Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Qualidade pós-colheita de colmos de cana armazenados e seus reflexos na produção de cachaça

José Humberto de Oliveira Filho

Tese apresentada para obtenção do título de doutor em Ciências: Área de concentração: Ciência e Tecnologia de alimentos

Piracicaba
2015

José Humberto de Oliveira Filho
Engenheiro de Alimentos

Qualidade pós-colheita de colmos de cana armazenados e seus reflexos na produção de cachaça

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ANDRÉ RICARDO ALCARDE**

Tese apresentada para obtenção do título de doutor em Ciências: Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Oliveira Filho, José Humberto de
Qualidade pós-colheita de colmos de cana armazenados e seus reflexos na produção de cachaça / José Humberto de Oliveira Filho. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.
101 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Matéria-prima 2. Armazenamento 3. Processo fermentativo 4. Composição química I. Título

CDD 663.53
O48q

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

DEDICATÓRIA

A minha maravilhosa esposa e aos meus amados filhos.

Pelos sentimentos de amor verdadeiro.

Pelo incondicional apoio e companheirismo.

Pelos momentos de infinita alegria que sempre me proporcionam.

Aos meus queridos pais.

Pelo intenso amor e carinho.

Pelos incentivos e ensinamentos transmitidos durante minha caminhada.

Por me proporcionarem uma vida repleta de felicidades.

Aos meus irmãos Carol e Gustavo, meu cunhado Widson e minha cunhada Lóren.

Pelo carinho, amor e amizade.

Pela união e apoio em todos os momentos de minha vida.

A minha maravilhosa e querida afilhada Brunna.

Pelos momentos de muito carinho.

Pela oportunidade de tê-la como uma filha em meu coração.

Aos meus queridos avós.

Pelo infinito amor e carinho.

Pelas sabedorias e ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

- A Deus por me conceder saúde e uma vida repleta de felicidades e pessoas maravilhosas;
- A Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) pela oportunidade de realizar o Doutorado;
- Ao professor Dr. André Ricardo Alcarde, pela amizade e compreensão, principalmente nos momentos de maiores dificuldades;
- A Aline Bortoletto pelo auxílio durante a realização desta pesquisa;
- Aos servidores Fábio e Ana da Secretaria de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelas colaborações e auxílios durante a realização do doutorado;
- Aos professores Dra. Marcia Justino Rossini Mutton, Dr. Leonardo Lucas Madaleno, Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini e Dr. André Eduardo de Souza Belluco pelas contribuições durante o exame de qualificação e correção da Tese;
- Ao Instituto Federal do Triângulo Mineiro (IFTM), campus Uberaba, pelas oportunidades de realização desta pesquisa;
- Aos amigos do IFTM, pela amizade e contribuições: Prof. Paulo Campagnol, Prof^{a}. Elisa, Cíntia, Luciene, Sr. Pedro, Silvério, Ana Laura, Edson e Sandra;
- A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO 9
ABSTRACT 11
LISTA DE FIGURAS 13
LISTA DE TABELAS 17
1 INTRODUÇÃO 19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 21
2.1 Cachaça 21
2.1.1 Regulamentação da cachaça 21
2.1.2 Mercado 22
2.2 Cana-de-açúcar 24
2.2.1 Biossíntese da sacarose 24
2.2.2 Qualidade da matéria-prima armazenada 25
2.2.2.1 Micro-organismos contaminantes 26
2.2.2.2 Atividade enzimática 27
2.3 Fermentação alcoólica 28
2.3.1 Bioquímica da fermentação alcoólica 28
2.3.2 Microbiologia dos processos fermentativos 28
2.3.2.1 Bactérias láticas 29
2.3.2.2 Leveduras 30
2.4 Composição química da cachaça 32
2.4.1 Compostos secundários 32
2.4.1.1 Álcoois superiores 32
2.4.1.2 Ésteres 33
2.4.1.3 Aldeídos 34
2.4.1.4 Furfural e hidroximetilfurfural 34
2.4.1.5 Ácidos orgânicos 35
2.4.2 Contaminantes 35
2.4.2.1 Metanol 35
2.4.2.2 Cobre 35
2.4.2.3 Carbamato de etila 36
3 MATERIAL E MÉTODOS 39
3.1 Instalação e condução do experimento 39
3.2 Armazenamento dos colmos de cana e extração do caldo 39

3.2.1 Avaliações das características tecnológicas do caldo 40
3.2.2 Avaliações das características microbiológicas do caldo e do fermento 40
3.3 Preparo do mosto e condução do processo fermentativo 41
3.3.1 Análises microbiológicas do vinho 42
3.3.2 Análises tecnológicas do vinho 43
3.4 Destilação do vinho 43
3.4.1 Cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas (GC-FID) 44
3.4.2 Cromatografia gasosa acoplada a um espectrofotômetro de massa (GC-MS) 44
3.4.3 Teor de cobre na cachaça 45
3.5 Análise estatística 45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 47
4.1 Qualidade dos colmos de cana colhidos e armazenados 47
4.1.1 Características do ambiente de armazenamento da cana 47
4.1.2 Avaliações tecnológicas do caldo 48
4.1.3 Avaliações microbiológicas do caldo 56
4.2 Monitoramento do processo fermentativo 61
4.2.1 Características microbiológicas da fermentação alcoólica 61
4.2.2 Características microbiológicas do fermento 66
4.2.3 Avaliações tecnológicas do vinho 72
4.3 Compostos químicos da cachaça 76
4.3.1 Compostos secundários 76
4.3.2 Contaminantes 83
5 CONCLUSÕES 85
REFERÊNCIAS 87
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA 101

RESUMO

Qualidade pós-colheita de colmos de cana armazenados e seus reflexos na produção de cachaça

O armazenamento dos colmos de cana pode comprometer a manutenção do seu estado fisiológico, refletindo em consideráveis alterações na qualidade do caldo. Esta pesquisa teve como objetivos, avaliar as características tecnológicas e microbiológicas do caldo de cana colhida e armazenada, assim como seus reflexos na condução dos processos fermentativos e formação dos compostos químicos da cachaça. Após colheita da cana-de-açúcar, os colmos foram armazenados a temperatura ambiente (20 – 32°C) por períodos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas, sendo o mosto preparado após extração do caldo. As fermentações foram conduzidas em processo batelada com reciclo de células, durante cinco ciclos fermentativos. O monitoramento da fermentação foi realizado através da quantificação de micro-organismos em atividade no processo e no fermento reciclado. Ao término das fermentações, foram analisadas as características tecnológicas dos vinhos, os quais foram destilados em alambique de cobre para quantificação dos compostos secundários (ácido acético, aldeído, álcoois superiores, ésteres e furfural) e contaminantes (álcool metílico, cobre e carbamato de etila) da cachaça. O armazenamento dos colmos de cana por períodos superiores a 48 horas causou significantes perdas na qualidade do caldo, reduzindo o conteúdo de sacarose, pureza e açúcares redutores totais, aumentando os níveis de acidez total, açúcares redutores e bactérias láticas. Os colmos de cana armazenados por 72 e 96 horas, afetou a condução do processo fermentativo, ocasionando decréscimo na viabilidade de células e brotos de leveduras, e elevação nas concentrações de bactérias láticas e leveduras não-*Saccharomyces* no fermento reciclado. As características tecnológicas dos vinhos também foram comprometidas com a utilização de colmos armazenados. Os níveis de acidez volátil, acetato de etila, acetaldeído, álcool metílico, cobre e carbamato de etila das cachaças apresentaram-se dentro do estabelecido pela Legislação Brasileira, enquanto o conteúdo de álcoois superiores e furfural foram superiores em destilados de cana colhida e armazenada. As concentrações de acetato de etila e carbamato de etila permaneceram elevadas ao final do 5º ciclo para destilados de colmos armazenados por períodos superiores a 48 horas, porém não excederam os limites especificados na Legislação.

Palavras-chave: Matéria-prima;Armazenamento;Processo fermentativo;Composição química

ABSTRACT

Quality of post-harvest stored cane stalks and its effects on the production of cachaça

The cane stalks storage can compromise the maintenance of their physiological state, resulting in considerable changes in the quality of the juice. This research aimed to evaluate the sugarcane juice technological and microbiological characteristics when harvested and stored, as well its reflexes in the cachaça fermentative processes and secondary compounds guiding processes. After harvested, the sugarcane stalks were stored at environmental temperature (20 – 32°C) at 0, 24, 48, 72, and 96 hours, preparing the must just before the juice extraction. Fermentations were carried out through the batch process, using five fermentative cycles. Monitoring the fermentation was carried out by quantifying microorganisms active in the process and recycled yeast. At the end of fermentation, the technological characteristics of the wines were analyzed, which was distilled in copper still for quantification of secondary compounds (acetic acid, aldehyde, higher alcohols, esters and furfural) and contaminants (methyl alcohol, copper and ethyl carbamate) of cachaça. The cane stalks storage for periods exceeding 48 hours caused significant losses in the juice technological quality, reducing the sucrose content, purity and total reducing sugars, increasing the acidity levels, reducing sugars and lactic acid bacteria. The cane stalks stored for 72 and 96 hours, influencing negatively the fermentative process; presenting decreasing in the viability of the yeast cells and shoots, as well an elevation in the lactic bacteria and non-*Saccharomyces* yeasts concentration in the recycled yeast. The technical characteristics of the wines were also compromised with the use of stalks stored. The volatile acidity levels, ethyl acetate, acetaldehyde, methanol, copper, and ethyl carbamate in the cachaças were within the ones established by the Brazilian law, while the superior alcohols and furfural content were high in the sugarcane distillated after harvested and stored. The concentrations of ethyl acetate and ethyl carbamate remained high at the end of the 5th cycle to cane spirits stored for longer than 48 hours, but did not exceed the limits specified in legislation.

Keywords: Raw material; Storage;Fermentative process; Chemical composition

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mercado nacional de bebidas 23
Figura 2 - Principais países importadores de cachaça 23
Figura 3 - Mecanismo de utilização da sacarose dentro das células do colmo de cana 24
Figura 4 - Moenda utilizada para extração do caldo de cana 40
Figura 5 - Dornas de aço inoxidável utilizadas para fermentação do mosto 42
Figura 6 - Destilador de cobre utilizado para destilação do vinho 43
Figura 7 - Colmos de cana armazenados 47
Figura 8 - Concentração de sólidos solúveis totais em caldo de cana colhida e armazenada .. 49
Figura 9 - Porcentagem aparente de sacarose em caldo de cana colhida e armazenada 50
Figura 10 - Porcentagem de Pureza para caldo de cana colhida e armazenada 51
Figura 11 - Valores médios de pH para caldo de cana colhida e armazenada 51
Figura 12 - Desdobramento da interação entre tratamentos e ciclos para a porcentagem aparente de sacarose do caldo ao longo dos ciclos fermentativos 52
Figura 13 - Desdobramento da interação entre tratamentos e ciclos para a porcentagem de Pureza do caldo ao longo dos ciclos fermentativos 52
Figura 14 - Níveis de acidez total ($gH_2SO_4.L^{-1}$) em caldo de cana colhida e armazenada..... 54
Figura 15 - Porcentagem de açúcares redutores em caldo de cana colhida e armazenada 55
Figura 16 - Porcentagem de açúcares redutores totais em caldo de cana colhida e armazenada 56
Figura 17 - Contagem padrão de micro-organismos totais ($UFC.mL^{-1}$) em caldo de cana colhida e armazenada 58
Figura 18 - Bactérias láticas ($UFC.mL^{-1}$) em caldo de cana colhida e armazenada 59
Figura 19 - Leveduras totais ($UFC.mL^{-1}$) em caldo de cana colhida e armazenada 60
Figura 20 - Leveduras não-*Saccharomyces* ($UFC.mL^{-1}$) em caldo de cana colhida e armazenada 60
Figura 21 - Leveduras não-*Saccharomyces* e não-*Saccharomyces cerevisiae* ($UFC.mL^{-1}$) em caldo de cana colhida e armazenada 61
Figura 22 - Valores médios de viabilidade celular de leveduras (%) em fermentações conduzidas com caldo de cana colhida e armazenada 63
Figura 23 - Valores médios de viabilidade de brotos (%) em fermentações conduzidas com caldo de cana colhida e armazenada 64

Figura 24 - Desdobramento da interação entre tratamentos e ciclos para viabilidade celular de brotos no inicio do processo fermentativo 65
Figura 25 - Valores médios de índice de brotamento (%) em fermentações conduzidas com caldo de cana colhida e armazenada 66
Figura 26 - Contagem padrão de micro-organismos totais (UFC.mL^{-1}) reciclados no fermento para tratamentos 68
Figura 27 - Bactérias láticas (UFC.mL^{-1}) recicladas no fermento para tratamentos 69
Figura 28 - Leveduras totais (UFC.mL^{-1}) recicladas no fermento para tratamentos 70
Figura 29 - Leveduras não-*Saccharomyces* (UFC.mL^{-1}) recicladas no fermento para tratamentos 71
Figura 30 - Leveduras não-*Saccharomyces* e não-*Saccharomyces cerevisiae* (UFC.mL^{-1}) recicladas no fermento para tratamentos 72
Figura 31 – Valores médios de pH (A) e acidez total (B) em mosto fermentado de cana colhida e armazenada 74
Figura 32 - Valores médios de açúcares redutores residuais totais (%) em mosto fermentado de cana colhida e armazenada 75
Figura 33 - Desdobramento da interação entre tratamentos e ciclos para açucares redutores residuais totais nos vinhos 75
Figura 34 - Valores médios de teor alcoólico (v.v^{-1}) em mosto fermentado de cana colhida e armazenada 76
Figura 35 - Níveis de acidez volátil (mg.100 mL^{-1} A.A.) em cachaças produzidas em 5 ciclos fermentativos utilizando-se mosto de cana colhida e armazenada 77
Figura 36 - Níveis de acetaldeído (mg.100 mL^{-1} A.A.) em cachaças produzidas em 5 ciclos fermentativos, utilizando-se mosto fermentado de cana colhida e armazenada ... 78
Figura 37 - Níveis de acetato de etila (mg.100 mL^{-1} A.A.) em cachaças produzidas em 5 ciclos fermentativos, utilizando-se mosto fermentado de cana colhida e armazenada 78
Figura 38 - Conteúdo de propanol (mg.100 mL^{-1} A.A.) em cachaças produzidas em 5 ciclos fermentativos, utilizando-se mosto fermentado de cana colhida e armazenada 79
Figura 39 - Conteúdo de álcool isobutílico (mg.100 mL^{-1} A.A.) em cachaças produzidas em 5 ciclos fermentativos, utilizando-se mosto fermentado de cana colhida e armazenada 80

Figura 40 - Conteúdo de álcool isoamílico (mg.100 mL^{-1} A.A.) em cachaças produzidas em 5 ciclos fermentativos, utilizando-se mosto fermentado de cana colhida e armazenada 80
Figura 41 - Álcoois superiores totais (mg.100 mL^{-1} A.A.) em cachaças produzidas em 5 ciclos fermentativos, utilizando-se mosto fermentado de cana colhida e armazenada 81
Figura 42 - Níveis de furfural (mg.100 mL^{-1} A.A.) em cachaças produzidas em 5 ciclos fermentativos, utilizando-se mosto fermentado de cana colhida e armazenada ... 82
Figura 43 - Compostos secundários totais (mg.100 mL^{-1} A.A.) em cachaças produzidas em 5 ciclos fermentativos, utilizando-se mosto fermentado de cana colhida e armazenada 82
Figura 44 - Níveis de álcool metílico (mg.100 mL^{-1} A.A.) em cachaças produzidas em 5 ciclos fermentativos, utilizando-se mosto fermentado de cana colhida e armazenada 83
Figura 45 - Níveis de cobre (mg.L^{-1}) em cachaças produzidas em 5 ciclos fermentativos, utilizando-se mosto fermentado de cana colhida e armazenada 83
Figura 46 – Níveis de carbamato de etila (µg.L^{-1}) em cachaças produzidas em 5 ciclos fermentativos, utilizando-se mosto fermentado de cana colhida e armazenada ... 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química e requisitos de qualidade da cachaça, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (Instrução Normativa, nº 13, de 29/06/2005 e Instrução Normativa, nº 28, de 08/08/2014) 22

Tabela 2 - Resultados da análise de variância (teste F) e teste de Tukey (5% de probabilidade) para Brix, Pol, Pureza e pH do caldo de cana colhida e armazenada 48

Tabela 3 - Resultados da análise de variância (teste F) e teste de Tukey (5% de probabilidade) para acidez total ($gH_2SO_4.L^{-1}$), açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) do caldo de cana colhida e armazenada 53

Tabela 4 - Resultados da análise de variância (teste F) e teste de Tukey (5% de probabilidade) para as contagens de micro-organismos no caldo ($UFC.mL^{-1}$), sobre cultivo em meio PCA, MRS, WLN, WLD e LWYM 57

Tabela 5 - Resultados da análise de variância (teste F) e teste de Tukey (5% de probabilidade) para médias de viabilidade celular, viabilidade de brotos e índice de brotamento no início do processo fermentativo 62

Tabela 6 - Resultados da análise de variância (teste F) e teste de Tukey (5% de probabilidade) para as contagens de micro-organismos no fermento ($UFC.mL^{-1}$), sobre cultivo em meio PCA, MRS, WLN, WLD e LWYM 67

Tabela 7 - Resultados da análise de variância (teste F) e teste de Tukey (5% de probabilidade) para os valores médios de pH, acidez total, açúcares redutores residuais totais (ARRT) e teor alcoólico dos vinhos 73

1 INTRODUÇÃO

A agroindústria de cachaça representa um considerável mercado gerador econômico para o país. A produção nacional de cachaça encontra-se em torno de 1,2 bilhão de litros anuais (IBRAC, 2014), sendo responsável por um faturamento de aproximadamente R$7 bilhões em sua cadeia produtiva. A cachaça encontra-se entre a segunda bebida alcoólica mais consumida no país, e o terceiro destilado mais apreciado no mundo (SEBRAE, 2015).

