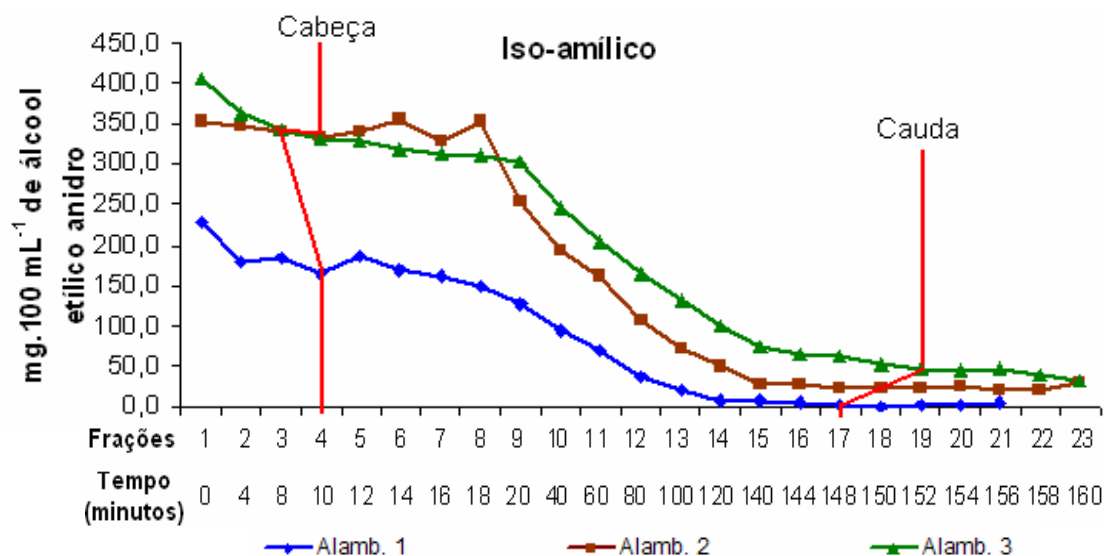


Figura 13 – Variação dos teores de iso-amílico durante a destilação.

Os alcoóis com até cinco átomos de carbono apresentam odores característicos (buquê) tradicionalmente associados com bebidas destiladas. Eles são responsáveis diretos pelo odor da bebida e possuem aromas característicos, com destaque para os álcoois amílico e propílico, e seus respectivos isômeros.

A Figura 14 ilustra a variação dos teores de 1-hexanol durante a destilação. Observa-se um incremento positivo nos seus teores ao longo da destilação, fato comprovado pela análise de regressão linear. Este composto é um dos alcoóis com mais de cinco átomos de carbono encontrado em frações do destilado da bagaceira, porém, Pintado et al., (2008) descrevem que concentrações mais elevadas de 1-hexanol em bagaceira está relacionado com a fração “cabeça”, decrescendo nas frações “coração” e “cauda”.

Do ponto de vista organoléptico é considerado um elemento negativo, por possuir aromas desagradáveis (Cardoso, 2006). Junto com outros óleos fúsel, é responsável por muitas das dores de cabeça e pela popular “ressaca” em consumidores de destilados ou de vinho (Crispim, 2000). Com o aumento do número de carbonos, o aroma é modificado e os alcoóis tornam-se oleosos (Cardoso, 2006).

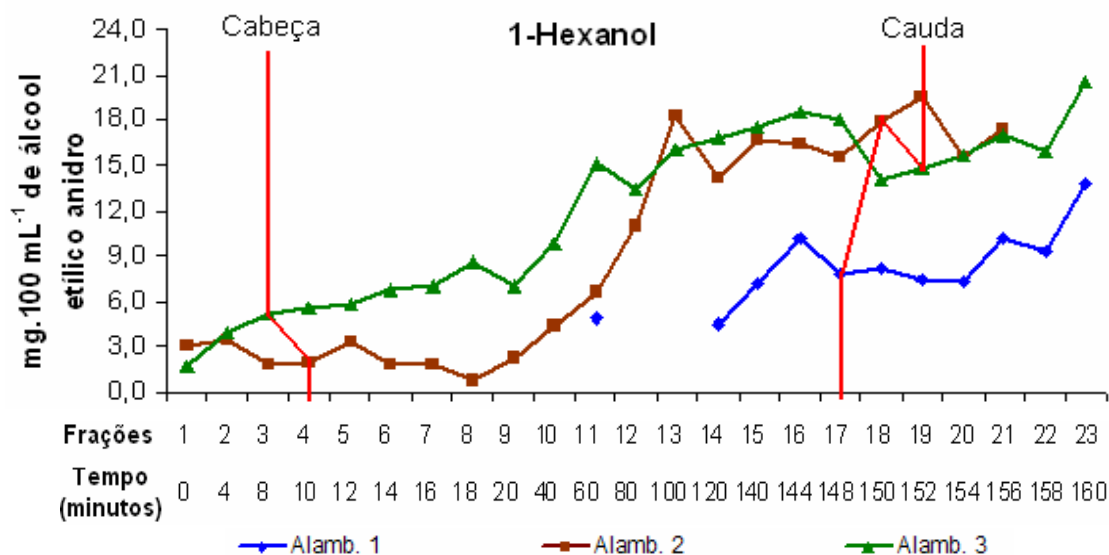


Figura 14 – Variação dos teores de 1-hexanol durante a destilação.

Entre os ácidos orgânicos, o ácido acético tem sido, quantitativamente, o principal componente da fração ácida das aguardentes (Cardoso et al., 2005). Observa-se um incremento positivo nos teores de ácido acético ao longo da destilação, conforme Figura 15, comprovado pela regressão linear, indicando que esse composto é volatilizado de forma mais acentuada na fase final da destilação.



Segundo Maia e Campelo (2006), dado ao seu caráter hidrofílico, o ácido acético estabelece interações mais fortes com a água do que com o etanol. Porém, a maior parte da acidez volátil do vinho da cana-de-açúcar não é transferida para cachaça, permanecendo no vinhoto.

A acidez de uma cachaça é de grande importância, constituindo um fator de qualidade, uma vez que, durante sua produção, os ácidos reagem com os alcoóis presentes, aumentando a formação dos ésteres, que são um dos constituintes responsáveis pelo aroma. No entanto, o excesso de acidez promove sabor indesejado e ligeiramente “agressivo” na cachaça, depreciando a qualidade da bebida (Cherubin, 1998). Altas concentrações de ácido acético provocam sensações de ardor na garganta e odor de vinagre (Lima e Nóbrega, 2004).

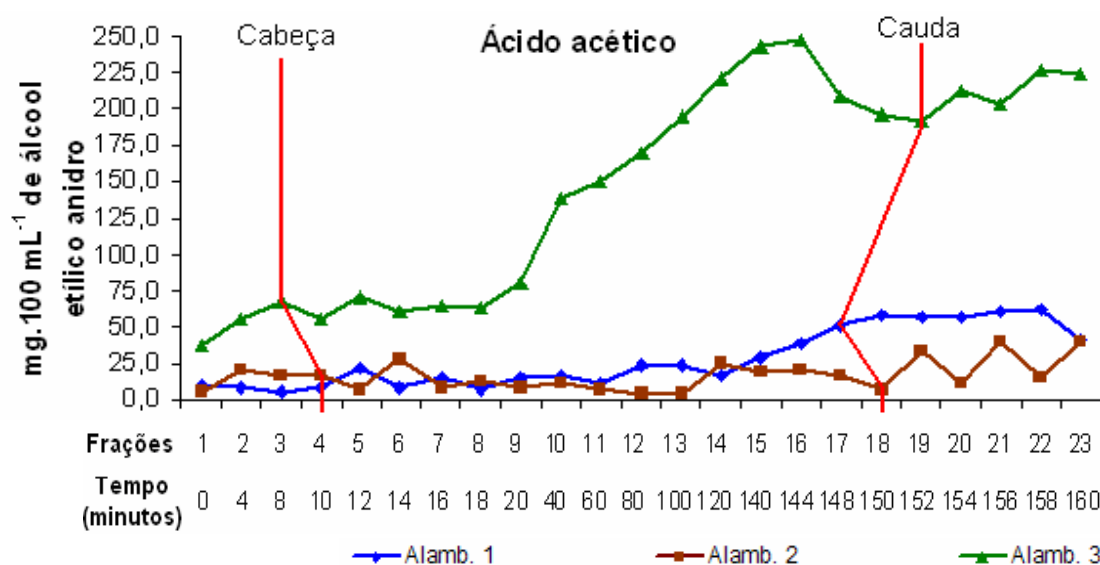


Figura 15 – Variação dos teores de ácido acético durante a destilação.

As Figuras 16, 17 e 18 ilustram os teores de cobre, zinco e ferro durante a destilação do vinho de cana-de-açúcar.

Ao verificar a correlação entre os teores de ácido acético e cobre, observou-se ser significativa apenas para o alambique 3, o mesmo ocorrendo com a regressão linear, indicando um incremento positivo neste alambique. Este, ainda, contém altos índices de cobre nas suas frações, chegando a teores

máximos próximos a 55 mg por litro de amostra, extremamente elevado, quando comparado ao teor máximo permitido pela legislação brasileira, de 5,0 mg por litro de amostra (BRASIL, 2005).

Segundo Boza e Horii (2000), os teores de cobre correlacionam com os teores de acidez ao longo da destilação, sendo elevados, principalmente, na fração “cauda” da destilação.

A assepsia adequada dos alambiques, após o término da alambicagem, diariamente, reduz consideravelmente os teores de cobre nos destilados (Sargentelli et al., 1996). Lima & Nóbrega (2004) ao avaliarem os parâmetros de qualidade em aguardentes de cana produzidas no Estado da Paraíba descrevem que a separação das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”, nas destilações fazem parte dos diversos procedimentos que podem controlar os níveis de cobre nas cachaças. Boza e Horri (2000) indicam que separando a fração “cauda” melhora-se a qualidade da cachaça pela redução de cobre e ácido acético.

O excesso de cobre pode ser tóxico devido à afinidade do cobre com grupos S-H de muitas proteínas e enzimas. Sua ingestão em excesso está associada a várias doenças, como a epilepsia, melanoma e artrite reumatóide, bem como à perda do paladar (Sargentelli, et al., 1996).