A principal matéria-prima utilizada para a produção deste destilado é a cana-de-açúcar, a qual deve se encontrar em perfeitas condições de desenvolvimento fisiológico, para garantir a máxima eficiência industrial e a produção de uma bebida de qualidade.

A ocorrência de fatores limitantes ao desenvolvimento da planta e a manutenção do seu estado fisiológico pós-colheita, podem refletir em alterações na sua qualidade, impactando no processamento industrial. Esta perda de qualidade pode resultar em elevação nos níveis de contaminantes, menores concentrações de açúcares recuperáveis, inversão da sacarose, produção de polissacarídeos e liberação de metabólitos indesejáveis (ácido lático e acético).

Dentre os principais fatores que comprometem a qualidade da matéria-prima, pode-se destacar o tempo de espera entre colheita e processamento. Esta prática é muito comum em algumas unidades de produção de cachaça e etanol, visando à suplementação contínua de matéria-prima no processamento. O armazenamento dos colmos inteiros sob condições ambientais, pode resultar em redução no peso e % de caldo extraído, perdas de sacarose, menor pureza e pH, e simultaneamente elevação na % de sólidos solúveis totais, acidez titulável e dextranas, além de proporcionar um aumento exponencial de contaminantes, proporcional ao período de armazenamento (BHATIA et al., 2009).

Como a produção da cachaça ocorre por via fermentativa, torna-se fundamental a utilização de matéria-prima de qualidade na preparação do mosto, pois os compostos químicos da bebida são sintetizados principalmente, através das reações metabólicas envolvidas na bioquímica da fermentação alcoólica. Alcoois superiores, ésteres, aldeídos e ácidos orgânicos são os compostos responsáveis pelo aroma e sabor típico da bebida, desempenhando um importante papel na formação do perfil sensorial do destilado (ALCARDE; MONTEIRO; BELLUCO, 2012).

A menor qualidade química do caldo e a introdução de diferentes linhagens de micro-organismos nas fermentações do mosto podem ocasionar transtornos operacionais, resultando em consumo de açúcares e nutrientes, redução da viabilidade celular das leveduras, floculação do fermento, liberação de metabólitos tóxicos e aumento da competição entre células pelos

substratos do meio. Tal situação pode comprometer o desenvolvimento do processo, implicando em menores rendimentos em álcool e um desequilíbrio na formação dos compostos químicos que caracterizam o destilado.

O período entre colheita e processamento da cana resulta em consideráveis alterações na qualidade do caldo, refletindo em aumento da atividade enzimática e microbiana, através do consumo da sacarose armazenada nas células. Diversas pesquisas demonstram os reflexos do armazenamento dos colmos de cana sobre as características tecnológicas do caldo. Entretanto, pouco se sabe dos impactos deste armazenamento sobre o processamento e qualidade química da cachaça. Assim, o presente estudo teve como objetivos, avaliar a qualidade pós-colheita de colmos de cana armazenados, e seus reflexos na condução dos processos fermentativos e formação dos compostos secundários e contaminantes da cachaça.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cachaça

2.1.1 Regulamentação da cachaça

A Legislação Brasileira, através da Instrução Normativa n°13 de 2005, define cachaça como a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 a 48% $v.v^{-1}$ a 20°C, obtida pela destilação do mosto fermentado de caldo de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares. Já a aguardente de cana é definida como a bebida com graduação alcoólica de 38 a 54% $v.v^{-1}$ a 20°C, obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar. Ambas podem ser adicionadas de até 6 $g.L^{-1}$ de açúcares, expresso em sacarose (BRASIL, 2005a).

O processo de produção da cachaça consiste inicialmente na moagem da cana-de-açúcar originando um caldo com teor de sólidos solúveis em torno de 20% $p.p^{-1}$, que poderá ser ajustado com relação a concentração de açúcar para então ser fermentado. O processo fermentativo é geralmente conduzido em batelada, utilizando leveduras naturais (*pé de cuba*), usualmente preparadas por método conhecido como fermento caipira. As fermentações são frequentemente completadas em 24 horas, quando as leveduras sedimentam e o vinho fermentado é enviado para um destilador de cobre (*alambique*) e aquecido a aproximadamente 90°C. Da destilação do vinho, obtêm-se um destilado com graduação de 38 a 48% de etanol ($v.v^{-1}$). O processo é repetido, recarregando-se a dorna com caldo recém-extraído (SCHWAN et al., 2001).

A água e o etanol são os principais componentes da bebida, constituindo-se aproximadamente 98% do destilado. No entanto, outros componentes minoritários estão presentes, conhecidos como compostos secundários ou congêneres (acidez total expressa em ácido acético, ésteres, aldeídos totais expressos em acetaldeído, furfural, 5-hidroxi-metil-furfural e álcoois superiores), os quais não poderão ser inferiores a 200 mg e superiores a 650 mg por 100 mL de álcool anidro segundo a legislação (BRASIL, 2005a).

Os demais compostos, como metanol, carbamato de etila, acroleína, entre outros, são denominados de contaminantes orgânicos. Tais compostos são provenientes das reações bioquímicas da fermentação alcoólica e da destilação do vinho, sendo responsáveis pelo aroma e sabor típico da bebida. A Legislação Brasileira estabelece um padrão mínimo de

qualidade para a produção de cachaça. Os limites de concentração de compostos secundários estão listados na Tabela 1 (BRASIL, 2005a; BRASIL, 2014).

Tabela 1 – Composição química e requisitos de qualidade da cachaça, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (Instrução Normativa, nº 13, de 29/06/2005 e Instrução Normativa, nº 28, de 08/08/2014)

Compostos secundários	**Unidade**	**Máximo permitido**
Acidez volátil expressa em ácido acético	mg.100 mL^{-1} de A.A.	150
Ésteres totais expresso em acetato de etila	mg.100 mL^{-1} de A.A.	200
Soma de furfural e hidroximetilfurfural	mg.100 mL^{-1} de A.A.	5
Álcoois superiores	mg.100 mL^{-1} de A.A.	360
Aldeídos totais em acetaldeído	mg.100 mL^{-1} de A.A.	30
Coeficiente de congêneres	mg.100 mL^{-1} de A.A.	200 à 650
Contaminantes orgânicos		
Álcool metílico	mg.100 mL^{-1} de A.A.	20
Carbamato de etila	$\mu g.L^{-1}$	210
Acroleína (2-propenal)	mg.100 mL^{-1} de A.A.	5
Álcool sec-butílico (2-butanol)	mg.100 mL^{-1} de A.A.	10
Álcool n-butílico (1-butanol)	mg.100 mL^{-1} de A.A.	3
Contaminantes inorgânicos		
Cobre	$mg.L^{-1}$	5
Chumbo (Pb)	$\mu g.L^{-1}$	200
Arsênio (As)	$\mu g.L^{-1}$	100

[a]A.A. = Álcool Anidro

2.1.2 Mercado

Atualmente a produção nacional de cachaça encontra-se em torno de 1,2 bilhão de litros anuais, com aproximadamente 12 mil estabelecimentos, sendo Minas Gerais o estado com maior concentração de produtores. Podem ser encontradas no mercado mais de quatro mil marcas deste destilado (IBRAC, 2014). O setor é responsável por um movimento anual em sua cadeia produtiva de R$ 7 bilhões, respondendo por 600 mil empregos diretos e indiretos (SEBRAE, 2015).

Dentre o mercado de bebidas alcoólicas, o consumo de cachaça é somente superado pelo mercado cervejeiro (Figura 1). A cachaça é o terceiro destilado mais consumido no mundo e representa 87% da produção de bebidas destiladas no país (SEBRAE, 2015).

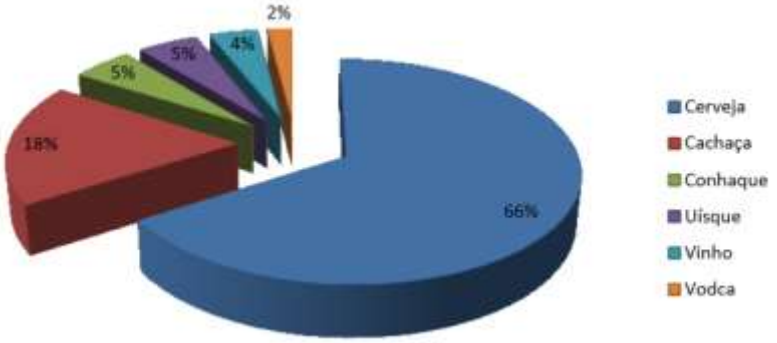

Figura 1 - Mercado nacional de bebidas (IBRAC, 2010)

Os estados de São Paulo, Pernambuco e Ceará são responsáveis por quase toda a produção da cachaça industrial, enquanto nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia e também São Paulo, concentra-se a produção da cachaça "artesanal", com predominância de 50% da produção da cachaça de alambique nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro (EMBRAPA, 2014).

Embora o mercado brasileiro apresente números expressivos, as exportações de cachaça não ultrapassam 2,0% da produção nacional. Atualmente, são aproximadamente 60 empresas exportadoras, abrangendo mais de 59 mercados exportadores. A receita gerada em 2013 foi de US$ 16,59 milhões, representando um aumento de 13,23% no volume exportado com relação ao ano anterior. Os principais países de destino em valor são: Alemanha, Estados Unidos, Portugal, França, Paraguai e Itália (Figura 2) (IBRAC, 2014).

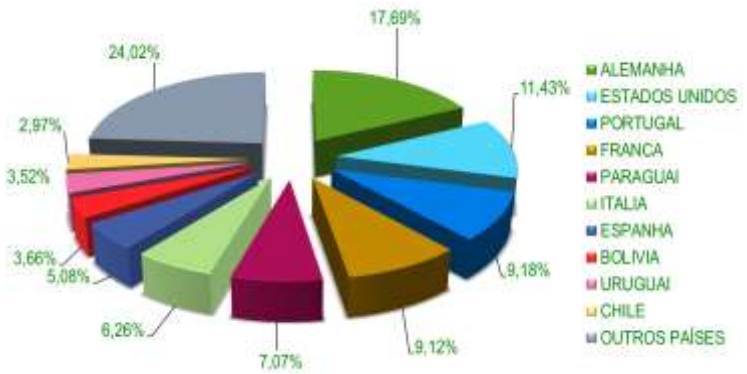

Figura 2 - Principais países importadores de cachaça (IBRAC, 2014)

2.2 Cana-de-açúcar

2.2.1 Biossíntese da sacarose

A partir de reações fotossintéticas a cana-de-açúcar realiza a fixação de dióxido de carbono para a síntese de sacarose nas folhas. A sacarose fosfato-sintase sintetiza sacarose-6-fosfato, a qual é desfosforilada pela sacarose-fosfato fosfatase para formar sacarose. A sacarose-sintase pode hidrolisar a sacarose para UDP-glicose e frutose ou catalisar uma reação de síntese reversa (ZHU; KOMOR; MOORE, 1997).

A sacarose pode ser conduzida até as células do colmo por meio de vasos condutores especializados, para ser armazenada nos vacúolos das células, ou pode ser hidrolisada nos seus constituintes glicose e frutose, que serão utilizados como substrato primário para os processos respiratórios da planta (Figura 3). A energia produzida na respiração é utilizada para a manutenção da estrutura e da integridade fisiológica da planta, na síntese de produtos de defesa e para o crescimento (WATT; CRAMER, 2009).

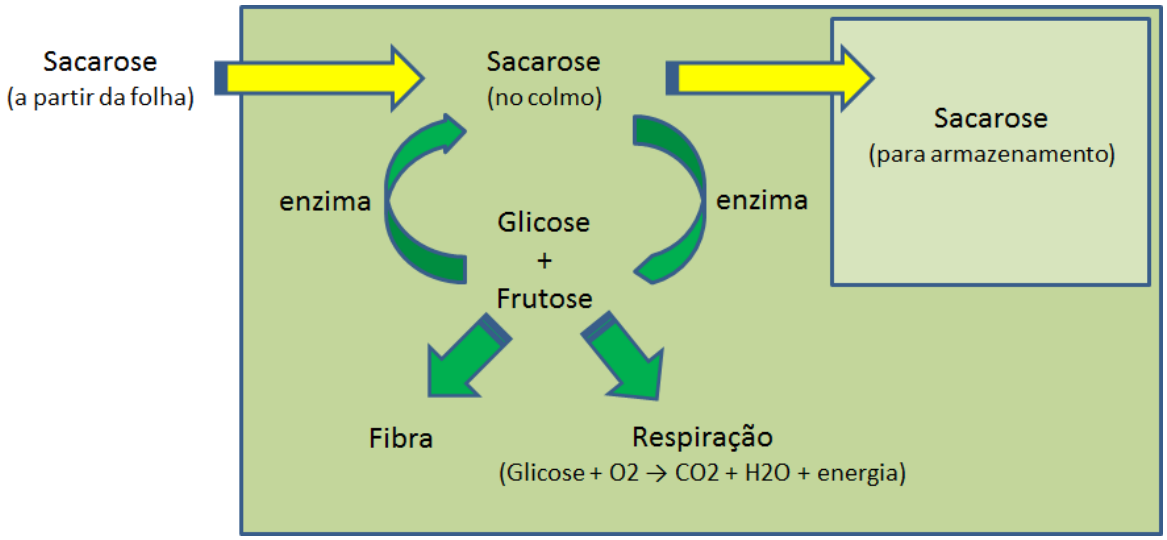

Figura 3 - Mecanismo de utilização da sacarose dentro das células do colmo de cana
Adaptado: Watt e Cramer (2009)

A concentração de sacarose nos internódios da cana-de-açúcar esta correlacionada com a redução da atividade de invertases ácidas durante a maturação e uma diferença entre a sacarose fosfato-sintase e a atividade de invertases ácidas solúveis (ZHU; KOMOR; MOORE, 1997).

O conteúdo de açúcares acumulados na cana é representado pelo balanço entre os açúcares que foram sintetizados e aqueles destinados a manutenção da planta. Após colheita da cana, a síntese e o acúmulo de sacarose são interrompidos, passando a ser utilizada nas reações fisiológicas das células (MEHROTRA; MEHROTRA; SURYAWANSHI, 2009).

2.2.2 Qualidade da matéria-prima armazenada

A qualidade da matéria-prima pode ser definida como um conjunto de características que atenda as exigências da indústria por ocasião do processamento (MUTTON, 2008). A ocorrência de fatores limitantes ao desenvolvimento da planta, e a manutenção do seu estado fisiológico pós-colheita, podem refletir em alterações na sua qualidade, impactando no processamento industrial.

Diversos são os fatores que comprometem a qualidade dos colmos de cana armazenados, podendo-se destacar a temperatura ambiente, umidade relativa, variedade, período de armazenamento, atividade de invertases, estágio de maturação, entre outros (ROSE; BOTHA, 2000; SIDDHANT et al., 2008; SOLOMON, 2000; SOLOMON et al., 2006; SOLOMON, 2009).

Estudos demonstram que o intervalo entre colheita e processamento da cana, é o principal fator que determina as taxas de perda de sacarose, através de processos de inversão e respiração, assim como, formação de ácidos orgânicos, dextrana e polissacarídeos (RAKKIYAPPAN et al., 2009; SINGH et al., 2006; SOLOMON, 2009).

A baixa qualidade da cana está associada principalmente com as reações de inversão química e enzimática, particularmente de origem microbiana, influenciadas pela sanidade da cana e condições ambientais (EGGLESTON, 2002). Nos colmos de cana colhido e armazenados, a inversão se torna evidente devido ao gradual aumento de açúcares redutores, processo catalisado inicialmente por invertases endógenas, sendo agravada pela ação de invertases de origem microbiana (SOLOMON et al., 2006).

Aproximadamente, 13% da sacarose presente é utilizada nas reações de inversão química, 25% nas atividades enzimáticas e 62% metabolizada por micro-organismos existentes no caldo e introduzidos ao longo do processamento (SOLOMON, 2009).

2.2.2.1 Micro-organismos contaminantes

Micro-organismos contaminantes podem ser encontrados na matéria-prima, decorrentes das condições normais do ambiente de cultivo da cana, podendo-se destacar os gêneros *Acetobacter, Enterobacter, Pseudomonas, Aeromonas, Vibrio, Bacillus* e bactérias ácido láticas (SUMAN et al., 2000).

A cana-de-açúcar possui uma flora microbiana endógena, capaz de se multiplicar quando os mecanismos de manutenção das células são interrompidos em função da colheita. Fatores como elevadas temperaturas e alta umidade, favorecem o crescimento de fungos e bactérias (JAMES; OLIVARES, 1997), sendo a capacidade de multiplicação destes micro-organismos dependente da extensão de danos no colmo e do tempo de permanência da cana cortada no campo. Além disso, a queima da cana, as práticas de colheita mecanizada e o armazenamento, podem provocar aberturas no colmo favorecendo a entrada de micro-organismos (WATT; CRAMER, 2009).

A presença destes micro-organismos no processamento dos colmos de cana ocorre desde a lavoura até o setor de fermentação, sendo que os contaminantes presentes no caldo e no mosto podem refletir na qualidade da matéria-prima utilizada, pois tanto o caldo quanto o mosto são excelentes substratos para o crescimento microbiano. Este crescimento é favorecido pelos elevados teores de nutrientes orgânicos e inorgânicos, alta atividade de água e pH favorável do caldo, além das temperaturas que ocorrem nos processos industriais de fermentação (GALLO, 1990; GALLO; CANHOS, 1991).

Bactérias e fungos utilizam os açúcares presentes na cana para produzir energia necessária ao seu crescimento. Em decorrência do seu metabolismo, uma variedade de enzimas hidrolíticas é excretada, promovendo a inversão da sacarose. Bactérias do gênero *Leuconostoc* sp. (*L. mesenteroides e L. Dextranicum*), em condições favoráveis, formam colônias após multiplicação, convertendo a sacarose em polissacarídeos. Esses micro-organismos são anaeróbios facultativos e se reproduzem rapidamente sobre condições de anaerobiose (SOLOMON, 2009).

Além da produção de dextrana, os ácidos orgânicos (ácido lático, acético e butílico) produzidos por micro-organismos contaminantes, também são responsáveis pela redução do conteúdo de sacarose e pH do caldo. Para cada grama de ácido formado, aproximadamente 2,77g e 11,09g de sacarose são degradadas, pela ação de *Leuconostoc mesenteróides* e *Escherichia coli*, respectivamente (GUPTA; LAL, 1984 apud SOLOMON, 2009).

2.2.2.2 Atividade enzimática

As enzimas invertases podem ser encontradas nos tecidos vegetais em diferentes estágios de maturação, sob as formas ácida e neutra, com pH de atuação de aproximadamente 5,2 e 7,0, respectivamente. A sacarose esta predominantemente localizada nos vacúolos das células do colmo, permanecendo isolada da atividade das invertases neutras citosólicas (BOSCH; GROF; BOTHA, 2004), enquanto as invertases ácidas estão presentes nos vacúolos, atuando no mecanismo de hidrólise da sacarose (HATCH; GLASZIOU, 1963).

Na cana-de-açúcar, a atividade das invertases ácidas e neutras está correlacionada com os níveis de hexoses, taxa de respiração e com a duração e temperatura de armazenamento (LONTOM; KOSITTRAKUN; LINGLE, 2008; MAO; QUE; WANG, 2006; SISWOYO et al., 2007). Siswoyo et al. (2007), verificaram que a atividade das invertases neutras é mais elevada no inicio do armazenamento, enquanto, as invertases ácidas apresentam atividade aumentada com a extensão do período de armazenamento da cana. A acidez característica do caldo permite a predominância das invertases ácidas, resultando em efeitos significativos sobre a sacarose armazenada (VERMA et al., 2012).

O processo de inversão da sacarose em açúcares redutores é um importante indicador de deterioração da cana-de-açúcar. A atividade de invertases aumenta progressivamente durante o armazenamento da cana, refletindo em consideráveis alterações na qualidade do caldo, favorecendo os processos de inversão da sacarose (SINGH et al., 2008). Esses autores demonstraram que a atividade de invertases ácidas aumentou 1,38 e 4,75 vezes após 48 e 240 horas de armazenamento, respectivamente, com consequente elevação nos níveis de açúcares redutores do caldo.

Verma et al. (2012) encontraram uma correlação negativa entre a redução na porcentagem de sacarose no caldo e a atividade de invertases durante 24 e 120 horas de armazenamento da cana, independentemente da variedade estudada. Segundo Solomon et al. (1990) apud Solomon (2009), o armazenamento da cana por 72 horas, proporcionou elevação na atividade de invertases ácida e neutra, com correspondente aumento nos níveis de açúcares redutores.

Além de intensificar a atividade enzimática, o armazenamento da cana pode também contribuir com a redução de peso e % de caldo extraído, baixa pureza, menor % de sacarose e baixos valores de pH, refletindo, em aumento de sólidos solúveis totais, acidez titulável e dextrana (BHATIA et al., 2009), comprometendo consideravelmente a qualidade da matéria-prima destinada ao processamento.

2.3 Fermentação alcoólica

2.3.1 Bioquímica da fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica consiste na degradação anaeróbica da glicose, ou de outros carboidratos, para a produção de energia na forma de ATP (Adenosina trifosfato), com consequente formação de duas moléculas de piruvato (VENTURA, 2007).

O piruvato produzido na glicólise possui três destinos, que dependem da característica do microrganismo e das condições metabólicas que os mesmos são submetidos. A levedura converte o piruvato em etanol e gás carbônico em duas reações. Na primeira reação, o piruvato sofre descarboxilação em uma reação irreversível catalisada pela enzima piruvato descarboxilase. Na segunda reação, através da ação da enzima álcool desidrogenase, o acetaldeído é reduzido a etanol, na presença do NADH (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006).

Além do etanol e gás carbônico, são produzidos na fermentação outros diversos compostos em quantidades menores, tais como ácidos carboxílicos, ésteres (acetato de etila e lactato de etila), aldeídos (acetaldeído, formaldeído e propenaldeído) e álcoois superiores (isoamílico, n-propanol, isobutanol) (ALCARDE, 2014).

2.3.2 Microbiologia dos processos fermentativos

As condições intrínsecas ocorrentes durante os processos fermentativos, referentes à temperatura, acidez, concentração de açúcares e nutrientes, favorecem o desenvolvimento de uma diversidade de micro-organismos, como bactérias e uma variedade de leveduras. As fermentações destinadas a produção de cachaça possuem uma microbiota muito complexa, apresentando uma variedade de leveduras, dentre elas *Kluyveromyces marxianus, Pichia heimii, Hanseniaspora uvarum, Pichia subpelliculosa, Debaryomyces hansenii, Pichia methanolica* e *Saccharomyces cerevisiae*, assim como, bactérias ácido láticas e acéticas e bactérias da família *enterobactericiaea* (SCHWAN et al., 2001).

As bactérias láticas são os principais grupos de bactérias encontradas em fermentações alcoólicas destinadas a produção de cachaça, sendo *Lactobacillus casei* e *L. plantarum* as espécies predominantes. *L. ferintoshensis, L. fermentum, L. jensenii, L. murinus, Lactococcus lactis, Enterococcus spp*. e *Weissella confusa* são outras espécies de bactérias láticas que também podem ser encontradas durante os processos fermentativos (GOMES et al., 2010).

2.3.2.1 Bactérias láticas

Bactérias ácido láticas podem ocasionar diversos transtornos operacionais em fermentações alcoólicas devido ao seu perfil anaeróbio facultativo, sua capacidade de tolerar altas temperaturas e baixo pH e pela sua habilidade de crescer rapidamente e sobreviver sob condições nas quais o etanol é produzido (NARENDRANATH, 2003).

Bactérias láticas heterofermentativas, podem produzir CO_2, manitol, etanol, ácido acético e uma pequena quantidade de acetaldeído, em consequência da produção de ácido lático (ESCALANTE et al., 2004), contribuindo com alterações na composição química e nas propriedades sensoriais da cachaça (DUARTE et al., 2011).

Em fermentações industriais, micro-organismos contaminantes constantemente desviam fontes de carbono disponíveis a produção de etanol e crescimento celular, para a síntese de subprodutos (ácido lático e acético) inibitórios as leveduras. Níveis elevados de contaminantes podem comprometer o desenvolvimento do processo, necessitando de interrupções para limpeza e esterilização dos equipamentos, elevando os custos de produção (SKINNER; LEATHERS, 2004).

Segundo Narendranath, Thomas e Ingledew (2001), o cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* na presença de ácido lático (0,8-1,0% $p.v^{-1}$) e acético (0,05-0,1% $p.v^{-1}$) resultou em redução na taxa de crescimento específica das leveduras, refletindo em decréscimo na taxa de consumo de substrato e na produção de etanol, com inibição mais intensa quando a concentração de ácido acético excedeu 0,1%. Pode-se deduzir que as bactérias heterofermentativas possuem maior efeito inibidor sobre as leveduras durante a fermentação alcoólica, quando comparadas as homofermentativas, pois são produtoras de ácido acético (COSTA et al., 2008).

O desenvolvimento de *Lactobacillus fermentum* e *Bacillus subtilis* em fermentações conduzidas com *Saccharomyces cerevisiae*, resultou em aumento da acidez total dos vinhos, enquanto a viabilidade das leveduras foi reduzida em 73,5 e 59,2%, respectivamente (NOBRE; HORII; ALCARDE, 2007).

Thomas, Hynes e Ingledew (2001), verificaram que a pré-inoculação de *Lactobacillus* (*L. collinoides, L.fermentum, L. plantarum e L. paracasei*) em fermentações conduzidas por *S. cerevisiae*, ocasionaram desvios de carboidratos para a produção de ácido lático e glicerol, refletindo em decréscimo na viabilidade celular e na produção de biomassa e etanol.

Lactobacillus fermentum também estão envolvidos com os mecanismos de floculação de leveduras em fermentações alcoólicas (SOUZA; MUTTON, 2004). A floculação de

S.cerevisiae é intensificada quando a concentração de *L. fermentum* é aumentada, alcançando índices de 100% em concentrações bacterianas de 1,38 a 3,76% de biomassa seca (LUDWING; OLIVA-NETO; ANGELIS, 2001).

Duarte et al. (2011), demonstraram que a inoculação de *L. fermentum* com *S. cerevisiae* em fermentações alcoólicas destinadas a produção de cachaça, resultaram em diminuição do crescimento bacteriano, provavelmente devido ao efeito inibidor do etanol. Entretanto, mesmo com a predominância das leveduras no processo, a atividade bacteriana comprometeu a qualidade do destilado.

Micro-organismos contaminantes também são reciclados com as leveduras causando diversos transtornos operacionais, intensificando a competição entre células de leveduras e bactérias pelos nutrientes do meio (OLIVA-NETO; YOKOYA, 2001). O reaproveitamento do inóculo promove um estímulo à multiplicação bacteriana, devido ao enriquecimento do meio causado pelas bactérias hidrolisadas e aminoácidos provenientes das células de leveduras (CHERUBIN, 2003).

O controle bacteriano durante o processo fermentativo é imprescindível, pois eleva os custos do produto, portanto, justifica-se a necessidade de conhecer os fatores que estimulam a multiplicação bacteriana, buscando novas tecnologias menos onerosas para o controle dos contaminantes da fermentação alcoólica (OLIVA-NETO, 1995).

2.3.2.2 Leveduras

Diferentes espécies de leveduras podem ser encontradas em fermentações para produção de cachaça (CAMPOS et al., 2010; BADOTTI et al., 2010; GUERRA et al., 2001), cada qual contribuindo decisivamente para a formação do perfil sensorial do destilado. Diversos metabólitos são produzidos por uma variedade de leveduras, dentre eles, aldeídos, álcoois superiores e ésteres, os quais podem ser benéficos ou não para a qualidade da bebida (DUARTE; AMORIM; SCHWAN, 2013; VICENTE et al., 2006; DATO; PIZAURO; MUTTON, 2005).

A biodiversidade de leveduras existentes em fermentações alcoólicas é reflexo da introdução de micro-organismos no processo, provenientes do caldo de cana e por ocasião do processamento. As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são as espécies predominantes, pois são fisiologicamente mais adaptadas ao ambiente de fermentação (PATARO et al., 1998).

A variabilidade genética de *S. cerevisiae* em fermentações destinadas a produção de cachaça, pode ser decorrente das características intrínsecas do ambiente de fermentação,

referentes aos pequenos ciclos fermentativos de 24 – 36 horas, geralmente conduzidos durante quatro a seis meses, e acompanhados de elevadas temperaturas (25 – 40°C) e alto conteúdo de etanol (GUERRA et al., 2001).

Guerra et al. (2001), isolaram 67 linhagens de *S. cerevisiae* de diferentes destilarias de cachaça de Minas Gerais, e evidenciaram a predominância desta espécie nas fermentações. Leveduras não-*Saccharomyces* também foram isoladas, porém desapareceram nos estágios finais do processo. Nova et al. (2009), encontraram além de *S.cerevisiae*, outras linhagens, dentre elas, *Candida milleri (Candida humilis), Pichia caribbica, Pichia guilliermondii e Zygosaccharomyces fermentati*, e constataram que a interação das espécies, contribuiu com a produção adequada dos compostos voláteis que caracterizam o destilado.

Oliveira et al. (2005a), observaram diferenças nas concentrações de aceltaldeído, acetato de etila, álcool isoamílico, propanol, isobutanol, ácido acético e glicerol, quando 24 diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* foram utilizadas em fermentações para produção de cachaça. Campos et al. (2010) também verificaram diferenças qualitativas na composição química (aldeídos, ésteres, metanol, álcoois e acidez volátil) de cachaças produzidas por três diferentes linhagens de *S. cerevisiae*.