Nascimento *et al.* (1999) avaliaram o perfil de íons metálicos em sessenta e nove cachaças, sendo dezesseis amostras tipo exportação, trinta e sete comercializadas no mercado interno e dezesseis produzidas de forma artesanal indicam a presença de zinco em todas as amostras analisadas.

O bronze é uma liga metálica de cobre e zinco muito utilizado, principalmente, em válvulas, tampas e peças moldáveis das usinas (Veiga, 2006). Provavelmente, a fonte de zinco encontrada nas amostras se deve a estes componentes, que fazem parte de destiladores.

Há certo interesse na quantificação do elemento ferro na cachaça, pois este pode alterar as características sensoriais da bebida. As possíveis fontes deste mineral em cachaças são as peças utilizadas no processo de destilação.

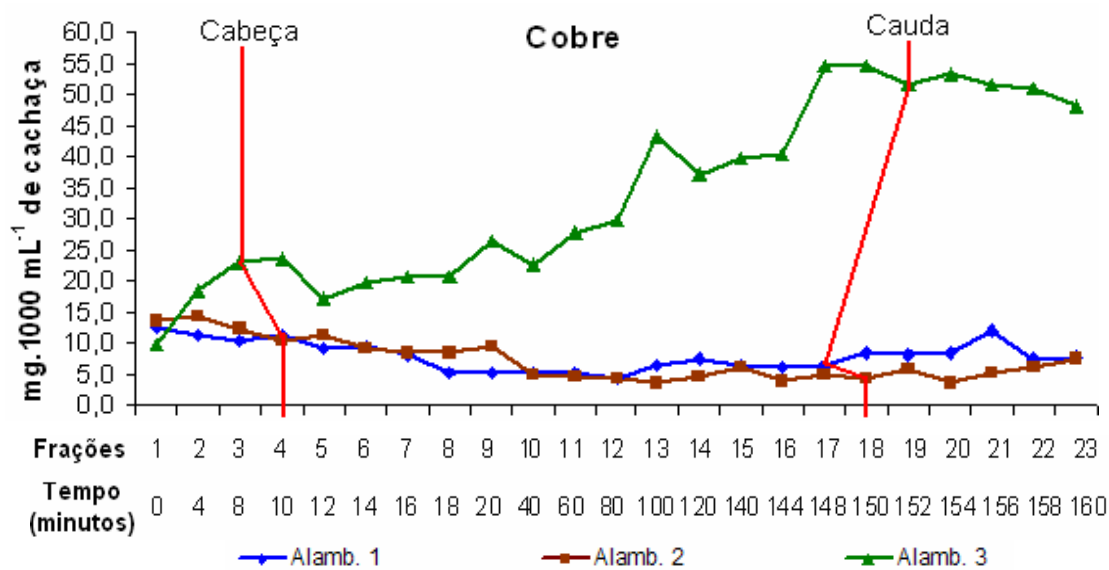


Figura 16 – Variação dos teores de cobre durante a destilação.

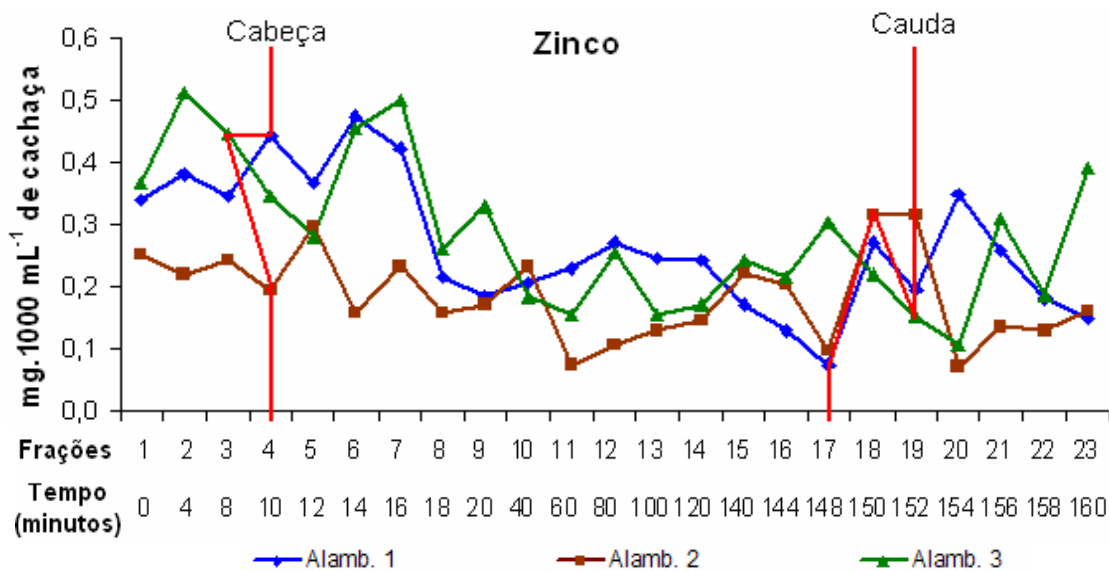


Figura 17 – Variação dos teores de zinco durante a destilação.

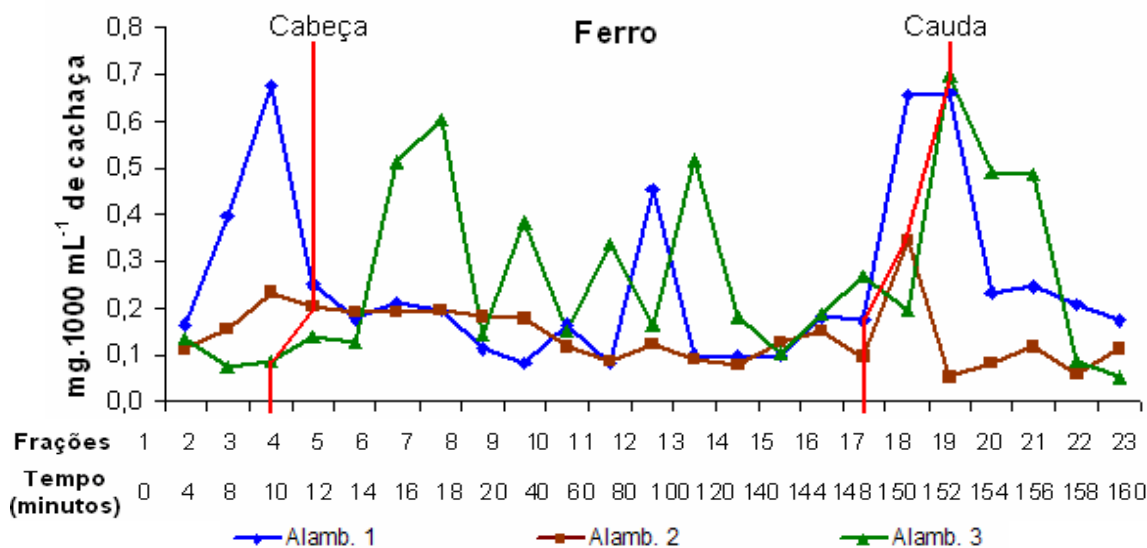


Figura 18 – Variação dos teores de ferro durante a destilação.

## CONCLUSÕES

Definindo criteriosamente os pontos de corte dos destilados de “cabeça”, “coração” e “cauda”, o produtor ajusta a proporção dos componentes secundários da cachaça.

Os compostos acetaldeído, acetato de etila, 1-propanol são mais elevados nos primeiros momentos da destilação, podendo ser considerados componentes secundários da cachaça, predominantemente, da fração “cabeça”.

Os teores de metanol encontram-se distribuídos de forma homogênea ao longo de toda destilação. Observa-se que ocorre uma redução dos teores de etanol, iso-butanol e iso-amílico (2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol), com teores menores nas últimas amostras coletadas ou fração “cauda” e os mais elevados nas primeiras coletas, ou “coração”.

Observa-se um incremento nos teores de 1-hexanol e ácido acético, com concentrações mais elevadas na fase final da destilação ou fração “cauda”. Também, detectou-se uma correlação positiva entre o ácido acético e cobre, nos destilados do alambique três.

Foi detectado cobre, zinco e ferro em todas as frações estudadas, com teores bem superiores aos demais nas amostras coletadas no alambique três.

Aumentando o tempo de corte da fração “cabeça” e diminuindo o da fração “cauda”, diminui-se o volume da fração “coração”, mas, também, reduz os teores de basicamente todos os componentes estudados, exceto o metanol, zinco e ferro.

### AGRADECIMENTOS

A FAPERJ, pelo Auxílio Pesquisa para a execução do projeto e bolsa do Doutorado, aos produtores Demétrio, Paulo Sérgio e Bozó pelas amostras de cachaças cedidas. Ao Professor Pedro H. Monnerat e ao técnico de nível superior José Acácio da Silva, pela leitura dos teores de cobre, ferro e zinco.

### REFERÊNCIAS

- Barcelos, L.V.F., Cardoso, M.G.C., Vilela, F.J., Anjos, J.P (2007). Teores de carbamato de etila e outros componentes secundários em diferentes cachaças produzidas em três regiões do Estado de Minas Gerais: Zona da Mata, Sul de Minas e Vale do Jequitinhonha. *Química Nova*, 30 (4):1009-1011.
- Boza, Y., Horii, J. (2000) Influência do grau alcoólico e da acidez do destilado sobre o teor de cobre na aguardente de cana. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da Universidade Federal do Paraná (B.CEPPA)*, Curitiba – PR, 18 (1):85-94.
- BRASIL. (2005) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 13, de 29 de junho de 2005. *Diário Oficial da União*. Brasília, 30 de junho de 2005.
- Cardoso, M.G. (2006) Análises físico-químicas de aguardente. *In: Cardoso, M.G. (ed.) Produção de aguardente de cana. 2° ed.* Editora UFLA – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, p. 203-232.