Em fermentações industriais, além das leveduras produtoras de metabólitos e produtos voláteis desejáveis, outras espécies podem se instalar no processo, comprometendo o desempenho das fermentações e a qualidade química e sensorial da cachaça. Oliveira et al. (2005b), verificaram que as fermentações conduzidas com *Schizosacharomyces pombe* produziram um destilado com menores concentrações de álcoois superiores, conferindo um menor grau de aceitação ao produto durante a análise sensorial.

Oliveira et al. (2005a), verificaram que diferentes linhagens de leveduras não-*Saccharomyces* (*Candida apícola, C. famata, C. guilliermondii, Hanseniaspora occidentalis e Schizosacharomyces pombe*) podem aumentar a produção de glicerol, contribuindo com menores rendimentos fermentativos. Leveduras das espécies *Candida sp., C. drosophilae-like, P. guilliermondii* e *Z. fermentati*, não foram consideradas relevantes na condução de fermentações para produção de cachaça, pela ocorrência de fatores como elevado conteúdo de açúcares residuais, menor produtividade em etanol, além da não produção de metabólitos necessários a qualidade do destilado (NOVA et al., 2009).

Basso et al. (2008) estudando a biodiversidade de leveduras em fermentações industriais para produção de etanol, verificaram que a maioria das linhagens selvagens apresentaram características fermentativas indesejáveis, com produção excessiva de espuma, fermentações lentas, elevado conteúdo de açúcares residuais e intensa taxa de sedimentação. Souza Liberal

et al. (2007), caracterizando a população de leveduras contaminantes durante a produção de bioetanol, identificaram que *Dekkera bruxellensis* foi a espécie predominante, apresentando potencial de crescimento semelhante a *S. cerevisiae*.

Em controvérsia, Duarte, Amorim e Schwan (2013), demonstraram que fermentações conduzidas com linhagens de *P. caribbica* UFLA CAF733 em cultivo com *S.cerevisiae* UFLA CA11, proporcionaram menores concentrações de açúcares residuais, altos níveis de conversão do substrato e elevada produtividade volumétrica em etanol, em fermentações do mosto de cana-de-açúcar. A inoculação possibilitou a produção de maiores concentrações de compostos voláteis (etil hexanoato, 2-feniletanol, linalol, etil butirato, acetato feniletil, dietilsuccinato e geraniol) e redução na concentração de aldeídos e acidez volátil.

2.4 Composição química da cachaça

Os compostos químicos existentes na cachaça podem ser classificados em orgânicos e inorgânicos. Na fração orgânica encontram-se os aldeídos, ésteres, álcoois, ácidos carboxílicos, cetonas, acroleína, carbamato de etila e compostos sulfurados, enquanto na fração inorgânica estão presentes os íons metálicos (alumínio, cálcio, chumbo, cádmio, cobre, cromo, cobalto, ferro, etc). As características sensoriais da cachaça e sua toxicidade estão diretamente associadas com a concentração destes compostos (SIEBALDE et al., 2002).

A natureza e a qualidade dos compostos químicos que caracterizam o destilado dependem da qualidade da matéria-prima, do processo fermentativo, destilação do vinho e dos processos de envelhecimento (DATO; PIZAURO; MUTTON, 2005). Os compostos voláteis são essenciais para a formação do perfil sensorial do destilado e produção de uma cachaça com alto padrão de qualidade, que atenda a Legislação vigente.

2.4.1 Compostos secundários

2.4.1.1 Álcoois superiores

Os álcoois superiores se referem à soma dos álcoois isobutílico, propílico e isoamílico (BRASIL, 2005a). Os álcoois superiores caracterizam-se por conter mais de dois átomos de carbono e provavelmente resultam do metabolismo das leveduras, através da degradação de aminoácidos durante o processo fermentativo. Dentre os principais álcoois superiores

produzidos a partir de aminoácidos pode-se destacar o álcool d-amílico obtido de D-leucina, álcool isoamílico de L-leucina e álcool isobutílico a partir de valina (YOKOYA, 1995).

Lilly et al. (2006), estudando os efeitos da concentração de aminoácidos sobre a produção de álcoois superiores por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, verificaram que elevadas concentrações de valina, aumentaram a síntese de isobutanol, ácido isobutírico, propanol e ácido propanoico. Os teores dos álcoois isoamílico e 2-feniletil aumentaram com a adição de leucina, enquanto que a adição de isoleucina resultou em maior concentração de ácido isovalérico.

A concentração de álcoois superiores em cachaça também pode ser influenciada pela composição do meio, temperatura, níveis de aeração e pela linhagem da levedura, sendo sua síntese estimulada pelo oxigênio, estando diretamente relacionada com a taxa de crescimento do microrganismo (JANZANTTI, 2004).

Os álcoois com até cinco átomos de carbono (álcoois amílico e propílico e seus isômeros) contribuem para a formação do buquê aromático da bebida, porém seu excesso interfere negativamente no valor comercial e na qualidade da cachaça (CARDOSO, 2006).

2.4.1.2 Ésteres

Os ésteres são produzidos pelo metabolismo secundário intracelular das leveduras durante a fermentação alcoólica, através de reações enzimáticas entre ácidos ativados sob a forma de acetil-CoA e álcoois correspondentes. A formação de ésteres pós-fermentação, também ocorre via reação química direta entre álcoois e ácidos, porém em menor proporção. Os ésteres mais importantes em bebidas alcoólicas são os ésteres etílicos de ácidos graxos e acetatos, pois estão presentes em concentrações relativamente elevadas, com características aromáticas agradáveis e odor pouco pronunciado (ANGELINO, 1991; ETIÉVANT, 1991).

A concentração dos álcoois e acetil-CoAs correspondentes influencia na produção final dos ésteres durante o metabolismo das leveduras. Uma vez que a acetil-CoA e o etanol são o ácido e o álcool encontrados em maior abundância na fermentação, o acetato de etila é normalmente o éster predominante (PIGGOTT; PATERSON, 1989).

Etil ésteres e ésteres de acetato são as principais classes de ésteres com atividade flavorizante encontrados em bebidas fermentadas. Dentre os principais ésteres de acetato, destaca-se o etil acetato (aroma frutado e solvente), acetato isoamílico (aroma de banana) e 2-feniletil acetato (aroma de mel, rosas e flores). Os etil ésteres compreendem os ácidos graxos de cadeia média, onde o álcool é o etanol, e o grupo acil é derivado da atividade dos ácidos

graxos. Exemplos de etil ésteres são etil hexanoato e etil octanoato, apresentando aroma de maçã (CORDENTE et al., 2012).

Nascimento, Cardoso e Franco (2008, 2009) verificaram também a presença do composto etil lactato, representando 26,8% dos ésteres encontrados em cachaças, sendo classificado como o segundo mais abundante. A produção deste composto foi associada a contaminação do mosto por bactérias láticas (*Lactobacillus spp*.), intensificada pela deficiência de controle da fermentação alcoólica.

2.4.1.3 Aldeídos

O acetaldeído é o principal aldeído produzido pelas leveduras nos estágios iniciais da fermentação alcoólica, diminuindo gradativamente ao final do processo, pela oxidação a ácido acético (CARDOSO, 2006). A presença de oxigênio favorece também a formação de outros aldeídos, provenientes da oxidação de álcoois superiores (MAIA; CAMPELO, 2005). Os aldeídos são importantes compostos de aroma e sabor em bebidas alcoólicas, entretanto, quando em níveis elevados podem ser tóxicos ao organismo (NASCIMENTO, 1997; CHAVES; PÓVOA, 1992).

2.4.1.4 Furfural e hidrometilfurfural

O furfural e hidrometilfurfural são aldeídos formados pela pirogenação da matéria orgânica depositada no fundo das caldeiras do aparelho de destilação, sendo máxima a sua proporção com aquecimento a fogo direto. São compostos de aroma penetrante, enjoativo, considerado indesejável em bebidas destiladas (LIMA, 1964).

A colheita dos colmos de cana-de-açúcar após a queima das folhas pode influenciar na produção de furfural (MASSON et al., 2007). A presença de açúcares residuais ou bagacilho durante a fermentação do vinho poderá originar furfural e hidroximatilfurfural (HMF), através das reações de catalisação, intensificadas pela elevação da temperatura e redução do pH do vinho, ocasionando a desidratação dos açúcares e hidrolise da celulose, hemicelulose e pectina, como também outros polissacarídeos do bagacilho, seguido da desidratação de hexoses e pentoses (MAIA, 1994).

2.4.1.5 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos são formados durante a fermentação do mosto, e sua presença no destilado pode estar relacionada às boas práticas higiênicas dispensadas durante a produção da bebida. O ácido acético e lático geralmente são os mais abundantes, e sua produção é reflexo da contaminação do mosto por bactérias do gênero *Acetobacter* e *Lactobacillus*, respectivamente (SCHWAN et al., 2001; CARVALHO-NETTO; ROSA; CAMARGO, 2008).

Ácidos não voláteis, como oxalacético, cítrico, pirúvico, málico, maléico, dentre outros, podem ser formados pelo metabolismo normal das leveduras. A transição do metabolismo aeróbio para anaeróbio, durante a fase de crescimento da levedura, pode resultar na formação de ácidos graxos de cadeia curta (MAIA; CAMPELO, 2005). Os ácidos orgânicos são expressos em acidez total, composta pela acidez volátil e fixa, sendo os ácidos orgânicos voláteis predominantes em bebidas destiladas (JANZANTTI, 2004).

2.4.2 Contaminantes

2.4.2.1 Metanol

O metanol é produzido pela degradação da pectina, caracterizada pela união de várias moléculas de ácido galacturônico, com fragmentos de metanol em sua estrutura. Em fermentações alcoólicas, o metanol é liberado através de reações de hidrólise ácida e enzimática (MAIA; PEREIRA; SCHWABE, 1994).

No organismo humano o metanol é oxidado a ácido fórmico e posteriormente a gás carbônico, provocando acidose grave (diminuição do pH sanguíneo), afetando o sistema respiratório, podendo levar ao coma e até mesmo a morte (MAIA, 1994).

2.4.2.2 Cobre

Os aparelhos de destilação (alambiques) utilizados para produção de cachaça são normalmente construídos de cobre. Durante a destilação do vinho ou quando o alambique não se encontra em funcionamento, poderá ocorrer oxidação do cobre com consequente formação de azinhavre ($CuCO_3$,$Cu(OH)_2$). A contaminação da cachaça pelo cobre ocorre através do arraste de carbonato de cobre pelos vapores alcoólicos ácidos produzidos na destilação (BOZA; HORII, 1998).

A utilização de superfícies de cobre na destilação do vinho é importante, pois o cobre é um catalisador químico, responsável pela eliminação de substâncias (compostos sulfurados) sensorialmente desagradáveis (CARDOSO et al., 2003; NASCIMENTO et al., 1998). Entretanto, os níveis de cobre podem ser reduzidos com a limpeza apropriada do alambique, ou pela filtração do destilado em filtros de resina de troca iônica ou de carvão ativado (LIMA et al., 2006).

2.4.2.3 Carbamato de etila

O carbamato de etila ou uretana ($C_2H_5COONH_2$) pode ser encontrado em alguns alimentos e bebidas produzidos através do metabolismo microbiano (OUGH, 1976, apud ALCARDE; SOUZA; BORTOLETTO, 2012), sendo considerado potencialmente carcinogênico (ZIMMERLI; SCHLATTER, 1991). As características do produto, os métodos de processamento e a disponibilidade de precursores na matéria-prima, são fatores que regulam os mecanismos de formação deste composto (WEBER; SHARYPOV, 2009).

Ough, Crowell e Mooney (1988), demonstraram que a formação do carbamato de etila ocorre por meio do metabolismo das leveduras durante o processo fermentativo, através do acúmulo de ureia (precursor), resultante da degradação da arginina residual. O arraste de precursores nitrogenados durante a destilação do vinho, favorecem a formação de carbamato de etila no destilado (BRUNO et al., 2007).

O carbamato de etila possui maior solubilidade em etanol (1,2 $g.mL^{-1}$) do que em água (0,10 $g.mL^{-1}$), portanto são encontrados em maiores concentrações na fração “cabeça”, seguido das frações coração e cauda da cachaça (ANDRADE SOBRINHO et al., 2009).

Iida et al. (2006) citam que a formação de carbamato de etila é favorecida durante o armazenamento da cachaça, através da reação entre o etanol e a ureia formada pela degradação de precursores nitrogenados (arginina, ornitina e citrulina). Weber e Sharypov (2009) verificaram que a formação de carbamato de etila em bebidas alcoólicas, pode ocorrer também, através de reações entre o etanol e diferentes precursores nitrogenados, tais como fosfato de carbamila e cianeto.

Labanca, Glória e Afonso (2008), verificaram que 35% das amostras de cachaça coletadas em diferentes regiões do Estado de Minas Gerais encontravam-se com teores de carbamato de etila entre 500 e 1000 $\mu g.L^{-1}$ e 12% com teores 10 vezes superior ao estabelecido pela Legislação. Bruno et al. (2007), determinaram a concentração de carbamato

de etila em 28 amostras de destilados no estado do Rio de Janeiro, e constataram que 45% possuíam níveis superiores ao estabelecido pela Legislação vigente.

O armazenamento dos colmos de cana-de-açúcar pode contribuir com alterações na qualidade tecnológica e microbiológica do caldo. Assim, a presente pesquisa teve o objetivo de avaliar as consequências do armazenamento dos colmos de cana sobre a qualidade do caldo e, seus reflexos na condução dos processos fermentativos e na formação dos compostos químicos que caracterizam a cachaça.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Instalação e condução do experimento

O experimento foi instalado no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro (IFTM), campus Uberaba/MG, na safra 2014/2015. Para condução do experimento utilizou-se cana-de-açúcar instalada em área de quarto corte, variedade SP 71-1406 (ciclo médio), cultivada em Latossolo Vermelho distrófico, sem problemas fitossanitário, colhida manualmente, sem queima da palha e despontada.

As análises microbiológicas e tecnológicas do caldo e do processo fermentativo foram realizadas nos laboratórios de bromatologia e microbiologia do IFTM e as análises químicas da cachaça no laboratório do setor de Açúcar e Álcool do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" ESALQ/USP.

A temperatura e umidade relativa do ambiente de armazenamento dos colmos de cana foram determinadas através de termômetro com medidor de umidade relativa do ar, com leituras efetuadas no período da manhã e tarde.

3.2 Armazenamento dos colmos de cana e extração do caldo

As coletas dos colmos industrializáveis foram realizadas em três repetições, durante os meses de agostos e setembro de 2014, na Fazenda Tamboril, localizada na rodovia MG – 190 km 12, Município de Uberaba/MG. Para composição dos tratamentos, quarenta colmos de cana recém cortados (por tratamento) foram armazenados por períodos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas, para cada ciclo fermentativo, em local protegido de chuvas e raios solares, a temperatura e umidade relativa ambiente.

O caldo foi extraído em moenda convencional, marca VM, mod. 9½ x 14 (Figura 4), em intervalos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas para cada ciclo fermentativo. Imediatamente após a extração, o caldo foi filtrado para retenção de impurezas minerais e bagacilho e, encaminhado ao laboratório do IFTM para determinação das características tecnológicas e microbiológicas e condução dos processos fermentativos.

Figura 4 - Moenda utilizada para extração do caldo de cana

3.2.1 Avaliações das características tecnológicas do caldo

O Brix e a Pol foram determinados segundo Consecana (2006), e a Pureza aparente do caldo através do cálculo (Pol x 100/Brix). O pH foi determinado por leitura direta em medidor digital Tekna T – 1000, com temperatura corrigida em 25ºC. Os açúcares redutores (AR) e os açúcares redutores totais (ART) foram dosados pelo método volumétrico de Lane e Eynon (1934). A acidez total foi determinada de acordo com Copersucar (2001), através da titulação do caldo em agitação com NaOH padrão 0,05N, com leitura expressa em $gH_2SO_4.L^{-1}$ de caldo.