- Cardoso, M.G., Campos, G.A., Silva, R.A., Santos, C.D., Pinto, A.P.S., Silva, C.F. *Cachaça: qualidade e produção*. Boletim Extensão, publicado pela PROEX/UFLA. Disponível em <<http://www.editora.ufla.br>>. Página mantida pela PROEX/UFLA. Acesso em 12 de julho de 2005.
- Cherubin, R.A. (1998) *Efeito da adição de benzoto de sódio na fermentação alcoólica para a produção de aguardente de cana-de-açúcar (Saccharum spp)*. Tese (Mestrado em Ciências e Tecnologias de Alimentos) – Piracicaba, SP. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo – ESALQUE, 70p.
- Crispim, J.E. (2000) *Manual da produção de aguardente de qualidade*. Guaíba – RS; Editora Agropecuária LTDA, 333 p.
- Crowell, E. A. (1961) Techniques for studying the mechanism of higher alcohol formation by yeasts. *American Journal Ecology and Viticulture*, Washington, 12:111-116.
- Dias, S.M.B.C. (2006) O processo da destilação. In: Cardoso, M.G. (ed.) *Produção de aguardente de cana*. 2º ed. Editora UFLA – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, p. 137-202.
- Lima, A.K.S., Nóbrega, I.C.C. (2004) Avaliação de parâmetros de qualidade em aguardente de cana produzidas no Estado da Paraíba. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da Universidade Federal do Paraná (B.CEPPA)*, Curitiba – PR, 22 (1):85-96.
- Maia, A.B.R.A., Campelo, E.A.P. (2006) *Tecnologia da cachaça de alambique*. SEBRAE/MG; SINDBEBIDAS – Belo Horizonte – MG, 129 P.:il.
- Nascimento, R.F., Bezerra, C.W.B., Furuya, S.M.B., Schultz, M.S., Polastro, L.R., Lima Neto, B.S., Franco, D.W. (1999) Mineral profile of brazilian cachaças and other international spirits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 12:17-25.
- Pintado, A.I.E., Costa, M.L.S., Castro, T.M.C.A.S., Trigueiros, J.B.L., Malcata, F.X. (2008) *Bagaceira de Vinho Verde Branco: caracterização do processo tradicional de produção e melhoramento tecnológico*. Boletim publicado pela Universidade Católica Portuguesa e editada pelos serviços de edição da Escola Superior de Biotecnologia, 52 p.

- SAEG 9.0. (2005) *Sistema para Análises Estatísticas-SAEG*. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes, Cd ROM, versão 9.0.
- Sargentelli, V., Mauro, A.E., Massabni, A.C. (1996) Aspectos do metabolismo do cobre no homem. *Química Nova*, São Paulo, 19 (3):290-293.
- SEBRAE, Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. (2004) *Cachaça: um negócio brasileiro*. São Paulo – SP, 1ª Ed, 66p.
- Veiga, J.F. (2006) Equipamentos para produção e controle de operação da fábrica de cachaça. *In: Cardoso, M.G. (ed.) Produção de aguardente de cana*. 2º ed. Editora UFLA – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, p. 68-100.

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS EM ALAMBIQUES DO  
MUNICÍPIO DE CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ**

**Leandro Marelli de Souza<sup>1\*</sup>, Meire Lélis Leal Martins<sup>1</sup>, Karla Silva Ferreira<sup>1</sup>,**

<sup>1</sup>Laboratório de Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Av. Alberto Lamego, N° 2000, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes – RJ, Brasil. e-mail: marelli@uenf.br



## RESUMO

Durante a produção artesanal de cachaça, os produtores preparam receitas próprias para o desenvolvimento da microbiota fermentadora, processo conhecido como fermentação espontânea, pois é realizada pelos microrganismos que acompanham o caldo e/ou equipamentos. Porém, o uso de leveduras selecionadas, na maioria das vezes, aumenta a produtividade do alambique e melhora a qualidade do produto final. Neste contexto, este estudo foi realizado com o objetivo de isolar leveduras nativas em mostos de fermentação de dois alambiques localizados no município de Campos dos Goytacazes –RJ, a fim de selecionar aquelas com propriedades apropriadas para a produção de cachaça. Das 130 colônias que foram isoladas, apenas 25 foram capazes de crescer em uma concentração de etanol de 10%. Destas, 10 que apresentaram melhores crescimentos, foram selecionadas e submetidas à caracterização morfológica e bioquímica. Todas as seis colônias isoladas da destilaria BZ apresentaram resultados incompatíveis com a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, de acordo com a fonte de carbono estudada, enquanto que todas as quatro colônias da destilaria PS (PS13, PS36, PS43 e PS46) foram compatíveis. Entretanto, de acordo com os resultados do teste de fermentação de carboidratos, das dez colônias estudadas, apenas as colônias PS36, PS43 e BZ32 apresentam características compatíveis com a espécie *S. cerevisiae*. Em relação ao teste de assimilação de nitrogênio, todas as leveduras avaliadas possuem características similares a *S. cerevisiae*. Com base nestes resultados, conclui-se que apenas três estirpes isoladas apresentam resultados bioquímicos compatíveis com a espécie *S. cerevisiae* e para uma identificação mais precisa das estirpes selecionadas é necessário aumentar a quantidade de fontes de carbono estudadas, ou utilizar técnicas de biologia molecular.

Palavras-chave: aguardente, *Saccharomyces cerevisiae*, álcool, bebidas.

## ABSTRACT

During the craft production of cachaça, the producers prepare own incomes for the development of the yeasting microbiota, process known as spontaneous fermentation, because it is accomplished by the microorganisms that accompany the broth and/or equipments. However, the use of selected yeasts, most of the time, increases the productivity of the still and improvement the quality of the final product. In this context, this study was accomplished with the objective of isolating native yeasts in musts of fermentation of two located stills in the municipal district of Campos dos Goytacazes –RJ, in order to select those with appropriate properties for the production of cachaça. Of the 130 colonies that were isolated, only 25 were capable to grow in a concentration of ethanol of 10%. Of these, 10 that presented better growths, were selected and submitted to the morphologic and biochemical characterization. All the six isolated colonies of the distillery BZ presented incompatible results with the species *Saccharomyces cerevisiae*, in agreement with the source of carbon studied, while all the four colonies of the distillery PS (PS13, PS36, PS43 and PS46) were compatible. However, in agreement with the results of the test of carbohydrates fermentation, of the ten studied colonies, just the colonies PS36, PS43 and BZ32 present compatible characteristics with the species *S. cerevisiae*. In relation to the test of assimilation of nitrogen, all of the appraised yeasts possess similar characteristics to *S. cerevisiae*. With base in these results, it is ended that only three isolated ancestries present compatible biochemical results with the species *S. cerevisiae* and for a more necessary identification of the selected ancestries it is necessary to increase the amount of sources of carbon study, or to use techniques of molecular biology.

key-Word: aguardente, *Saccharomyces cerevisiae*, alcohol, drinks.

## INTRODUÇÃO

Um dos principais aspectos da produção artesanal de cachaça é a preparação do fermento iniciador, que consiste na propagação da microbiota fermentativa em uma mistura de caldo-de-cana com milho, arroz e/ou farinha de soja.

O processo ocorre dentro da cuba de fermentação e pode durar de cinco a 20 dias, até que a população de leveduras seja suficiente para iniciar o ciclo fermentativo. As espécies de leveduras presentes neste “pé-de-cuba” variam de região para região, sendo afetadas, principalmente, pelas variedades de cana-de-açúcar utilizadas, as condições climáticas da região e as peculiaridades operacionais de cada produtor (Ribeiro, 2002) e apresentam características diferentes com relação à tolerância às condições ambientais durante o processo fermentativo, desde a formação do “pé-de-cuba” até o final da fermentação alcoólica (Pataro et al., 2002).

As características fisiológicas das espécies de leveduras isoladas no mosto fermentado têm grande relevância na compreensão dos mecanismos envolvidos na colonização do mosto e na determinação das condições ótimas para se manter uma fermentação saudável (Pataro et al., 2002). Dessa forma, a seleção do fermento é considerada uma das medidas que podem contribuir para a melhoria do processo de fabricação de cachaça.

As linhagens de leveduras comumente empregadas na produção de bebidas alcoólicas apresentam algumas limitações como: ineficiência na fermentação do mosto, com baixa conversão dos carboidratos a etanol devido ao excessivo crescimento da levedura e à sua inabilidade em fermentar todo o açúcar presente no mosto; variações nas propriedades floculantes das leveduras; baixa termoestabilidade, tolerância a etanol e pressão osmótica; contaminação da fermentação por outros microrganismos (Hammond, 1995).

As leveduras envolvidas na fermentação do caldo de cana-de-açúcar incluem, principalmente, os gêneros *Saccharomyces*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces* e diversas espécies de *cândida*. A *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie de levedura predominante (Schwan et. al., 2001) e a cachaça produzida pode apresentar variações em algumas de suas características ao longo da safra e entre diferentes

safras em razão da microbiota envolvida no processo fermentativo. O uso de linhagens selecionadas de *S. cerevisiae*, isoladas durante o processo de fermentação do caldo de cana-de-açúcar na preparação do “pé-de-cuba”, tem evitado este problema. O uso desta técnica, na maioria das vezes, aumenta a produtividade do alambique e melhora a qualidade do produto final, principalmente em relação aos teores de acidez e concentração de alcoóis superiores, visto que as leveduras selecionadas podem apresentar maior tolerância ao etanol, à temperatura e apresentar outras características positivas para a fabricação da cachaça (Pataro et al., 2002).

Este trabalho teve como objetivo isolar, selecionar e caracterizar parcialmente leveduras nativas em mostos de fermentação de dois alambiques localizados no município de Campos dos Goytacazes –RJ.

## **2.0 – MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 – Coleta de amostra para o isolamento das leveduras**

Amostras de mosto em processo de fermentação foram coletadas em duas destilarias de cachaça, identificadas como BZ e PS, localizadas no Município de Campos dos Goytacazes, região Norte do Estado do Rio de Janeiro, nos meses de Novembro de 2007 e Maio de 2008. Foram coletadas seis amostras em diferentes pontos dentro de cada uma das dornas de fermentação usando tubos de ensaio esterilizados. Dois pontos na superfície, dois no meio e dois no fundo. Os tubos foram acondicionados em caixa de isopor com gelo e, imediatamente, transportados até o Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. A fermentação no momento da coleta estava em atividade, com média de oito a doze horas de fermentação. Foi feito uma única coleta, em cada um dos alambiques. Para o isolamento das leveduras, foi utilizada uma amostra composta das coletas feitas em cada um dos alambiques.

## 2.2 – Métodos gerais utilizados nos experimentos

A esterilização dos materiais, meios de cultivo e soluções foram feitas em autoclave PHOEMIX, modelo AV 75, a 1 atm de pressão e a 121 °C durante 20 minutos.

As incubações foram feitas em estufa microbiológica (BOD), Marca Quimis, modelo Q – 315 D.

Os procedimentos de sementeiras dos microrganismos foram realizados em fluxo laminar VECO, modelo HLFS - 12 (Departamento de microbiologia, UENF).

A determinação espectrofotométrica foi efetuada em aparelho espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu modelo UV-1240 Mine (Departamento de microbiologia, UENF).

## 2.3 – Meios de cultura utilizados

### 2.3.1 – Meio YP (meio básico)

O meio de cultura básico apresentou a seguinte composição:

Extrato de levedura .....	1,0 g
Peptona .....	2,0 g
Agar .....	2,0 g
Glicose .....	2,0 g
Clorafenicol (0,1%) .....	1,0 mL
Água destilada .....	qsq 100 mL

O meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C, por 15 minutos e posteriormente foi adicionada uma solução estéril de glicose (2% p/v).

Nos experimentos onde foi usado o etanol, o mesmo não sofreu nenhum processo de esterilização e foi adicionado no momento do plaqueamento, com o meio apresentando uma temperatura próxima a 55 °, medidos em um termômetro Digital infravermelho com mira a laser, modelo Scan Temp 440.

### 2.3.2 – Meio sólido Agar Lisina

Agar .....	2,0 g
Glicose .....	2,0 g
Lisina .....	0,056 g
Clorafenicol (0,1%) .....	1,0 mL
Água destilada .....	qsq 100 mL

### 2.3.3 – Meio YNB (Yeast Nitrogen Base – DIFCO)

O meio *Yeast Nitrogen Base* (DIFCO Laboratories) foi preparado conforme indicado pelo fabricante. As fontes de carbono utilizadas foram glicose, sacarose, galactose, maltose, rafinose, manitol, lactose e xilose.

### 2.3.4 – Meio YCB (Yeast Carbon Base – DIFCO)

O meio *Yeast Carbon Base* (DIFCO Laboratories) foi preparado conforme indicado pelo fabricante. As fontes de nitrogênio utilizadas foram nitrato de potássio, nitrito de sódio e lisina.

Os meios descritos nos itens 2.2.3 e 2.2.4 foram preparados separando-se a fonte de nitrogênio da fonte de carbono. Para isso, a fonte de nitrogênio e de carbono foram dissolvidas em água destilada, separadamente, usando erlenmeyer como recipiente. Na solução da fonte de carbono foram acrescentados 2 g% de Agar para tornar o meio sólido e 1,0 mL de clorafenicol (0,1%) em cada 100 mL de meio. Os frascos foram esterilizados em autoclave sob vapor fluente durante 40 minutos e em seguida, asépticamente, procedeu-se à mistura e posterior distribuição em placas estéreis.

Quando necessário o pH do meio de cultura foi corrigido para 5,5, com solução de hidróxido de sódio 2 Molar.

## 2.4 – Isolamento das leveduras

Para o isolamento das leveduras, foi utilizada uma amostra composta do mosto em processo de fermentação de cada destilaria. A amostra (25 mL) foi diluída com 225 mL de solução salina (0,85%), usando cloreto de sódio PA, e em

seguida foram realizadas diluições em série destas amostras ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ ). Para cada diluição foram empregadas três placas de Petri contendo o meio sólido *YP*. No centro de cada placa foi semeada, assepticamente, 200  $\mu$ L que foi espalhado com auxílio de uma alça de Drigalski (espalhadores). Posteriormente, as placas foram incubadas a 35 °C durante 72 horas.

As colônias isoladas crescidas, com características macroscópicas e microscópicas de levedura, foram semeadas, com auxílio de uma alça estéril, por esgotamento em placas de Petri contendo meio sólido *YP*. As placas foram colocadas novamente em estufa a 35 °C durante 72 horas. Após repetir este processo por mais cinco vezes, as colônias foram consideradas isoladas.

## **2.5 – Conservação das leveduras**

As leveduras isoladas foram repicadas em tubo de ensaio contendo meio sólido *YP* inclinado e mantidas a (5-7) °C, até sua reativação para análises.

## **2.6 – Seleção das leveduras**

### **2.6.1 – Teste de exclusão por meio sólido Ágar Lisina**

As colônias isoladas foram semeadas em placas de Petri contendo meio sólido *YP* e meio sólido *Ágar Lisina*. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa a 35 °C durante 72 horas.

### **2.6.2 – Teste de exclusão por estresse**

As leveduras isoladas foram semeadas em placas de Petri contendo meio sólido *YP*, colocadas em estufa a 30 °C, durante 12 horas. Após este período de crescimento foi preparada uma suspensão de células de cada levedura com água destilada estéril e realizada a leitura da turbidez a fim de se avaliar a concentração celular. Em seguida, uma alíquota de 200  $\mu$ L destas suspensões, com densidade óptica em torno de 0,100 de absorbância a 650 nm, foi semeada em placas de Petri contendo os meios estéreis a serem empregados nos testes de exclusão por estresse.

As condições de estresse testadas no crescimento dos microrganismos foram meio sólido *YP* contendo 8% (v/v) de etanol e 20% de glicose e meio sólido *YP* contendo 10% (v/v) de etanol.

Primeiramente as leveduras foram crescidas em meio sólido *YP* contendo 8% (v/v) de etanol e 20% de glicose a 35 °C durante 72 horas. As leveduras que cresceram nestas condições foram então, transferidas para o meio sólido *YP* contendo 10% (v/v) de etanol e incubadas a 35 °C durante 72 horas.

## **2.7 – Caracterização parcial das leveduras isoladas e selecionadas**

### **2.7.1 – Identificação morfológica**

A morfologia colonial foi avaliada quanto ao tamanho, textura, cor, superfície, borda e elevação.

### **2.7.2 – Teste de assimilação de fontes de carbono**

Para este teste, uma alíquota de 200 µL, preparada como descrito na secção 2.5.2, foi semeada em placas de Petri contendo meio *Yeast Nitrogen Base* adicionado separadamente de cada uma das fontes de carbono a serem testadas, todas na concentração de 2 g% (glicose, sacarose, maltose, galactose, manitol, lactose e xilose). As placas foram incubadas em estufa a 30 °C durante 72 horas e posteriormente o crescimento das leveduras foi observado.

### **2.7.3 – Teste de assimilação de fontes de nitrogênio**

Para este teste, uma alíquota de 200 µL, preparada como descrito na secção 2.5.2, foi semeada em placas de Petri contendo o meio *Yeast Carbon Base* adicionado separadamente, da fonte de nitrogênio a ser testada na concentração de 2 g% (lisina, nitrato de potássio e nitrito de sódio). As placas foram incubadas em estufa a 30 °C durante 72 horas e, posteriormente, o crescimento das leveduras foi observado.



### 2.7.4 – Teste de tolerância à temperatura

Para este teste as leveduras foram semeadas em placas de Petri contendo o meio sólido *YP* e incubadas a temperaturas de 25 °C, 37 °C e 45 °C por 72 horas. Após este período foi observado o crescimento das colônias.

## 3.0 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 – Isolamento e seleção das leveduras

#### 3.1.1 – Diferenciação das cepas *Sacharomyces* e não *Sacharomyces*

Em torno de 130 colônias de leveduras foram isoladas do mosto em processo de fermentação das duas destilarias de cachaça. A Figura 1 mostra colônias típicas de leveduras isoladas em meio *YP*.

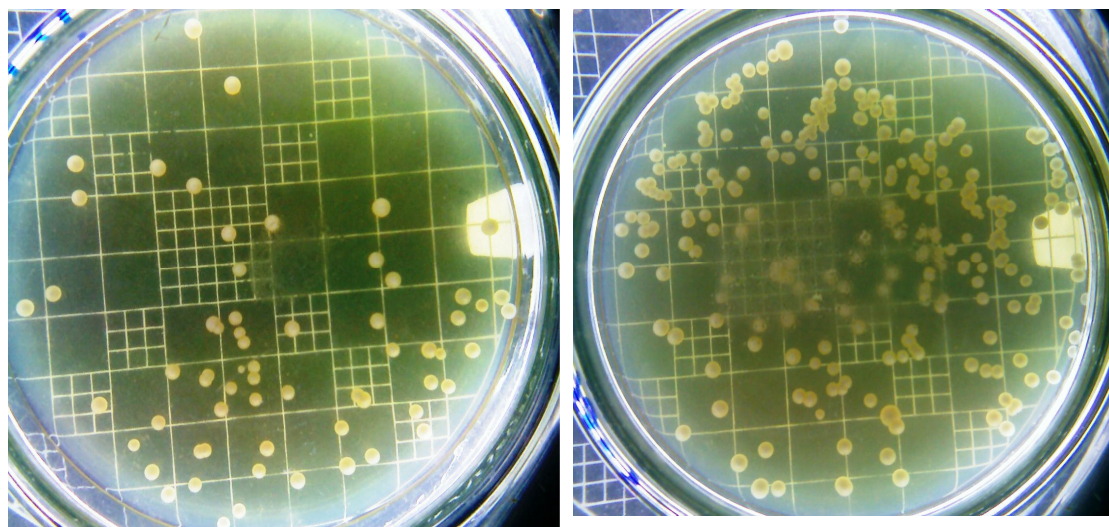


Figura 1 – Colônias de leveduras isoladas em meio sólido *YP*.

As leveduras isoladas foram submetidas ao teste de exclusão por meio sólido *Agar Lisina* a fim de diferenciar as leveduras *Saccharomyces* das não *Saccharomyces*, visto que as leveduras do gênero *Saccharomyces* não se desenvolvem quando cultivadas neste meio, enquanto as não *Saccharomyces* se desenvolvem. Todas as leveduras isoladas não se desenvolveram no meio *Agar Lisina*, o que sugere que as mesmas pertencem ao gênero *Saccharomyces*, podendo ser ou não *Saccharomyces cerevisiae*. A Figura 2 mostra o resultado observado com uma das colônias isoladas.