3.2.2 Avaliações das características microbiológicas do caldo e do fermento

Para contagens de bactérias lácticas utilizou-se o meio MRS Agar (*Man, Rogosa e Sharp* - peptona 1%, extrato de carne 1%, extrato de levedura 0,5%, glicose 2%, hidrogenofosfato de potássio 0,2%, tween 80 1%, citrato de diamônio 0,2%, acetato de sódio 0,5%, sulfato de magnésio 0,02%, sulfato de manganês 0,005%, agar 2%) (CECCATO-ANTONINI, 2010), sob cultivo aeróbico em placas com camada de meio sólido, adicionada sobre a amostra inoculada.

A quantificação de leveduras foi realizada utilizando-se o meio WLN (Wallerstein Laboratories Nutrient Agar - glicose 5%, KH_2PO_4 55mg, KCl 42,5mg, $CaCl_2.2H_2O$ 12,5mg, $MgSO_4.7H_2O$ 12,5mg, $FeCl_3.6H_2O$ 0,25g, $MnSO_4.4H_2O$ 0,25g, extrato de levedura 0,4%, caseína 0,5%, verde de bromocresol 2,2mg, agar 2%, água destilada 1000mL) (GREEN;

GRAY, 1950, modificado por OLIVEIRA; PAGNOCA, 1988) com adição dos antibióticos ampicilina e ácido nalidíxico (100mg/L cada).

Para quantificação de leveduras não pertencentes à espécie *Saccharomyces*, empregou-se o meio WLD (WLN + actidione – adição de actidione na forma de solução, ao meio WLN, para uma concentração final de 5 ppm) (WALTERS; THISELTON, 1953, modificado por MORRIS; EDDY, 1957 apud CECCATO-ANTONINI, 2010).

As contagens de leveduras *Saccharomyces* não-*cerevisiae* e não *Saccharomyces* foi realizada em meio LWYM (*Lin Wild Yeast Medium* – extrato de malte 0,2%, extrato de levedura 0,4%, peptona 0,2%, glicose 1%, fosfato de potássio bibásico 0,1%, cloreto de amônio 0,05%, cristal violeta 0,0006%, mistura fucsina-sulfito 0,01%, ágar 2%, ampicilina e ácido nalidíxico (100mg/L cada) (CECCATO-ANTONINI, 2010).

Para micro-organismos totais empregou-se o meio PCA (Plate Count Agar – peptona de caseína 0,5%, extrato de levedura 0,25%, glicose 0,1%, agar 2%), conforme descrito por Ceccato-Antonini, 2010.

Para a quantificação de micro-organismos no caldo, foram utilizadas duas placas para cada meio, com diluições seriadas de 10^{-1} e 10^{-2} para os meios MRS e WLD, 10^{-2} e 10^{-3} para os meios WLN e LWYM e 10^{-3} e 10^{-4} para o meio PCA. As placas foram incubadas em estufa tipo B.O.D. com controle de temperatura a 32°C por aproximadamente três dias.

As características microbiológicas do fermento foram determinadas utilizando-se duas placas para cada meio, com diluição seriada de 10^{-3} e 10^{-4} para o meio MRS, 10^{-6} e 10^{-7} para os meios WLN e PCA, 10^{-5} e 10^{-6}, para o meio LWYM e 10^{-1} e 10^{-2} para o meio WLD. As placas foram incubadas em estufa tipo B.O.D. com controle de temperatura a 32°C por aproximadamente três dias.

3.3 Preparo do mosto e condução do processo fermentativo

O caldo de cana filtrado foi submetido ao preparo do mosto, visando a padronização da concentração de sólidos solúveis totais para 16°Brix, através da adição de água destilada.

As fermentações foram conduzidas em batelada, com recuperação do fermento por decantação, durante cinco ciclos fermentativos, utilizando-se cinco dornas de aço inoxidável de fundo cônico, com capacidade total de 22L e volume de trabalho de 14L (Figura 5). O microrganismo utilizado para o desenvolvimento do processo fermentativo foi o fermento

comercial prensado (marca Itaiquara), constituído por 30 $g.L^{-1}$ de células de *Saccharomyces cerevisiae* (10^7 $UFC.mL^{-1}$), com viabilidade celular média de 97,8%.

Em cada tratamento foram adicionados 14L de mosto a 16ºBrix, preparados com caldo de colmos de cana armazenados por períodos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas (tratamentos). O mosto foi adicionado ao processo em duas alimentações de 7,0L, com adição da segunda alimentação após 60 minutos de início da fermentação. Ao término de cada ciclo (24 – 30h), quando o Brix final encontrava-se igual a zero, aguardou-se a decantação do fermento para separação do vinho e reaproveitamento do inóculo (sem tratamento prévio).

Figura 5 - Dornas de aço inoxidável utilizadas para fermentação do mosto

3.3.1 Análises microbiológicas do vinho

Para avaliação do processo fermentativo, através das análises de viabilidade, foi retirada uma alíquota do vinho no início do processo (30 minutos após a última alimentação da dorna), com contagens de células em Câmara de Neubauer (SILVA et al., 2003). Os parâmetros microbiológicos avaliados foram: viabilidade celular de leveduras, viabilidade de brotos e índice de brotamentos, calculados através das seguintes fórmulas:

- Viabilidade Celular % = células vivas x 100/células vivas + mortas
- Viabilidade de Brotos % = brotos vivos x 100/ brotos vivos + mortos
- Índice de Brotamentos % = brotos vivos x 100/ células vivas + mortas

3.3.2 Análises tecnológicas do vinho

O final das fermentações foi determinado com o auxílio de um densímetro de Brix. O vinho foi submetido a quantificação do teor alcoólico em densímetro digital (SILVA et al., 2003), pH por leitura direta em medidor digital Tekna T – 1000, acidez total ($gH_2SO_4.L^{-1}$) através da titulação do vinho em agitação com NaOH padrão 0,05N (COPERSUCAR, 2001), e açúcares redutores residuais totais (ARRT) pelo método de Lane e Eynon (1934).

3.4 Destilação do vinho

Após conclusão do processo fermentativo, os vinhos provenientes do 1º, 3º e 5º ciclo fermentativo foram destilados em alambique simples, com caldeira, capitel, alonga e condensador de cobre (Figura 6). O alambique possui sistema de aquecimento a gás e caldeira com capacidade útil de 13 litros de vinho. Após separação da fração cabeça, correspondente a 2% do volume de vinho, a fração coração do destilado foi coletada e padronizada com graduação alcoólica de 40% $v.v^{-1}$, e então armazenada em recipiente de vidro âmbar. A fração cauda não foi recolhida, permanecendo na vinhaça.

Para avaliação dos compostos químicos dos destilados foram utilizadas amostras compostas, resultantes da 1º e 2º repetição de cada tratamento, segundo os procedimentos oficiais estabelecidos pela legislação vigente (BRASIL, 2005b). Foram quantificadas as concentrações de aldeídos, ésteres, furfural, álcoois superiores, ácido acético, metanol, cobre e carbamato de etila.

Figura 6 - Destilador de cobre utilizado para destilação do vinho

3.4.1 Cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas (GC-FID)

Por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chamas (GC-FID), foram analisados os teores de acetaldeído, acetato de etila, n-propanol, isobutanol, álcool isoamílico, furfural, ácido acético e álcool metílico da fração coração da cachaça. As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás Shimadzu modelo QP-2010 PLUS, com coluna Stabilwax-DA (Crossbond Carbowax polietilenoglicol esterificada, 30 m x 0,18 mm x 0,18 µm) e detector de ionização de chama (FID = Flame ionization detection). As temperaturas do detector e do injetor foram fixadas em 250°C e o modo de injeção automático com divisão de fluxo (*split*) de 1:25 com um volume de injeção de 1,0 µL da amostra, em triplicata. O fluxo do gás de arraste na coluna (H_2) foi de 1,5 $mL.min^{-1}$ com fluxo total de 42 $mL.min^{-1}$ e pressão de 252,3 KPa. A programação da rampa de temperatura da coluna foi: 40°C (isoterma de 4 min), aumento até 120°C a uma taxa de 20°$C.min^{-1}$ (isoterma de 1 min) e aumento a 30°$C.min^{-1}$ até 180°C (isoterma de 4 min).

3.4.2 Cromatografia gasosa acoplada a um espectrofotômetro de massa (GC-MS)

A análise de carbamato de etila foi realizada após 72 horas de destilação da amostra, uma vez que este composto é formado entre 24 e 48 horas após a destilação (RIFFKIN et al., 1989; AYLOTT et al., 1990). Todas as amostras foram analisadas com filtração prévia em filtro de membrana de PVDF em cromatógrafo gasoso (GC) acoplado a um espectrofotômetro de massa (MS), modelo GCMSQP2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japan), utilizando elétrons de impacto ionizante com energia de 70 eV e uma coluna capilar cromatográfica de fase polar (propileno glicol esterificado, HPFFAP; 50 m x 0.20 mm x 0.33 µm de filme de espessura em fase estacionária). As temperaturas de interface do injetor e detector foram de 230 e 220°C, respectivamente. As seguintes temperaturas foram programadas: iniciando com 90°C por 1 min, aumentando para 150°C a uma taxa de 10°$C.min^{-1}$, seguindo por aquecimento até 230°C a uma taxa de 30°$C.min^{-1}$, e permanecendo nesta temperatura por 2 min. Um volume de 1,0 µL foi injetado utilizando-se um injetor modelo splitless, em duplicata. O gás Hélio foi utilizado na condução a uma taxa de fluxo de 1.2 $mL.min^{-1}$. Foi empregado monitoramento de íon selecionado, monitorando o m/z 62 íons para carbamato de etila, utilizado como padrão interno (RECHE et al., 2007; CLEGG; FRANK, 1988). A quantificação foi realizada através de comparações com resultados cromatográficos de amostras com curva analítica obtida

utilizando-se uma solução estoque de carbamato de etila, com concentração entre 50 e 500 $\mu g.L^{-1}$ (sem padrão interno).

3.4.3 Teor de cobre na cachaça

A determinação do teor de cobre das amostras de cachaça foi realizada em espectrofotômetro de absorção atômica, conforme metodologia oficial para análise de aguardente e cachaça (BRASIL, 2005b).

3.5 Análise estatística

Os parâmetros tecnológicos e microbiológicos do caldo e do processo fermentativo foram analisados em delineamento experimental em blocos casualizados, em esquema fatorial 5 x 5, com três repetições. O primeiro fator foi os tempos de armazenamento dos colmos de cana pós-colheita (0, 24, 48, 72 e 96 horas), e o segundo fator correspondeu aos processos fermentativos conduzidos durante cinco ciclos (1º, 2º, 3º, 4º e 5º ciclos).

Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo Teste F e a comparação entre médias realizadas pelo teste de Tukey (P=0,05) (BANZATTO; KRONKA, 2006), sendo os dados das contagens de micro-organismos transformados em logaritmo (Log_{10}).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Qualidade dos colmos de cana colhidos e armazenados

4.1.1 Características do ambiente de armazenamento da cana

O presente estudo foi realizado na safra 2014/2015. Os colmos de cana foram armazenados sob condições de temperatura e umidade relativa ambiente, protegidos de chuvas e raios solares (Figura 7). Foram registrados os valores médios de temperatura e umidade relativa do ar, referente ao período de realização do experimento. A temperatura mínima e máxima foi de 20 e 32°C, respectivamente, enquanto, a umidade relativa do ar apresentou médias de 57,6% no período da manhã e 25,7% à tarde. Durante o período de realização do experimento, observou-se ausência de chuvas na região (dados não apresentados).

Verificou-se que este período foi caracterizado por elevadas temperaturas e baixa umidade relativa do ar. Devido aos baixos níveis de precipitação pluviométrica na região, que refletiram em baixa umidade relativa do ar, podemos constatar que esta condição pode contribuir decisivamente com os processos de transpiração dos colmos armazenados. Singh e Solomon (2003) demonstraram que o armazenamento de colmos de cana em temperatura média de 35,8 e 17,9°C para máxima e mínima, e umidade relativa máxima e mínima de 58 e 19%, respectivamente, resultaram em perdas de peso dos colmos armazenados, além de promover alterações na qualidade do caldo extraído.

Figura 7 - Colmos de cana armazenados

4.1.2 Avaliações tecnológicas do caldo

Foram detectadas significativas reduções na qualidade tecnológica do caldo. Os valores observados para Brix foram maiores, enquanto a Pol e a Pureza, sofreram reduções proporcionais ao período de armazenamento dos colmos de cana para tratamentos (Tabela 2; Figuras 8, 9 e 10). Para os valores de pH não foram detectadas diferenças significativas pelo teste de Tukey para os tratamentos estudados (Tabela 2; Figura 11). Para ciclos, observaram-se diferenças significativas para a Pureza do caldo entre o 3º e 5º ciclos, enquanto o pH foi aumentado ao longo dos ciclos (Tabela 2; Figuras 12 e 13).

Tabela 2 – Resultados da análise de variância (teste F) e teste de Tukey (5% de probabilidade) para Brix, Pol, Pureza e pH em caldo de cana colhida e armazenada

Causas de variação	**Brix**	**Pol**	**Pureza**	**pH**
	%			
Tempo de armazenamento (A)				
0 h	20,89D	20,24A	96,87A	5,30A
24 h	21,12CD	20,39A	96,58A	5,27A
48 h	21,32BC	20,12A	94,39B	5,30A
72 h	21,55AB	20,20A	93,76B	5,29A
96 h	21,70A	19,65B	90,61C	5,27A
F	$19,58^{**}$	$8,45^{**}$	$23,60^{**}$	$0,35^{NS}$
DMS (Tukey)	0,29	0,38	2,08	0,105
Ciclos (B)				
1	21,17A	19,93A	94,18AB	5,15C
2	21,36A	20,28A	94,97AB	5,23BC
3	21,45A	19,94A	93,04B	5,33AB
4	21,33A	20,22A	94,82AB	5,39A
5	21,27A	20,24A	95,20A	5,33AB
F	$2,036^{NS}$	$0,02^{NS}$	$2,78^{*}$	$13,56^{**}$
DMS (Tukey)	0,29	0,38	2,08	0,102
A x B	$0,33^{NS}$	$0,013^{*}$	$2,29^{*}$	$0,41^{NS}$
CV	1,33	1,84	2,14	1,93

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ^{ns} = não significativo; * = significativo ao nível de 5%; ** = significativo ao nível de 1%.

A análise de regressão mostrou que a concentração de sólidos solúveis totais do caldo (Figura 8) foi aumentada com a extensão do período de armazenamento dos colmos de cana, com valores mais elevados a partir de 72 horas (R^2=0,9956). Bhatia et al. (2009), encontraram maiores concentrações de sólidos solúveis totais no caldo e redução na porcentagem de extração, quando colmos de cana foram armazenados por 12 dias, associando o fato, a perda de umidade e consequente elevação em sua viscosidade.

A perda de peso pela desidratação dos colmos tem início logo após a colheita e se intensifica com a extensão do tempo entre corte e processamento da matéria-prima (SOLOMON et al., 2009). Embora este estudo não tenha avaliado o conteúdo de umidade e o rendimento de extração dos colmos de cana colhidos e armazenados, podemos constatar que o aumento da concentração de sólidos solúveis no caldo, esta associado com a perda de umidade dos colmos, decorrentes dos mecanismos de transpiração da cana, intensificados pelas elevadas temperaturas e baixa umidade relativa existentes no ambiente de armazenamento.