De acordo com Ceccato-Antonini e Silva (2000), são vários os meios propostos para a detecção de leveduras contaminantes *Saccharomyces* ou não *Saccharomyces*, entretanto, todos apresentam variações, o que demonstra que para se conhecer melhor a presença de leveduras contaminantes durante o decorrer de uma safra, o uso de um só meio diferencial não é o suficiente, principalmente quando se trata de leveduras contaminantes pertencentes ao gênero *Saccharomyces*.

Em um trabalho realizado por Heard e Fleet (1985) foi mostrado que o crescimento de *S. Saccharomyces* foi inibido em meio *Lisina*, sendo que para estirpes naturais o crescimento foi observado nas primeiras 48 h após a incubação. O meio de *Lisina*, segundo Lin (1975), serve para distinguir colônias visíveis, que se desenvolvem graças à presença de traços de nitrogênio no meio.

A grande maioria dos produtores de cachaça não trabalha com cepas de leveduras isoladas, mas sim, com um grupo de cepas, normalmente conhecidas como fermento. O fermento natural (selvagem) é constituído por células de leveduras que já estão naturalmente adaptadas ao ambiente (Schwan et al., 2006).

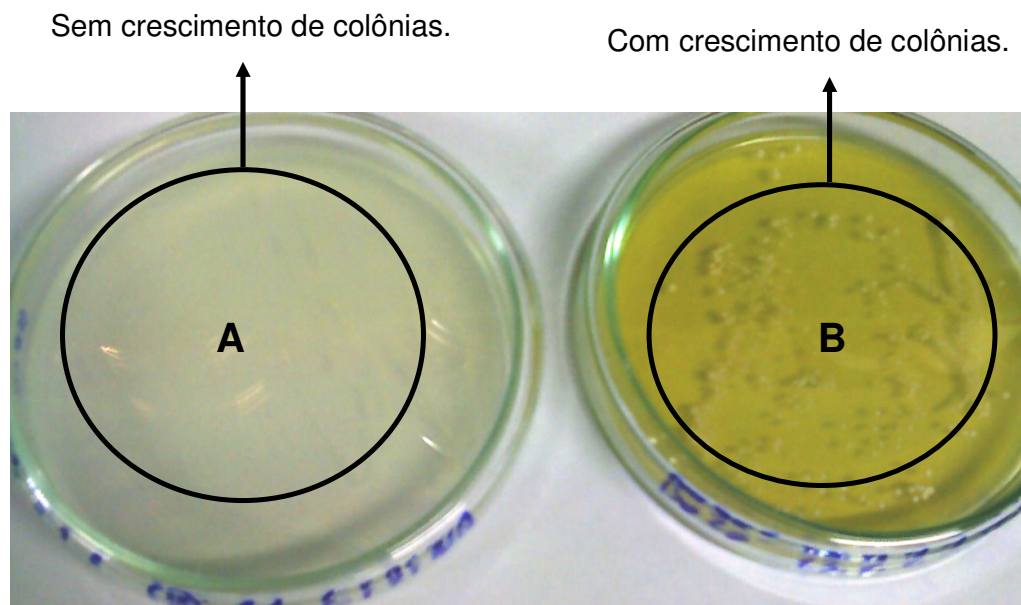


Figura 2 – Crescimento de colônias de levedura isolada (por número) em meio *Agar lisina* (A) e meio *Agar YP* (B).

### 3.1.2 – Teste de exclusão por estresse

Durante a fermentação alcoólica, as células de leveduras não encontram um ambiente fisiológico com condições ótimas, sendo expostas simultaneamente e seqüencialmente a várias condições de estresse, sendo o osmótico e o etanólico considerados os mais importantes (Querol et. al., 2003). Assim, as leveduras isoladas foram cultivadas em meio contendo altas concentrações de açúcar e álcool.

Todas as leveduras isoladas foram capazes de crescer quando a quantidade de glicose do meio básico *YP*, que era de 2 g%, foi aumentada para 20 g% e feita a adição de etanol para que a concentração fosse 8%. Entretanto, quando se manteve a concentração de glicose de 2 g% e aumentou a concentração do etanol para 10%, apenas 19,2 % das leveduras isoladas foram capazes de crescer (Figura 3).

O crescimento de leveduras em meio contendo altas concentrações de sacarose favorece a seleção de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* que possuem uma atividade invertásica bastante desenvolvida. Esta propriedade é

importante, uma vez que se presume que leveduras com atividade invertásica possuem uma maior capacidade fermentativa (Pataro et. al., 1998).

Segundo Pataro et. al., (2000) a maioria das espécies de leveduras isoladas de processos fermentativos artesanais, incluindo *Saccharomyces cerevisiae*, são fisiologicamente adaptadas às condições observadas nas dornas de fermentação. Elas são aptas a crescerem a 37°C, em meio contendo 50% de glicose e 8% de etanol.

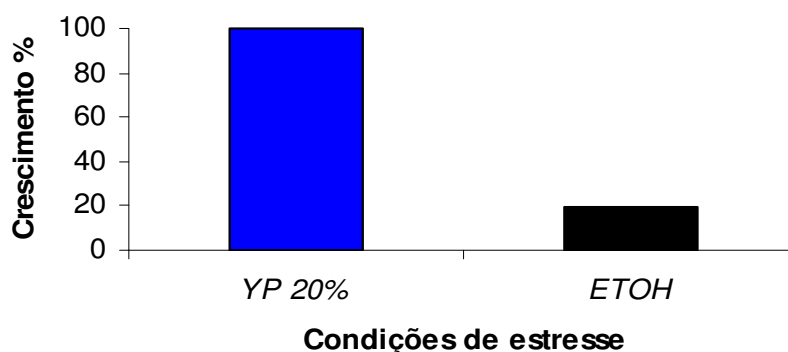


Figura 3 – Porcentagem de leveduras isoladas crescidas em condição de estresse.

NOTA:

**YPG 20%:** meio sólido *YP* + glicose 20 g% adicionado de 8% etanol, temperatura 35 °C, 72 horas

**ETOH:** meio sólido *YP* adicionado de etanol (10%), temperatura 35 °C, 72 horas.

### 3.2 – Caracterização parcial das leveduras isoladas e selecionadas

A caracterização parcial foi realizada apenas com as leveduras isoladas que apresentaram melhor crescimento no meio sólido *YP* adicionado de etanol (10%). Apesar de ter havido crescimento de 25 leveduras selecionadas, optou-se por fazer a caracterização das dez que apresentaram um crescimento destacado.

### 3.2.1 – Caracterização morfológica

Os resultados obtidos com as 10 leveduras selecionadas estão apresentados na Tabela 1. As colônias foram analisadas quanto à sua cor, ao aspecto, tamanho, brilho e desenho de suas bordas e na seqüência foram submetidas à análise de suas propriedades fisiológicas.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, foi observado que houve uma variação de tamanho entre as colônias de 1,0 mm a 5,0 mm, sendo as menores aquelas estirpes denominadas PS (13, 36, 43 e 46). Todas as colônias apresentaram uma cor branca, textura fosca e elevação convexa. Entretanto, as estirpes PS apresentaram uma borda lisa e as estirpes BZ a borda predominante foi rugosa.

Tabela 1 – Caracterização morfológica das leveduras selecionadas e avaliadas em meio sólido *YP*

Estirpes	Tamanho	Textura	Cor	Superfície	Borda	Elevação
PS 13	1,0-2,0 mm	fosca	branca	rugosa	lisa	convexa
PS 36	1,0-2,0 mm	fosca	branca	lisa	lisa	convexa
PS 43	1,0-2,0 mm	fosca	branca	lisa	lisa	convexa
PS 46	1,0-2,0 mm	fosca	branca	rugosa	lisa	convexa
BZ 11	2,0-3,0 mm	fosca	branca	rugosa	rugosa	convexa
BZ 31A	2,0-3,0 mm	fosca	branca	lisa	rugosa	convexa
BZ 32	1,5-3,0 mm	fosca	branca	lisa	rugosa	convexa
BZ 33	2,5-5,0 mm	fosca	branca	lisa	lisa	convexa
BZ 33A	1,5-2,5 mm	fosca	branca	rugosa	rugosa	convexa
BZ 34A	3,0-4,0 mm	fosca	branca	rugosa	rugosa	convexa

Nota:

BZ (destilaria 1, coleta realizada em novembro de 2007).

PS (destilaria 2, coleta realizada em maio de 2008).

### 3.2.2 – Caracterização bioquímica

As 10 leveduras selecionadas foram submetidas ao teste de crescimento em fontes de carbono e fermentação de carboidratos. A escolha das fontes de carbono foi feita considerando os substratos que permitissem a exclusão de um maior número de leveduras de outra espécie que não *Saccharomyces cerevisiae*. Como critério de exclusão as leveduras foram submetidas à pelo menos quatro fontes de carbono assimiladas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (glicose, sacarose, maltose e galactose) e uma fonte de carbono não assimilada (manitol ou lactose). Os resultados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Crescimento das leveduras selecionadas em meio de cultura contendo diferentes fontes de carbono na concentração de 2 g%

Fonte de carbono testada	S. <i>cerevisiae</i>	Leveduras isoladas									
		PS 13	PS 36	PS 43	PS 46	BZ 11	BZ 31A	BZ 32	BZ 33	BZ 33A	BZ 34A
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Manitol	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Lactose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Xilose	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-

NOTA:

BZ (destilaria 1, coleta realizada em novembro de 2007).

PS (destilaria 2, coleta realizada em maio de 2008).

+ (crescimento intenso na condição testada).

- (sem crescimento na condição testada).

S. *cerevisiae*: crescimento esperado para *Saccharomyces cerevisiae*.

Todas as colônias isoladas da destilaria BZ apresentaram resultados incompatíveis com a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, de acordo com a fonte de carbono estudada. Já as colônias isoladas da destilaria PS apresentaram resultados, que podem ser considerados compatíveis com a espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Entretanto, de acordo com os resultados do teste de fermentação de carboidratos mostrados na Tabela 3, apenas as colônias PS36, PS43 e BZ32, apresentaram características compatíveis com a espécie *Saccharomyces cerevisiae*. As demais apresentaram comportamentos distintos e provavelmente pertençam, também, a gêneros e/ou espécies diferentes. Para uma identificação mais precisa, uma nova pesquisa deverá ser executada com uma quantidade maior de fontes de carbono, ou utilizando técnicas de biologia molecular.