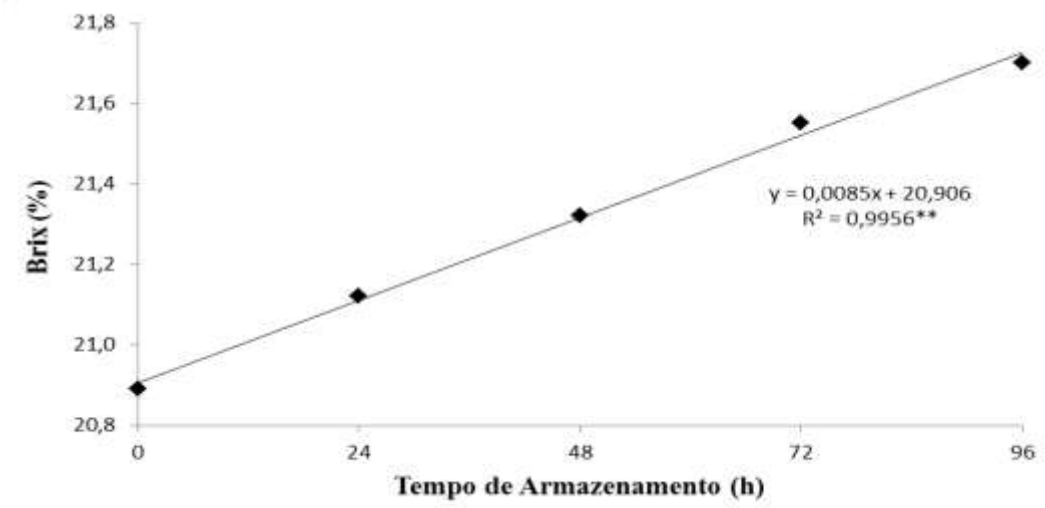

Figura 8 - Concentração de sólidos solúveis totais em caldo de cana colhida e armazenada.

A porcentagem aparente de sacarose foi significativamente reduzida nos colmos de cana armazenados por 96 horas (Figura 9). Essa redução pode estar associada a produção de ácidos orgânicos e ao crescimento microbiano na matéria-prima armazenada, os quais podem contribuir com a inversão da sacarose em açúcares redutores, implicando em menor disponibilidade de sacarose no caldo.

Verma et al. (2012), verificaram que o aumento da atividade de invertases favoreceram os processos de inversão da sacarose, resultando em redução na sua concentração, quando

colmos de cana foram armazenados por períodos de 24 – 120 horas. Durante o armazenamento, parte da sacarose é hidrolisada, aumentando o conteúdo de hexoses que serão utilizadas na respiração e outros processos fisiológicos da cana. Assim, a respiração e a formação de produtos intermediários devem ser a causa primária de redução da sacarose através da atividade hidrolítica das invertases (MAO; QUE; WANG, 2006).

Assim, sugere-se a hipótese que, a atividade enzimática e microbiana foram as causas primárias de redução do conteúdo de sacarose, que refletiram no comprometimento da estabilidade fisiológica da cana, desviando parte da sacarose armazenada aos processos respiratórios e crescimento microbiano.

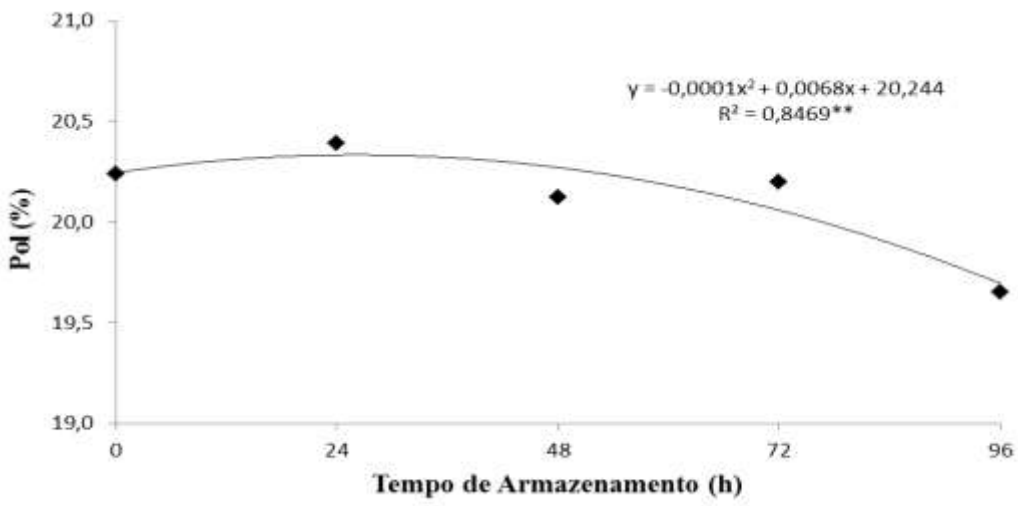

Figura 9 - Porcentagem aparente de sacarose em caldo de cana colhida e armazenada.

A Pureza é um parâmetro que representa a concentração total de sacarose por unidade de sólidos solúveis totais. Podemos verificar através da Figura 10, a ocorrência de redução na Pureza do caldo, proporcional ao período de armazenamento dos colmos de cana. Os maiores níveis de açúcares redutores e acidez, e a consequente diminuição na porcentagem aparente de sacarose, provavelmente contribuíram com a menor disponibilidade de sacarose nos sólidos solúveis, refletindo em redução da Pureza do caldo.

Resultados semelhantes foram encontrados por Rakkiyappan et al. (2009), que verificaram redução na porcentagem aparente de sacarose e na Pureza do caldo, quando colmos de cana foram armazenados, evidenciando que a cana deve ser processada dentro de no máximo 24 – 48 horas, visando a máxima recuperação da sacarose.

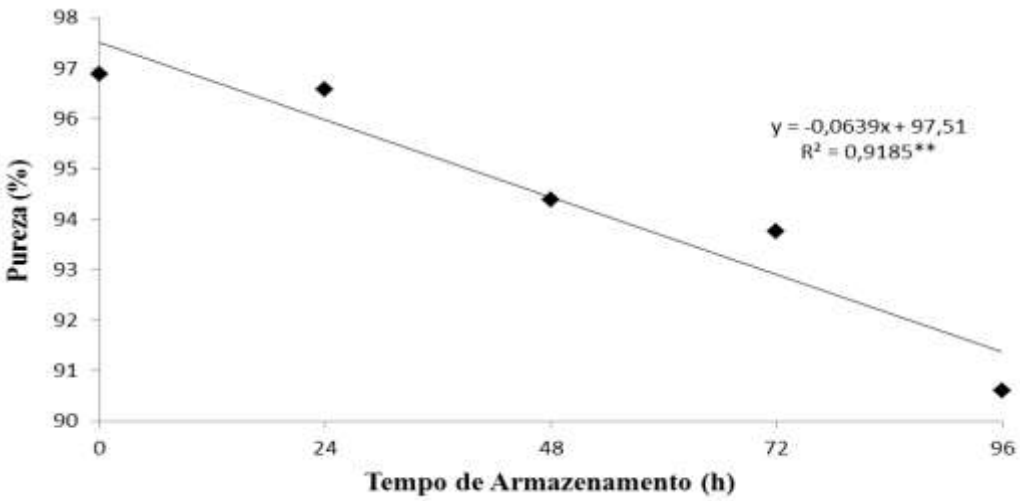

Figura 10 - Porcentagem de Pureza para caldo de cana colhida e armazenada.

O pH do caldo não foi alterado com a extensão do período de armazenamento dos colmos de cana (Figura 11). Provavelmente, a reduzida contagem bacteriana na matéria-prima armazenada contribuiu com valores estáveis de pH do caldo. Diferentemente deste estudo, Krishnakumar, Thamilselvi e Devadas (2013), observaram aumento nos níveis de acidez titulável e consideráveis reduções no pH do caldo, quando colmos de cana foram armazenados a temperatura de 30°C. Estes autores associaram o fato, a produção de ácido lático e acético por bactérias.

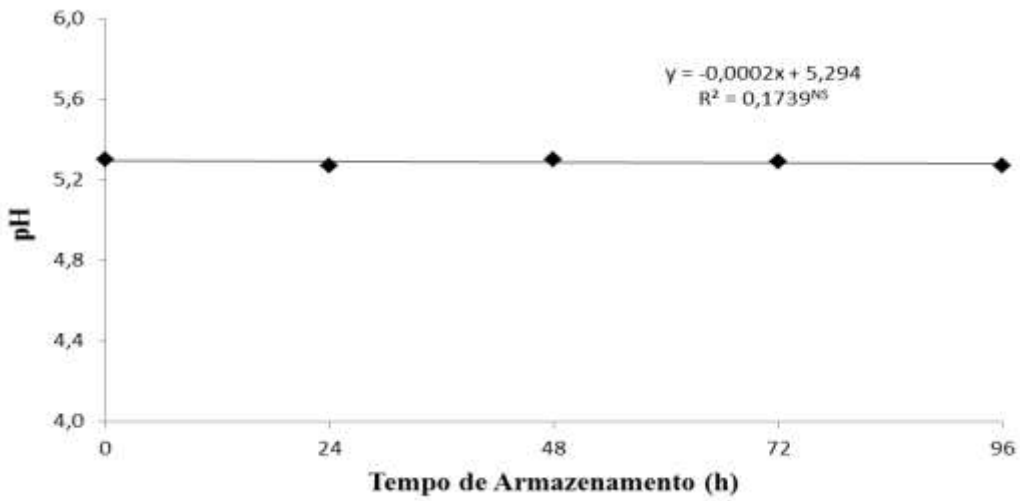

Figura 11 - Valores médios de pH para caldo de cana colhida e armazenada.

A interação entre tratamentos e ciclos para a Pol e Pureza do caldo, demonstrou uma redução destes parâmetros no 3º ciclo para colmos de cana não armazenados, enquanto no 5º ciclo, essa redução foi significativa para colmos armazenados por 48 horas (Figuras 12 e 13). Provavelmente, as características intrínsecas da cana-de-açúcar neste período de coleta, refletiram em alterações na qualidade do caldo para estes tratamentos, entretanto não foram verificadas alterações substanciais dos parâmetros tecnológicos do caldo para os demais ciclos.

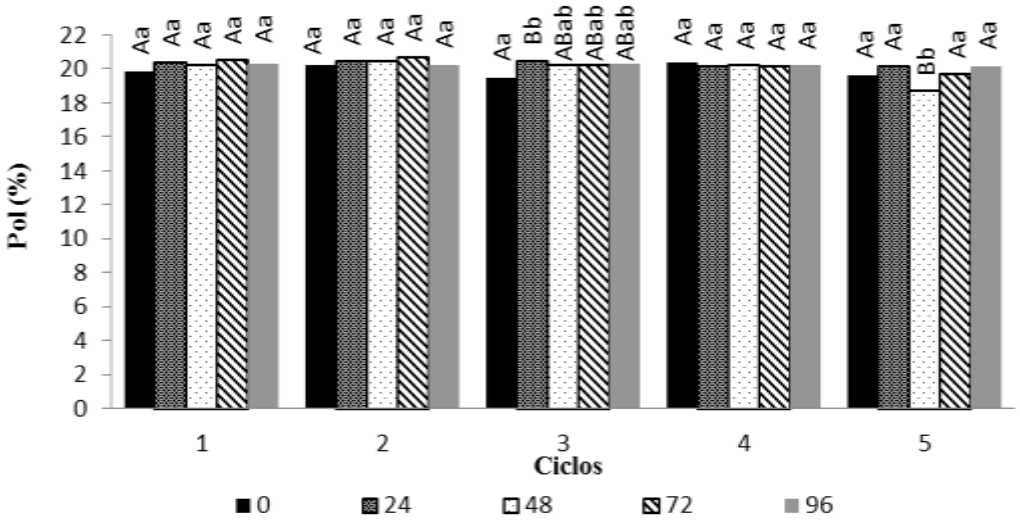

Figura 12 - Desdobramento da interação entre tratamentos e ciclos para a porcentagem aparente de sacarose do caldo ao longo dos ciclos fermentativos. Letras maiúsculas comparam médias entre ciclos com mesmo tratamento. Letras minúsculas comparam médias entre os tratamentos de cada ciclo

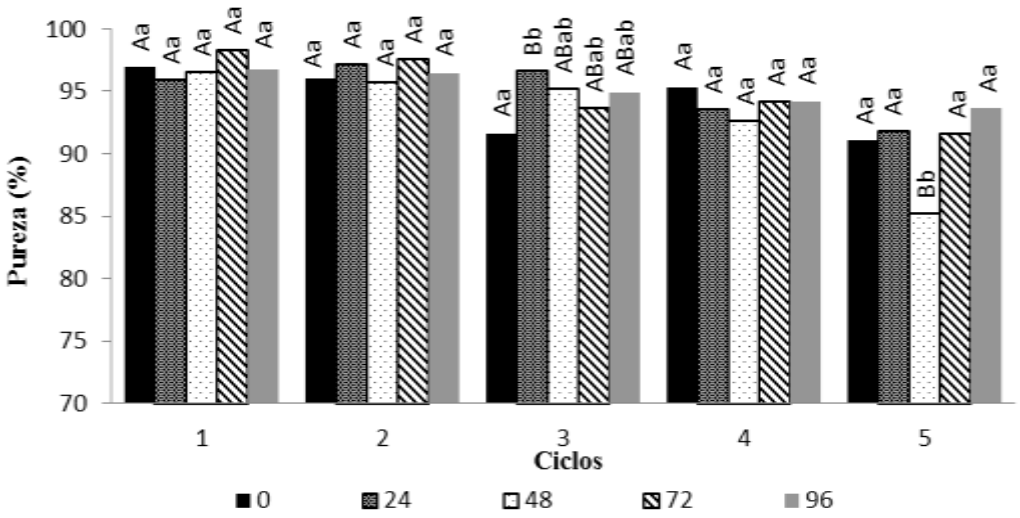

Figura 13 - Desdobramento da interação entre tratamentos e ciclos para a porcentagem de Pureza do caldo ao longo dos ciclos fermentativos. Letras maiúsculas comparam médias entre ciclos com mesmo tratamento. Letras minúsculas comparam médias entre os tratamentos de cada ciclo

Como se pode verificar, houve efeitos significativos nos parâmetros tecnológicos do caldo durante o armazenamento da cana (Tabela 3; Figuras 14, 15 e 16). Os resultados observados para acidez total, açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART), demonstram que o armazenamento dos colmos de cana por períodos superiores a 48 horas proporcionou maiores valores de AR e acidez e menores médias para ART.

Tabela 3 – Resultados da análise de variância (teste F) e teste de Tukey (5% de probabilidade) para acidez total ($gH_2SO_4.L^{-1}$), açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) em caldo de cana colhida e armazenada

Causas de variação	**Acidez ($gH_2SO_4.L^{-1}$)**	**AR (%)**	**ART (%)**
Tempo de armazenamento (A)			
0 h	0,75C	0,31B	20,25A
24 h	0,79BC	0,35B	20,14A
48 h	0,88AB	0,49B	18,77B
72 h	0,91A	0,97A	18,20B
96 h	0,96A	1,58A	17,46C
F	$10,85^{**}$	$56,88^{**}$	$43,78^{**}$
DMS (Tukey)	0,102	0,287	0,74
Ciclos (B)			
1	0,84A	0,66A	18,61A
2	0,84A	0,68A	18,92A
3	0,86A	0,70A	19,18A
4	0,87A	0,83A	19,08A
5	0,88A	0,83A	19,03A
F	$0,63^{NS}$	$1,39^{NS}$	$1,40^{NS}$
DMS (Tukey)	0,102	0,287	0,74
A x B	$0,31^{NS}$	$0,64^{NS}$	$0,99^{NS}$
CV	11,44	37,4	3,75

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ^{ns} = não significativo; * = significativo ao nível de 5%; ** = significativo ao nível de 1%.

Para a acidez total do caldo, foram observados maiores níveis a partir de 72 horas de armazenamento (Figura 14). Resultados semelhantes foram demonstrados por Mao, Que e Wang (2006), ao verificarem aumento na acidez titulável do caldo, proporcional a elevação da temperatura e do período de armazenamento da cana. Verma et al. (2012) também observaram

maiores valores de acidez no caldo, quando colmos de cana foram armazenados a temperatura de 35 – 40°C durante 0 e 120 horas, independentemente da variedade estudada.