Diferenças na assimilação e na fermentação de compostos de carbono são critérios importantes na taxonomia e identificação de leveduras, pois estes microrganismos apresentam uma variação diversificada na habilidade de fermentação de açúcares. O carbono pode ser fornecido às leveduras na forma de açúcar, aldeídos, sais de alguns ácidos orgânicos, glicerina ou etanol, e ocasionalmente de alguma outra forma, dependendo do tipo da levedura. Ao considerar os açúcares como fonte de carbono, é importante lembrar a diferença que existe entre a capacidade de uma levedura em assimilar um açúcar e sua capacidade de fermentar o mesmo açúcar (Prescott, 1962).

Segundo estudos de Vaughan-Martini e Martini (1993), as características fisiológicas tradicionalmente consideradas importantes para separação de leveduras fermentativas do gênero *Saccharomyces*, não podem ser utilizadas para distinção entre espécies. Os testes de capacidade fermentativa separam apenas as leveduras do gênero *Saccharomyces* dos gêneros não *Saccharomyces*, não diferenciando espécies.

Tabela 3 – Capacidade fermentativa das leveduras selecionadas em meio de cultura líquido YP, contendo diferentes fontes de carbono na concentração de 2 g%

Fonte de açúcar testada	S. <i>cerevisiae</i>	Levedura isolada									
		PS 13	PS 36	PS 43	PS 46	BZ 11	BZ 31A	BZ 32	BZ 33	BZ 33A	BZ 34A
Galactose	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Sacarose	+	+	+	+	-	-	+W	+	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	-	+W	+	+	+	+
Lactose	-	+W	-	-	-	-	+W	-	-	-	-

NOTA:

BZ (destilaria 1, coleta realizada em novembro de 2007).

PS (destilaria 2, coleta realizada em maio de 2008).

(+) forte: completo preenchimento do tubo de Durhan com gás, no prazo de 1 a 3 dias.

(+w) fraca: preenchimento parcial de gás.

(-) negativa.

Nenhuma das colônias de leveduras avaliadas (n=10) cresceu em relação à assimilação de diferentes fontes de nitrogênio (nitrato de potássio, nitrito de sódio e lisina). Estes resultados estão de acordo com o esperado para a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, como descrito na Tabela 4.

Tabela 4 – Assimilação de fontes de nitrogênio pelas leveduras estudadas

Fonte de nitrogênio testada	S. <i>cerevisiae</i>	Levedura isolada									
		PS 13	PS 36	PS 43	PS 46	BZ 11	BZ 31A	BZ 32	BZ 33	BZ 33A	BZ 34A
Nitrato de potássio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

NOTA:

BZ (destilaria 1, coleta realizada em novembro de 2007).

PS (destilaria 2, coleta realizada em maio de 2008).

- (sem crescimento na condição testada).

S. *cerevisiae*: crescimento esperado para *Saccharomyces cerevisiae*.



Quando submetem as leveduras a crescimento em diferentes temperaturas e em meio sólido *YP*, observou-se que nenhuma das 10 colônias testadas cresceu a 45 °C. Entretanto, quando foram empregadas temperaturas de 25 °C e 37 °C foi observado crescimento de todas as cepas.

Guimarães (2005) ao isolar, identificar e selecionar cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinhos descreve que somente uma, das quinze cepas testadas, foi capaz de crescer à temperatura de 45 °C. Porém, na temperatura de 25 °C e 37 °C foi observado crescimento de todas as cepas.

A tolerância de leveduras à temperatura elevada vem sendo largamente estudada. Altas temperaturas podem ocorrer não só durante o processo de fermentação do caldo de cana-de-açúcar em unidades produtoras de cachaça, mas principalmente, durante o processo de produção de biomassa e secagem das leveduras, estágios requeridos para a preparação industrial de leveduras (Folch-Mallol et al., 2004).

Tabela 5 – Crescimento das leveduras selecionadas em diferentes temperaturas em meio sólido *YP*

Levedura isolada	Temperatura		
	25 °C	37 °C	45 °C
PS 13	+	+	-
PS 36	+	+	-
PS 43	+	+	-
PS 46	+	+	-
BZ 11	+	+	-
BZ 31A	+	+	-
BZ 32	+	+	-
BZ 33	+	+	-
BZ 33A	+	+	-
BZ 34A	+	+	-

NOTA:

BZ (destilaria 1, coleta realizada em novembro de 2007).

PS (destilaria 2, coleta realizada em maio de 2008).

+ crescimento intenso na condição testada.

- sem crescimento na condição testada.

## CONCLUSÕES

Das 130 colônias de leveduras isoladas a partir de fermentações espontâneas, apenas 25 (19,2%) cresceram em meio sólido *YP* adicionado de etanol (10%) e temperatura de 35 °C.

Os estudos não foram suficientes para afirmar que dentre as colônias isoladas, alguma tenha perfil bioquímico compatível com a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, e características apropriadas para atender às condições empregadas no processo artesanal de produção de cachaça.

## AGRADECIMENTOS

A FAPERJ, pelo Auxílio Pesquisa para a execução do projeto e bolsa do doutorando e aos produtores de cachaça Paulo Sérgio e Imivaldo (Bozó), pela colaboração com as coletas realizadas.

## REFERÊNCIAS

- Ceccato-Antonini, S.R., Silva, D.F. (2000) Eficiência de meios diferenciais no isolamento de cepas de leveduras de processos industriais de fermentação alcoólica. *STAB*, Piracicaba, 18 (4): 40-46.
- Folch-Mallol, J.L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., Robles, A.A.C. (2004) La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latino Americana de Microbiología*, 46 (1-2):24-46.
- Guimarães, T.M. (2005) *Isolamento, identificação e seleção de cepas de leveduras Saccharomyces cerevisiae para elaboração de vinho*. Tese (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Curitiba, PR. Universidade Federal do Paraná – UFP, 101p.
- Heard, G.M., Fleet, G.H. (1985) Growth of natural flora during the fermentation of inoculated wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 50:727-728.

- Pataro, C., Gomes, F.C.O., Araújo, R.A.C., Rosa, C.A., Schwan, R.F., Campos, C.R., Claret, A.S., Castro, H.A. (2002) Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique. *Informe Agropecuário*, EPAMIG, Belo Horizonte, 23 (217):37-43.
- Pataro, C., Guerra, J.B., Petrillo-Peixoto, M.L., Mendonca-Hagler, L.C., Linardi, V.R., Rosa, C.A. (2000) Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 89:24-31.
- Pataro, C., Santos, A., Correa, S.R., Marais, P.B., Linardi, V.R., Rosa, C.A. (1998) Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in an aguardente distillery. *Review Microbiology*, Oxford, 29:104-108.
- Prescott, S.C. (1962) *Microbiologia industrial*. 3. ed. Madrid: Aguilar, S.A. Ediciones.
- Querol, A., Fernández-Espinar, M.T., Olmo, M., Barrio, E. (2003) Adaptive evolution of wine yeast. *International Journal of Food Microbiology*, 86:3-10.
- Ribeiro, J.C.G.M. (2002) *Fabricação Artesanal de Cachaça Mineira*. 2 ed. Belo Horizonte: O Lutador, 223 p.
- Schwan, R.F., Carvalho, F.P., Dias, D.R., Castro, H.A. (2006) Fermentação. In: Cardoso, M.G. (ed.) *Produção de aguardente de cana*. 2° ed. Editora UFLA – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, p. 101-135.
- Schwan, R.F., Castro, H.A. (2001) Fermentação alcoólica. In: Cardoso, M.G. (Ed.) *Produção de cachaça de cana-de-açúcar*. Lavras: UFLA, p. 45-57.
- Vaughan-Martini, A., Martini, A. (1993) A taxonomic key the genus *Saccharomyces*. *Systematic and Applied Microbiology*, 16:113-119.

#### 4. RESUMOS E CONCLUSÕES

Este estudo foi dividido em quatro ensaios. No primeiro, fez-se a quantificação dos compostos orgânicos etanol, metanol, 1-propanol, 1-butanol, iso-butanol, iso-amílico, acetato de etila, acetaldeído, ácido acético, furfural, 5-hidroxiacetilfurfural e acroleína. No segundo, analisaram os elementos cobre, zinco, ferro, sódio e potássio. Ambos experimentos foram realizados utilizando trinta amostras pertencentes a dezesseis produtores de cachaças associados da Cooperativa dos Produtores de Cachaça e Derivados da Cana-de-Açúcar do Norte Fluminense – COOPCANF e avaliaram os resultados conforme os padrões de identidade e qualidade estabelecidos pela legislação vigente.

Observou-se no primeiro ensaio que o grau alcoólico real e a soma dos compostos 5-hidroxiacetilfurfural e furfural, foram os parâmetros com maiores índices de irregularidades apresentados pelas amostras, em seguida, encontra-se o ácido acético. Os alcoóis superiores (soma dos alcoóis iso-butílico, iso-amílicos e propílico), o ácido acético e o acetato de etila foram os componentes que apresentaram os maiores desvios padrão, refletindo as dificuldades enfrentadas pelos produtores em garantir a qualidade e a padronização da bebida em todas as etapas da produção. O alto índice de amostras (63,3%) que revelaram não conformidade com a legislação<sup>5</sup> em pelo menos um dos componentes analisados compromete as exportações e dificulta o crescimento do mercado interno da cachaça.

Das amostras analisadas, no segundo ensaio, 46,7% apresentavam teores de cobre acima do limite máximo permitido pela legislação. A presença dos minerais zinco, ferro, sódio e potássio, detectados em algumas amostras indicam

contaminações durante e, ou após a destilação da cachaça. Estes dados indicam que os produtores desta região necessitam de assistência técnica para melhorar a tecnologia para produção de suas cachaças.

Em um terceiro ensaio, com a finalidade de conhecer a composição química do destilado durante a destilação do vinho da cana-de-açúcar, foram quantificados diversos compostos em diferentes frações do destilado coletadas ao longo de 160 minutos de destilação. As conclusões deste ensaio são:

Definindo criteriosamente os pontos de corte dos destilados de “cabeça”, “coração” e “cauda”, o produtor ajusta a proporção dos componentes secundários da cachaça.

Os compostos acetaldeído, acetato de etila, 1-propanol e 1-butanol são mais elevados nos primeiros momentos da destilação, podendo ser considerados componentes secundários da cachaça, predominantemente, da fração “cabeça”.

Os teores de metanol encontram-se distribuídos de forma homogênea ao longo de toda destilação. Observa-se que ocorre uma redução dos teores de etanol, iso-butanol e iso-amílico (2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol), com teores menores nas últimas amostras coletadas ou fração “cauda” e os mais elevados nas primeiras coletas, ou “coração”.

Observou-se um incremento nos teores de 1-hexanol e ácido acético, com concentrações mais elevadas na fase final da destilação ou fração “cauda”. Também, detectou-se uma correlação positiva entre o ácido acético e cobre, nos destilados do alambique três.

Foi detectado cobre, zinco e ferro em todas as frações estudadas. O teor de cobre, com teores bem superiores aos demais nas amostras coletadas no alambique três.

Aumentando o tempo de corte da fração “cabeça e diminuindo o da fração “cauda”, diminui-se o volume da fração “coração”, mas, também, reduz os teores de basicamente todos os componentes estudados, exceto o metanol, zinco e ferro.

No quarto ensaio, um estudo foi realizado com o objetivo de isolar leveduras nativas em mosto de fermentação de dois alambiques, a fim de selecionar aquelas com propriedades apropriadas para a produção de cachaça. Neste estudo, isolou-se 130 colônias de leveduras a partir de fermentações espontâneas, onde, apenas 25 (19,2%) cresceram em meio sólido *YP* adicionado

de etanol (10%) e temperatura de 35 °C. Os resultados deste ensaio, não foram suficientes pra afirmar que dentre as colônias isoladas, alguma tenha perfil bioquímico compatível com a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, e características apropriadas para atender às condições empregadas no processo artesanal de produção de cachaça.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRABE, Associação Brasileira de Bebidas. *A cachaça*. Disponível em: <<http://www.abrabe.org.br/cachaca.php>>. Acesso em 18 julho de 2008.
- Alves, D.M.G. (1994) *Fatores que afetam a produção de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica*. Tese (Mestrado em Microbiologia) – Piracicaba, SP. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo – ESALQUE, 128p.
- Andrade, L.A.B. (2006) Cultura da cana-de-açúcar. In: Cardoso, M.G. (ed.) *Produção de aguardente de cana*. 2º ed. Editora UFLA – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, p. 25-67.
- Aquino, F.W.B., Nascimento, R.F., Rodrigues, S., Casemiro, A.R.S. (2006) Determinação de marcadores de envelhecimento em cachaças. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, Campinas – SP, 26 (1):145-149.
- Azevedo, A.M., Cardoso, M.G., Pereira, N.E., Ribeiro, C.F.S., Silva, V.F., Aguiar, F.C. (2003) Levantamento da contaminação por cobre nas aguardentes de cana-de-açúcar produzidas em minas gerais. *Ciências Agrotecnológicas*, Lavras – MG, 27 (3):618-624.
- Azevêdo, L.C., Reis, M.M., Silva, L.A., Andrade, J.B. (2007) Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. *Química Nova*, São Paulo, 30 (8):1968-1975.

- Barbosa-Filho, J.M., Pamplona, F.V., Rabelo, L.A., Lemos, V.S., Piuvesam, M.R., Souza, M.F.V., Cunha, E.V.L., Silva, M.S., Macedo, R.O. (2000) Uma revisão sobre a ocorrência de sacarose no reino vegetal. *Farmácia e Química*, 33 (2/3):6-22.
- Barcelos, L.V.F., Cardoso, M.G.C., Vilela, F.J., Anjos, J.P. (2007) Teores de carbamato de etila e outros componentes secundários em diferentes cachaças produzidas em três regiões do Estado de Minas Gerais: Zona da Mata, Sul de Minas e Vale do Jequitinhonha. *Química Nova*, 30 (4):1009-1011.
- Berry, D.R. Alcoholic beverage fermentation. (1995) In: Lea, A.G.H., Piggott, J.R. *Fermented Beverage Production*. 1° ed. London: Blackie academic and professional, Cap 2, p.32-44.
- Bogusz Junior, S., Ketzer, D.C.M., Gubert, R., Andrades, L., Gobo, A.B. (2006) Composição química da cachaça produzida na região Noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, Campinas – SP, 26 (4):793-798.
- Botelho, M.S. (2006) Aspectos legais para a produção de cachaça no âmbito de competência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. In: Cardoso, M.G. (ed.) *Produção de aguardente de cana*. 2° ed. Editora UFLA – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, p. 271-100.
- Boza, Y., Horii, J. (1998) Influência da destilação sobre a composição e a qualidade sensorial da aguardente de cana-de-açúcar. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, 18 (4):354-361.
- Boza, Y., Horii, J. (2000) Influência do grau alcoólico e da acidez do destilado sobre o teor de cobre na aguardente de cana. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da Universidade Federal do Paraná (B.CEPPA)*, Curitiba – PR, 18 (1):85-94.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria N° 371, de 18 de setembro de 1974. *Diário Oficial da União*, Brasília, 19 de setembro de 1974.



- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 13, de 29 de junho de 2005. *Diário Oficial da União. Brasília*, 30 de junho de 2005.
- BRASIL. (2005) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária – Laboratório Nacional de Referência Vegetal. *Metodologias de análises de bebidas e vinagres*. <http://www.agricultura.gov.br> em 14/07/2005. Página mantida pelo MAPA.
- BRASIL, (2008) *Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior*. [http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/consulta\\_nova/resultadoConsulta.asp](http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/consulta_nova/resultadoConsulta.asp). em 18/07/08. Página mantida pelo Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior.
- Cambell, M.K. *Bioquímica*. 3° ed. Porto Alegre: Artmed, 725p.
- Cardoso, M.G. Análises físico-químicas de aguardente. In: Cardoso, M.G. (ed.) *Produção de aguardente de cana*. 2° ed. Editora UFLA – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, p. 203-232.
- Cardoso, M.G., Campos, G.A., Silva, R.A., Santos, C.D., Pinto, A.P.S., Silva, C.F. (2005) *Cachaça: qualidade e produção*. Boletim Extensão, publicado pela PROEX/UFLA. <http://www.editora.ufla.br> em 12/07/05. Página mantida pela PROEX/UFLA.
- Cavalheiro, S.F.L., Sobrinho, L.G.A., Faria, J.B., Cardello, H.M.A. (2003) Influência do envelhecimento no teor de cobre em cachaças. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da Universidade Federal do Paraná (B.CEPPA)*, Curitiba – PR, 21 (1):99-108.
- Ceccato-Antonini, S.R., Silva, D.F. (2000) Eficiência de meios diferenciais no isolamento de cepas de leveduras de processos industriais de fermentação alcoólica. *STAB*, Piracicaba, 18 (4): 40-46.

- Cherubin, R.A. (1998) *Efeito da adição de benzoto de sódio na fermentação alcoólica para a produção de aguardente de cana-de-açúcar (Saccharum spp)*. Tese (Mestrado em Ciências e Tecnologias de Alimentos) – Piracicaba, SP. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo – ESALQUE, 70p.
- Cleto, F.V.G. (1997) *Influência do ácido sulfúrico e do fubá de milho sobre a microbiota do processo fermentativo, rendimento e qualidade da aguardente de cana*. (Tese Mestrado em Agronomia) – Jaboticabal, SP. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – UNESP, 109p.
- Crispim, J.E. (2000) *Manual da produção de aguardente de qualidade*. Guaíba – RS; Editora Agropecuária LTDA, 333 p.
- Crowell, E. A. (1961) Techniques for studying the mechanism of higher alcohol formation by yeasts. *American Journal Ecology and Viticulture*, Washington, 12:111-116.
- Cunha, A.F. (2004) *Construção de flocculantes condicionais de Saccharomyces cerevisiae para aplicações industriais*. Tese (Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica) – Campinas, SP. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 97p.
- Dias, D.R. (2001) *Elaboração de bebida fermentada a partir de frutas tropicais*. Tese (Mestre em Ciência dos Alimentos) – Lavras, MG. Universidade Federal de Lavras – UFLA, 130p.
- Dias, S.M.B.C. (2006) O processo da destilação. In: Cardoso, M.G. (ed.) *Produção de aguardente de cana*. 2° ed. Editora UFLA – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, p. 137-202.
- Etanislau, M.L.L., Cançado, J.R.F.L., Paiva, B.M. (2002) Mercado atual e potencial da cachaça. *Informe Agropecuário*, EPAMIG, 23 (217):19-24.

- Folch-Mallol, J.L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., Robles, A.A.C. (2004) La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latino Americana de Microbiología*, 46 (1-2):24-46.
- Garbin, R., Bogusz Junior, S., Montano, M.A. (2005) Níveis de cobre em amostras de cachaça produzidas na região noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, 35 (6):1436-1440.
- Gomes, J.C. (2003) *Análise de alimentos*. Viçosa: UFV, DTA:FUNARBE, 2003 – (2 ed. Ver. Ampl. por Herinque Louzada Silva e Cassiano Oliveira Silva).
- Guimarães, T.M. (2005) *Isolamento, identificação e seleção de cepas de leveduras Saccharomyces cerevisiae para elaboração de vinho*. Tese (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Curitiba, PR. Universidade Federal do Paraná – UFP, 101p.
- Gutierrez, L.E. (1993) Produção de alcoóis superiores por linhagens de *Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica. *Scientia Agrícola*, Piracicaba – SP, 50 (3):464-472.
- Heard, G.M., Fleet, G.H. (1985) Growth of natural flora during the fermentation of inoculated wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 50:727-728.
- Jeronimo, E.M. (2004) *O nitrogênio protéico na fermentação alcoólica e sua influência na qualidade da cachaça*. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Campinas, SP. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas – FEA/UNICAMP, 119 p.
- Labanca, R.A., Glória, M.B.A., Gouveia, V.J.P., Afonso, R.J.C. (2006) Determinação dos teores de cobre e grau alcoólico em aguardentes de cana produzidas no Estado de Minas Gerais. *Química Nova*, 29 (5):1110-1113.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. (2000) *Princípios de bioquímica*. Tradução de Arnaldo Antonio Simões e Wilson Roberto Navega Lodi. São Paulo - Brasil: reimpresão, 839p.