O parâmetro acidez total indica a quantidade de ácidos presentes no caldo e pode sinalizar a deterioração ou ainda se a cana-de-açúcar encontra-se em processo de crescimento vegetativo (MADALENO, 2006). Provavelmente, o armazenamento intensificou as alterações fisiológicas nos colmos de cana, contribuindo com o aumento dos processos respiratórios, além de proporcionar condições favoráveis ao crescimento bacteriano, elevando a produção de ácidos orgânicos na matéria-prima.

Convém também ressaltar que a relação entre número de bactérias e produção de ácidos pode não ser direta, uma vez que a produção desses compostos ocorre em função das concentrações e espécies de bactérias presentes no substrato (VENTURA, 2007).

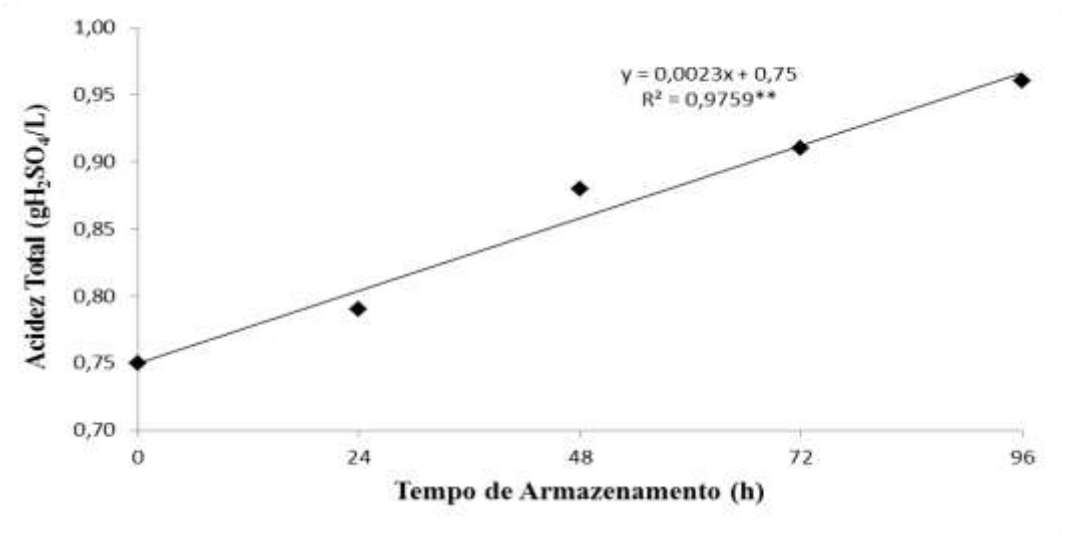

Figura 14 - Níveis de acidez total ($gH_2SO_4.L^{-1}$) em caldo de cana colhida e armazenada.

Foram observadas alterações nas concentrações de açúcares redutores do caldo, durante o período de armazenamento dos colmos de cana, com maiores valores a partir de 72 horas (Figura 15). A extensão do período de armazenamento dos colmos sobre elevadas temperaturas e baixa umidade relativa, podem ser considerados fatores primordiais aos processos de inversão da sacarose, inicialmente ocasionadas pela atividade de invertases endógenas, e posteriormente agravadas pela ação de invertases microbianas.

Solomon et al. (1990) apud Solomon et al. (2009), encontraram aumento nos níveis de açúcares redutores no caldo, proporcionais a elevação da atividade de invertases na cana armazenada por períodos superiores a 72 horas. Segundo Bathia et al. (2009) e Verma et al. (2012), a sacarose torna-se mais susceptível aos processos de inversão sob condições de

elevadas temperaturas de armazenamento, resultando em acréscimo nos níveis de açúcares redutores e redução na porcentagem de sacarose no caldo.

Invertases endógenas são ativadas imediatamente após a colheita, devido à rápida perda de umidade, decorrentes das alterações nos mecanismos de controle fisiológicos e bioquímicos da planta (EGGLESTON; LEGENDRE, 2003).

Verificou-se no presente estudo, uma correlação positiva entre os níveis de acidez e a porcentagem de açúcares redutores no caldo, após 72 horas de armazenamento. Embora, esta pesquisa não tenha avaliado a atividade enzimática, acredita-se que os maiores índices de acidez e a perda de umidade dos colmos, favoreceram a atividade de invertases ácidas, que em conjunto com as enzimas de origem microbiana, intensificaram os processos de inversão da sacarose nos colmos de cana armazenados.

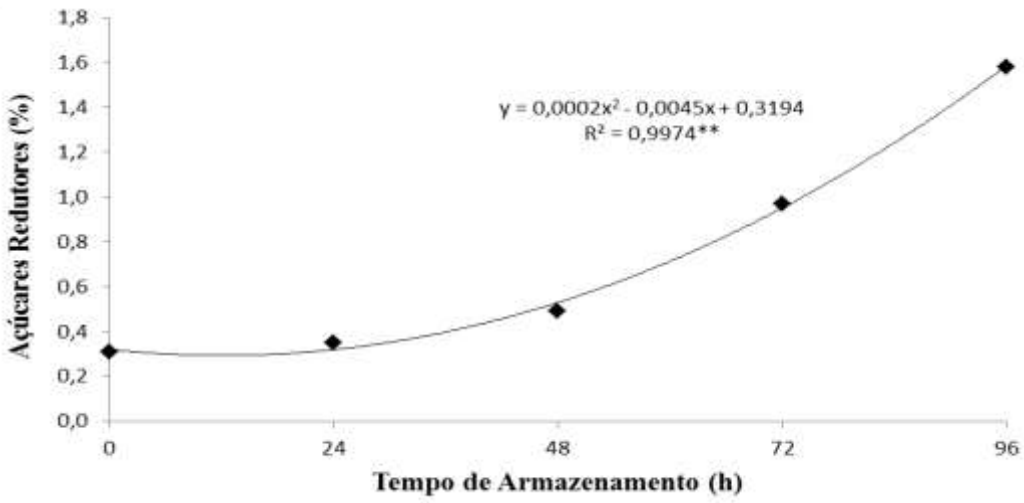

Figura 15 - Porcentagem de açúcares redutores em caldo de cana colhida e armazenada.

Os resultados obtidos e submetidos a análise de variância para açúcares redutores totais do caldo, indicaram diferenças significativas ($P<0,01$), com reduções expressivas durante o armazenamento da cana (Tabela 3; Figura 16). O decréscimo na concentração de açúcares redutores totais e na porcentagem aparente de sacarose demonstra que, parte dos açúcares da matéria-prima armazenada foi constantemente utilizada na manutenção do seu estado fisiológico e outra parte destinada ao desenvolvimento de micro-organismos. Tal fato pode ser comprovado, pelos maiores níveis de acidez total e açúcares redutores na cana armazenada.

Mao, Que e Wang (2006) evidenciaram que durante o armazenamento da cana-de-açúcar, fontes de carbono originadas de moléculas de sacarose são redirecionadas para formação de açúcares redutores e ácidos orgânicos, utilizados como substrato aos processos

respiratórios. Os micro-organismos presentes na cana-de-açúcar, também utilizam os carboidratos disponíveis como fonte de energia para seu crescimento e metabolismo, reduzindo inevitavelmente o conteúdo de carboidratos (SUMAN et al., 2000).

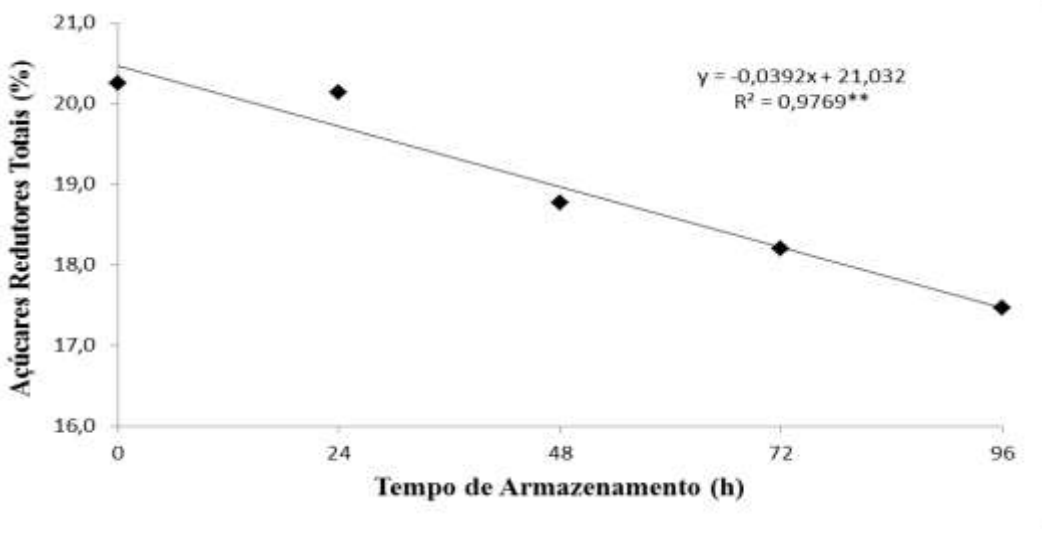

Figura 16 - Porcentagem de açúcares redutores totais em caldo de cana colhida e armazenada.

4.1.3 Avaliações microbiológicas do caldo

Para as análises microbiológicas do caldo, observaram-se diferenças significativas do Teste F para as contagens de micro-organismos cultivados em meio MRS, WLN e WLD durante o armazenamento dos colmos. As contagens de micro-organismos totais (PCA) e Leveduras não-*Saccharomyces* e não-*Saccharomyces cerevisiae* (LWYM) não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey para os tratamentos avaliados (Tabela 4).

Durante os ciclos fermentativos, verificou-se um aumento nas contagens de micro-organismos em meio PCA, WLN, WLD e LWYM, diferindo estatisticamente pelo teste de Tukey (P=0,05) (Tabela 4).

Uma diversidade de micro-organismos pode ser encontrada na cana-de-açúcar, sendo o grau de contaminação dependente da sanidade da cultura, das práticas de colheita, da temperatura e das condições de armazenamento (JAMES; OLIVARES, 1997; TAIZ; ZEIGER, 2004; WATT; CRAMER, 2009). No presente estudo verificou-se a grande variabilidade de micro-organismos existentes na cana colhida e armazenada, provavelmente influenciada pelas características intrínsecas da matéria-prima e condições de armazenamento.

Tabela 4 – Resultados da análise de variância (teste F) e teste de Tukey (5% de probabilidade) para as contagens de micro-organismos no caldo (UFC.mL^{-1}), sobre cultivo em meio PCA, MRS, WLN, WLD e LWYM

Causas de variação	**PCA**	**MRS**	**WLN**	**WLD**	**LWYM**
Tempo de armazenamento (A)					
0 h	5,35A	3,22B	4,03AB	3,95A	3,72A
24 h	5,39A	3,28B	3,97B	3,88AB	3,76A
48 h	5,43A	3,40AB	3,97B	3,76AB	3,79A
72 h	5,39A	3,60A	4,01B	3,73B	3,79A
96 h	5,40A	3,63A	4,20A	3,75AB	3,84A
F	1,03^{NS}	7,26**	4,59**	3,55*	0,66^{NS}
DMS (Tukey)	0,112	0,27	0,18	0,21	0,214
Ciclos (B)					
1	5,23C	3,33A	3,93B	3,75B	3,66B
2	5,28BC	3,42A	4,04AB	3,79AB	3,82AB
3	5,37B	3,44A	4,03AB	3,74B	3,76AB
4	5,58A	3,44A	3,98B	3,81AB	3,76AB
5	5,50A	3,50A	4,20A	3,98A	3,92A
F	28,62**	0,76^{NS}	5,27**	3,53*	3,06*
DMS (Tukey)	0,112	0,27	0,18	0,21	0,214
A x B	1,80^{NS}	0,36^{NS}	1,31^{NS}	1,53^{NS}	1,34^{NS}
CV	2,01	7,83	4,25	5,24	5,48

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ^{ns} = não significativo; * = significativo ao nível de 5%; ** = significativo ao nível de 1%; PCA = micro-organismos totais (10^4UFC.mL^{-1}); MRS = bactérias láticas (10^2UFC.mL^{-1}); WLN = leveduras totais (10^3UFC.mL^{-1}); WLD = leveduras não-*Saccharomyces* (10^2UFC.mL^{-1}); LWYM = leveduras não-*Sacharomyces* e não-*Sacharomyces cerevisiae* (10^3UFC.mL^{-1}).

Para as contagens de micro-organismos totais em caldo diluído a 10^{-3} e inoculado em meio PCA, não houve diferenças significativas ao longo do período de armazenamento dos colmos de cana para tratamentos (Figura 17).

Um número considerável de micro-organismos podem se desenvolver, quando os mecanismos de manutenção celular são interrompidos em decorrência da colheita. Esta situação pode ser agravada com a extensão do período entre colheita e processamento da cana. Neste estudo, podemos verificar a existência de um equilíbrio entre o crescimento de

bactérias, fungos e leveduras na matéria-prima, resultando em contagens de microrganismos totais constantes durante o armazenamento da cana.

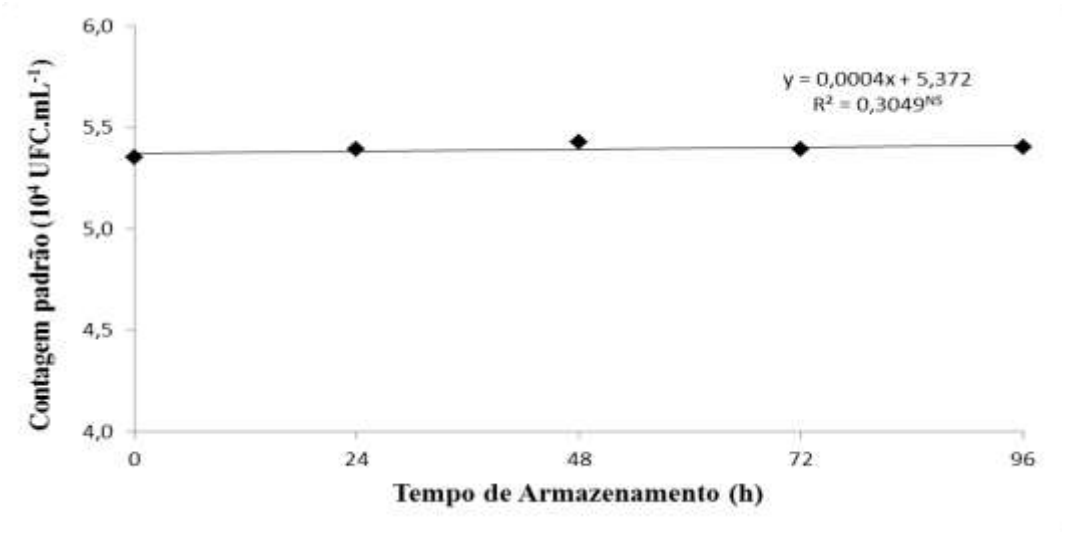

Figura 17 - Contagem padrão de micro-organismos totais ($UFC.mL^{-1}$) em caldo de cana colhida e armazenada.

Podemos verificar que o número de bactérias láticas no caldo diluído a 10^{-1}, sob cultivo em meio MRS, aumentou significativamente com a extensão do período de armazenamento, com multiplicação mais intensa a partir de 48 horas (Figura 18). Embora a concentração de bactérias láticas na matéria-prima armazenada esteja a níveis relativamente baixos, verificou-se que estes micro-organismos encontraram condições favoráveis ao seu desenvolvimento, devido às características adequadas da matéria-prima.

Suman et al. (2000), verificaram que o armazenamento da cana durante 10 dias a temperatura de 20 – 25°C, proporcionaram condições adequadas ao desenvolvimento de diferentes colônias de bactérias, resultando em consumo de carboidratos, elevação nos níveis de açúcares redutores e redução do pH do caldo. Assim, verificou-se que mesmo em baixas concentrações, as bactérias láticas contribuíram com a menor qualidade tecnológica dos colmos de cana armazenados por períodos superiores a 48 horas.