- Lima, U.A. (2001) Aguardente. In: Aquarone, E. Lima, U.A., Borzani, W. (Eds.). *Alimentos e bebidas produzidos por fermentação*. São Paulo – SP, Editora Edgard Blücher, p.79-107, (Série Biotecnologia Industrial).
- Lima, A.J.B., Cardoso, M.G.C., Querreiro, M.C., Pimentel, F.A. (2006) Emprego do carvão ativado pra remoção do cobre em cachaça. *Química Nova*, 29 (2):p. 247-250.
- Lima, A.K.S., Nóbrega, I.C.C. (2004) Avaliação de parâmetros de qualidade em aguardente de cana produzidas no Estado da Paraíba. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da Universidade Federal do Paraná (B.CEPPA)*, Curitiba – PR, 22 (1):85-96.
- Maia, A.B.R. (1994) Componentes secundários da aguardente. *STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos*, Piracicaba, 12 (6):29-34.
- Maia, A.B.R.A. (2002) Equipamentos para a produção de cachaça. *Informe Agropecuário, EPAMIG*, 23 (217):63-66.
- Maia, A.B.R.A., Campelo, E.A.P. (2006) *Tecnologia da cachaça de alambique*. SEBRAE/MG; SINDBEBIDAS – Belo Horizonte – MG, 129 P.:il.
- Malta, H.L. (2006) *Estudos de parâmetros de propagação de fermento (Saccharomyces cerevisiae) para produção de cachaça de alambique*. Tese (Mestre em Ciências de Alimentos) – Belo Horizonte, MG. Faculdade de Farmácia na Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, 70p.
- MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2008) *O setor produtivo da cachaça*. <http://www.agricultura.gov.br> em 18/07/08. Página mantida pelo MAPA.
- Masson, J., Cardoso, M.G., Vilela, F.J., Pimentel, F.A., Moraes, A.R., Anjos, J.P. (2007) Parâmetros físico-químicos e cromatográficos em aguardentes de cana queimada e não queimada. *Ciências Agrotecnológicas*, Lavras – MG, 31 (6):1805-1810.

- Matienzo, P.A. (2002) *Re-identificação e caracterização genética da levedura IZ-987 utilizando marcadores moleculares*. Tese (Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Piracicaba, SP. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ, 81p.
- Miranda, M.B., Horii, J., Alcarde, A.R. (2006) Estudo do efeito da irradiação gamma ( $^{60}\text{CO}$ ) na qualidade da cachaça e no tonel de envelhecimento. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, Campinas – SP, 26 (4):772-778.
- Miranda, M.B., Martins, N.G.S., Belluco, A.E.S., Horii, J., Alcarde, A.R. (2007) Qualidade química de cachaças e de aguardentes brasileiras. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, Campinas – SP, 27 (4):897-901.
- Miskiewicz, T. Kasperski, A. (2000) A fuzzy logic controller to control nutrient dosage in a fed-batch baker's yeast process. *Biotechnology letters*, 22:1685-1691.
- Mutton, M.A., Mutton, M.J. (2005) Aguardente In: Filho, W.G.V. (Coord.). *Tecnologia de Bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado*. Ed. Edgard Blucher, São Paulo, p. 485-524.
- Nascimento, R.F., Bezerra, C.W.B., Furuya, S.M.B., Schultz, M.S., Polastro, L.R., Lima Neto, B.S., Franco, D.W. (1999) Mineral profile of brazilian cachaças and other international spirits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 12:17-25.
- Nascimento, R.F., Cardoso, D.R., Lima Neto, B.S., Franco, D.W. (1998) Influência do material do alambique na composição química das aguardentes de cana-de-açúcar. *Química Nova*, 21 (6):737-739.
- Nascimento, R.F., Marques, J.C., Lima Neto, B.S., Keukeleire, D.D., Franco, D.W. (1997) Qualitative and quantitative high-performance liquid chromatographic analysis of aldehydes in Brazilian sugar cane spirits and other distilled alcoholic beverages. *Journal of Chromatographya*, 782:13-23.

- Oliveira, C.R., Garíglío, H.A.A., Ribeiro, M.M., Alvarenga, M.S.P., Maia, F.X. (2005) *Cachaça de alambique: manual de boas práticas ambientais e de produção*. Convênio de cooperação técnica SEAPA/SEMAD/AMPAQ/FEAM/IMA, 72 P.:il.
- Oliveira, E.S. (2001) *Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais*. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) – Campinas, SP. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 149p.
- Ostergaard, S.; Olsson, L.; Nielsen, J. (2000) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64:34-50.
- Parazzi, C., Arthur, C. M., Lopes, J.J.C., Borges, M.T.M.R. (2008) Avaliação e caracterização dos principais compostos químicos da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de carvalho (*Quercus* sp.). *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, Campinas – SP, 28 (1):193-199.
- Pataro, C., Gomes, F.C.O., Araújo, R.A.C., Rosa, C.A., Schwan, R.F., Campos, C.R., Claret, A.S., Castro, H.A. (2002) Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique. *Informe Agropecuário*, EPAMIG, Belo Horizonte, 23 (217):37-43.
- Pataro, C., Guerra, J.B., Gomes, F.C.O., Neves, M.J., Pimentel, P.F., Rosa, C.A. (2002a) Trehalose accumulation, invertase activity and physiological characteristics of yeasts isolated from 24 h fermentative cycles during the production of artisanal. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33:202-208.
- Pataro, C., Guerra, J.B., Petrillo-Peixoto, M.L., Mendonça-Hagler, L.C., Linardi, V.R., Rosa, C.A. (2000) Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 89:24-31.

- Pataro, C., Santos, A., Correa, S.R., Marais, P.B., Linardi, V.R., Rosa, C.A. (1998) Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in an aguardente distillery. *Review Microbiology*, Oxford, 29:104-108.
- Pereira, N.E., Cardoso, M.G., Azevedo, S.M., Morais, A.R., Fernandes, W., Aguiar, P.M. (2003) Compostos secundários em cachaças produzidas no Estado de Minas Gerais. *Ciências Agrotecnológicas*, Lavras, 27 (5):1068-1075.
- Pintado, A.I.E., Costa, M.L.S., Castro, T.M.C.A.S., Trigueiros, J.B.L., Malcata, F.X. (2008) *Bagaceira de Vinho Verde Branco: caracterização do processo tradicional de produção e melhoramento tecnológico*. Boletim publicado pela Universidade Católica Portuguesa e editada pelos serviços de edição da Escola Superior de Biotecnologia, 52 p.
- Prescott, S.C. (1962) *Microbiologia industrial*. 3. ed. Madrid: Aguilar, S.A. Ediciones.
- Querol, A., Fernández-Espinar, M.T., Olmo, M., Barrio, E. (2003) Adaptive evolution of wine yeast. *International Journal of Food Microbiology*, 86:3-10.
- Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E. (2001) *Biologia Vegetal*, sexta edição, editora Guanabara Koogan, 906 p.
- Ribeiro, J.C.G.M. (2002) *Fabricação Artesanal de Cachaça Mineira*. 2 ed. Belo Horizonte: O Lutador, 223 p.
- Saczk, A.A., Okumura, L.L., Oliveira, M.F., Zanoni, M.V.B., Stradiotto, N.R. (2005) Rapid and sensitive method for the determination of acetaldehyde in fuel ethanol by high-performance liquid chromatography with UV-Vis detection. *Analytical and Bionalytical Chemistry*, 381 (8):1619-1624.
- SAEG 9.0. (2005) *Sistema para Análises Estatísticas-SAEG*. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes, Cd ROM, Versão 9.0.
- Sargentelli, V., Mauro, A.E., Massabni, A.C. (1996) Aspectos do metabolismo do cobre no homem. *Química Nova*, São Paulo, 19 (3):290-293.

- Schwan, R.F., Carvalho, F.P., Dias, D.R., Castro, H.A. (2006) Fermentação. In: Cardoso, M.G. (ed.) *Produção de aguardente de cana*. 2º ed. Editora UFLA – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, p. 101-135.
- Schwan, R.F., Castro, H.A. (2001) Fermentação alcoólica. In: Cardoso, M.G. (Ed.) *Produção de cachaça de cana-de-açúcar*. Lavras: UFLA, p. 45-57.
- SEBRAE, Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas no Espírito Santo. (2001) *Recomendações de controle ambiental para produção de cachaça*. In Filho, H. B., et al. (Eds), Vitória: SEBRAE/ES, 46p.
- SEBRAE, Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. (2001a) *Diagnóstico da cachaça de Minas Gerais*. Belo Horizonte, 241p.
- SEBRAE, Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (2004). *Cachaça: um negócio brasileiro*. São Paulo – SP, 1ª Ed, 66p.
- Silveira, L.C., Barbosa, M.H.P., Oliveira, M.W. (2002) Manejo de variedades de cana-de-açúcar predominantes nas principais regiões produtoras de cachaça em Minas Gerais. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte – MG, 23 (217):25-32.
- Stehlik-Tomas, V., Zetic, V. G., Stanzer, D., Grba, S., Vahcic, N.. (2004) Zinc, cooper and manganese enrichment in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technology Biotechnology*, 42 (2):115-120.
- Stupiello, J.P.; Horii, J. (1981) Condução da fermentação alcoólica. *Saccharum*, 4 (17):43-46.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. (2000) *Microbiologia*. 6º ed. Porto Alegre: Artmed, 827 p.
- Vaughan-Martini, A., Martini, A. (1993) A taxonomic key the genus *Saccharomyces*. *Systematic and Applied Microbiology*, 16:113-119.



- Veiga, J.F. (2006) Equipamentos para produção e controle de operação da fábrica de cachaça. In: Cardoso, M.G. (ed.) *Produção de aguardente de cana*. 2° ed. Editora UFLA – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, p. 68-100.
- Vilela, F.J., Cardoso, M.G., Masson, J., Anjos, J.P. (2007) Determinação das composições físico-químicas de cachaças do Sul de Minas Gerais e de suas misturas. *Ciências Agrotecnológicas*, Lavras – MG, 31 (4):1089-1094.
- Yokoya, F. (1995) *Fabricação de aguardente de cana*. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 87 p. (Série Fermentações Industriais).