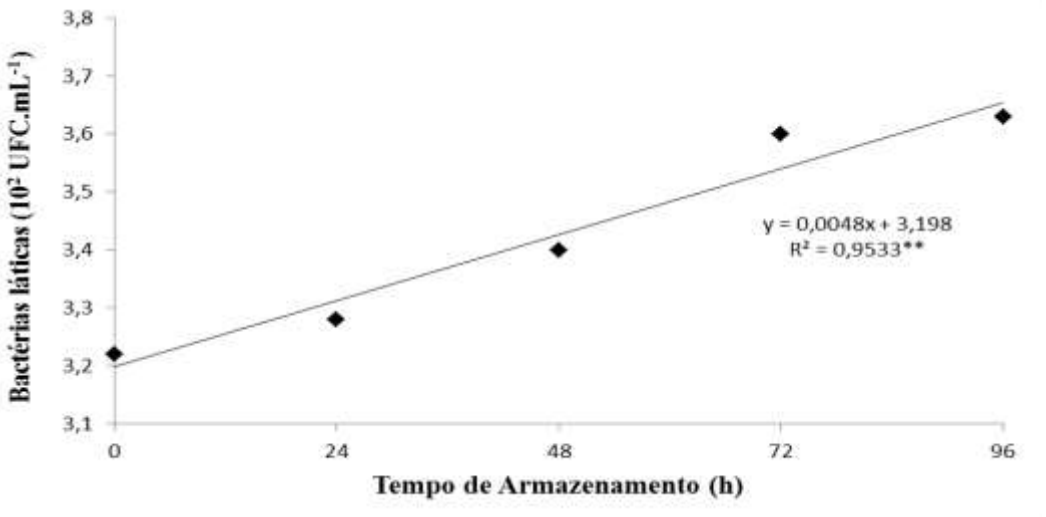

Figura 18 - Bactérias láticas (UFC.mL^{-1}) em caldo de cana colhida e armazenada.

Os resultados da análise de variância para o plaqueamento do caldo diluído a 10^{-2} em meio WLN, demonstraram diferenças significativas entre tratamentos, com maiores contagens nos períodos de 0 e 96 horas de armazenamento. Observou-se que entre os períodos de 24 e 72 horas a concentração de leveduras totais se manteve menor e constante, com aumento significativo após 96 horas (Figura 19).

Krishnakumar, Thamilselvi e Devadas (2013) e Yusof, Shian e Osman (2000), verificaram que as contagens de leveduras no caldo foram significativamente aumentadas após o 6° dia de armazenamento da cana a temperatura próxima de 30°C. Os resultados do presente estudo demonstraram que a população de leveduras naturais se manteve constante durante o armazenamento, sendo posteriormente aumentada após 72 horas. Isso provavelmente ocorreu devido a melhor competição destes micro-organismos pelos nutrientes e substratos do meio, proporcionando condições favoráveis ao seu crescimento e multiplicação.

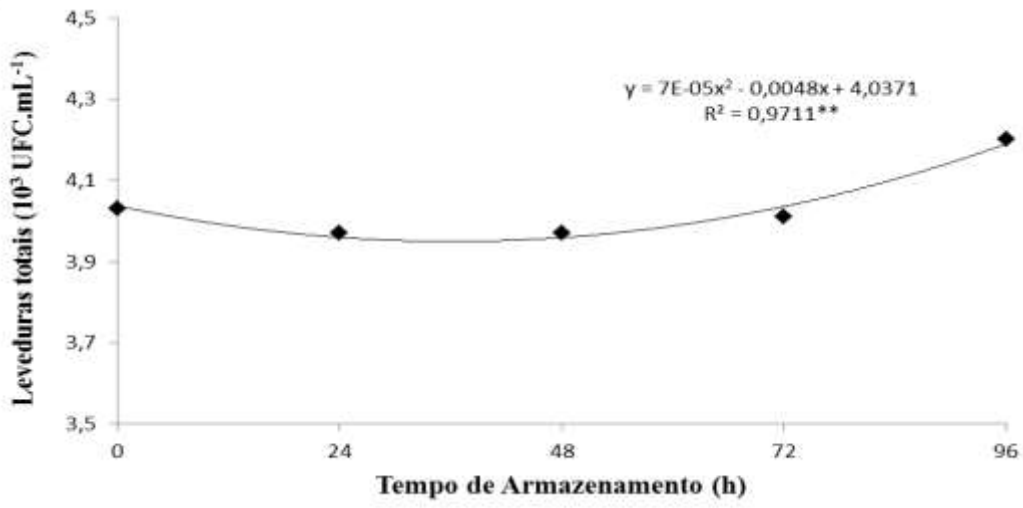

Figura 19 - Leveduras totais (UFC.mL^{-1}) em caldo de cana colhida e armazenada.

Para o plaqueamento do caldo em meio WLD, diluído a 10^{-1} houve diferenças significativas para tratamentos a nível de 5% de significância (Tabela 4; Figura 20). Observou-se que a concentração de leveduras não-*Saccharomyces* foram maiores no caldo recém-extraído, com consequente redução ao longo do período de armazenamento, entretanto, apresentou diferenças significativas apenas em canas armazenadas por 72 horas.

Observou-se um declínio na população de leveduras não-*Saccharomyces* até 72 horas de armazenamento, e posterior aumento após este período. Possivelmente, estas leveduras se adaptaram as características intrínsecas da cana no decorrer do armazenamento, criando mecanismos de sobrevivência, capazes de se sobressaírem perante outros micro-organismos.

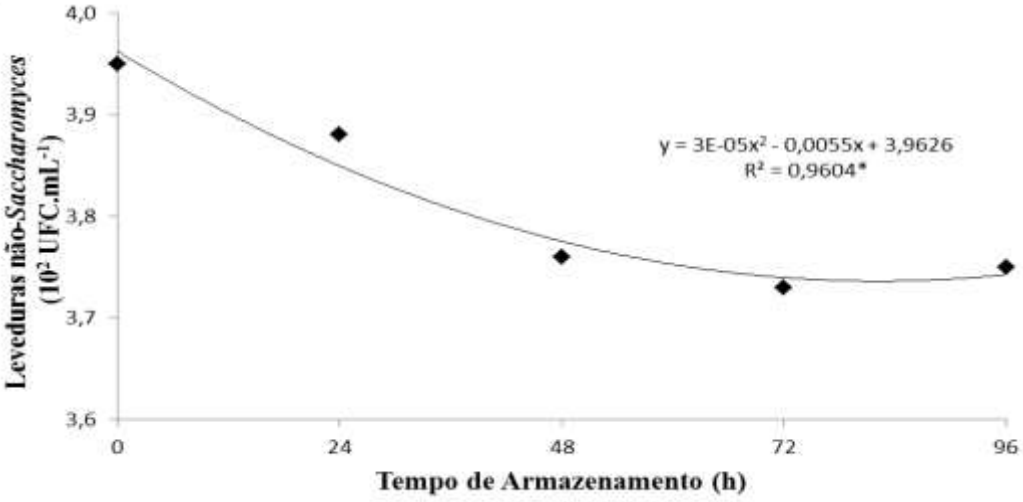

Figura 20 - Leveduras não-*Saccharomyces* (UFC.mL^{-1}) em caldo de cana colhida e armazenada.

Para as amostras de caldo plaqueadas em meio LWYM, diluído a 10^{-2}, não foram constatadas diferenças significativas para tratamentos (Figura 21). A população de leveduras não pertencentes a espécie *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces cerevisiae* permaneceram constantes durante o armazenamento dos colmos de cana, mostrando que as espécies do gênero *Saccharomyces*, com exceção das *S. cerevisiae*, possibilitaram a manutenção da contagem de leveduras em meio LWYM durante o armazenamento.

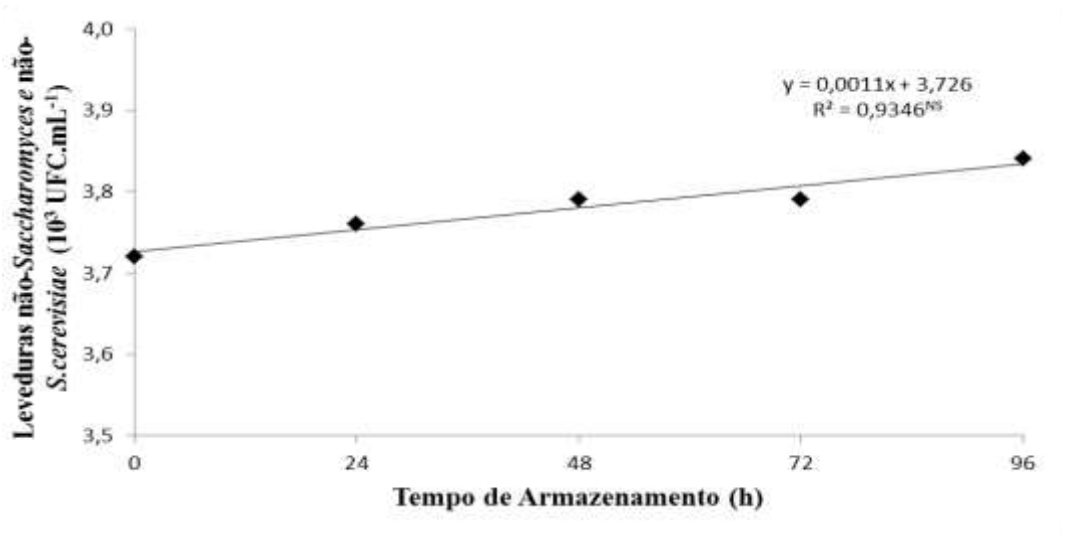

Figura 21 - Leveduras não-*Saccharomyces* e não-*Saccharomyces cerevisiae* (UFC.mL^{-1}) em caldo de cana colhida e armazenada.

4.2 Monitoramento do Processo Fermentativo

4.2.1 Características microbiológicas da fermentação alcoólica

O monitoramento da fermentação foi realizado através das análises microbiológicas do vinho, avaliando-se a viabilidade celular, a viabilidade de brotos e o índice de brotamento no início do processo. Para viabilidade celular e de brotos, verificou-se diferenças significativas pelo teste de Tukey (P=0,05), enquanto os índices de brotamento, embora menores, não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 5).

Para ciclos, verificaram-se diferenças significativas, com redução em todos os parâmetros durante a reciclagem das células. Observou-se também, a existência de interação entre tratamentos e ciclos para viabilidade de brotos, indicando que a manutenção celular foi comprometida durante os ciclos (Tabela 5).

Tabela 5 – Resultados da análise de variância (teste F) e teste de Tukey (5% de probabilidade) para médias de viabilidade celular, viabilidade de brotos e índice de brotamento no início do processo fermentativo

Causas de variação	**Viabilidade celular (%)**	**Viabilidade de brotos (%)**	**Índice de brotamento (%)**
Tempo de armazenamento (A)			
0 h	96,74A	91,61A	11,13A
24 h	95,99AB	86,64AB	10,01A
48 h	94,89B	82,06BC	8,67A
72 h	93,11C	78,20CD	7,35A
96 h	92,57C	71,52D	8,12A
F	18,85*	20,76*	2,39NS
DMS (Tukey)	1,66	6,78	3,91
Ciclos (B)			
1	96,94A	92,29A	13,11A
2	95,23B	86,48A	10,79AB
3	93,31C	78,99B	8,08BC
4	94,46BC	78,25B	7,18BC
5	93,37C	74,03B	6,11C
F	13,17*	18,54*	8,54*
DMS (Tukey)	1,66	6,78	3,91
A x B	0,49NS	2,51*	0,261NS
CV	1,70	8,0	41,79

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns = não significativo; * = significativo ao nível de 5%; ** = significativo ao nível de 1%.

Para viabilidade celular, verificaram-se menores índices em fermentações conduzidas com mosto de cana armazenada, com reduções mais significativas em períodos de armazenamento superiores há 72 horas (Figura 22). Apesar de reduzida, a viabilidade permaneceu em níveis superiores a 85%, mesmo assim, evidenciaram-se os reflexos negativos da qualidade dos colmos de cana armazenados sobre o desempenho da microbiota fermentativa.

A redução da viabilidade celular das leveduras está associada a diversos fatores, dentre eles, a disponibilidade de nutrientes e a presença de contaminantes decorrentes da matéria-prima deteriorada. Alguns pesquisadores demonstram que, a perda de qualidade da matéria-prima é um dos principais aspectos responsáveis pela redução da viabilidade celular de

S.cerevisiae em fermentações do caldo de cana (GARCIA et al., 2010; RAVANELI et al., 2011; RAVANELI et al., 2006).

A presença de biomoléculas durante as fermentações do mosto, com destaque nos compostos fenólicos, ácidos e contaminantes, pode causar estresse nas leveduras (AMORIM; BASSO; ALVES, 1996) promovendo alterações metabólicas nas células e inibição do processo fermentativo. A presença de metabólitos indesejáveis na cana-de-açúcar, associados à produção de compostos tóxicos durante as fermentações, podem comprometer as leveduras, resultando em perdas de viabilidade e redução na eficiência industrial (OKOLO; JOHNSTON; BERRY, 1987).

Acredita-se que a menor qualidade tecnológica do caldo, provenientes das alterações fisiológicas dos colmos de cana armazenados, são fatores que podem contribuir com a elevação de contaminantes no fermento reciclado, ocasionando desvios na condução do processo fermentativo, através do comprometimento das leveduras.

A etapa de recuperação do fermento, denominada "pé-de-cuba", é extremamente importante, pois desta, dependerá o ciclo de fermentação posterior. Quando este inóculo apresenta-se sob condições inadequadas, podemos ter um comprometimento de todo o processo fermentativo (GONÇALVES, 2003).

Verificou-se que a viabilidade celular é um importante parâmetro para interpretação do comportamento das células em uma determinada condição de processo, indicando neste estudo, que a utilização de matéria-prima armazenada por períodos superiores a 48 horas, contribui negativamente com a atividade das leveduras em fermentações destinadas a produção de cachaça.

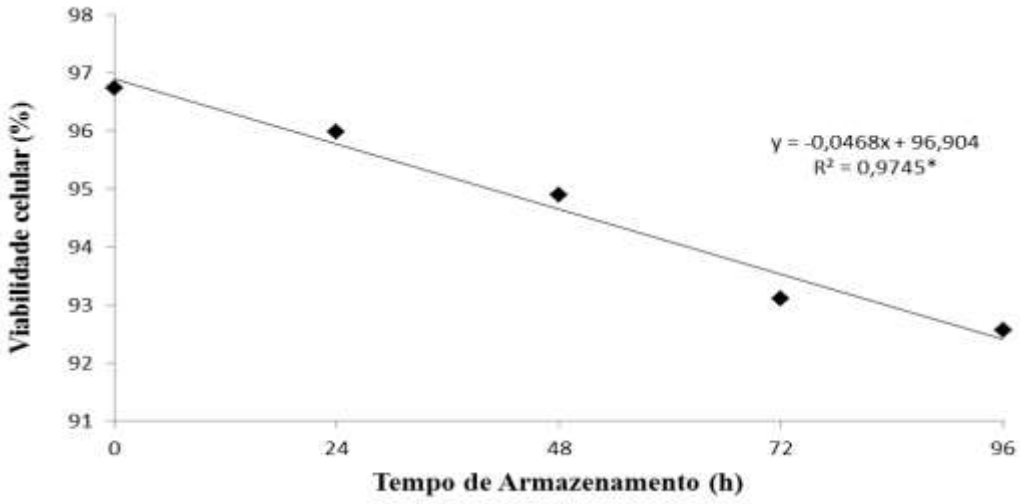

Figura 22 - Valores médios de viabilidade celular de leveduras (%) em fermentações conduzidas com caldo de cana colhida e armazenada.

Semelhante à viabilidade celular, podemos observar uma redução significativa na viabilidade de brotos em fermentações conduzidas com mosto de cana armazenada. No início do processo fermentativo, os índices mantiveram-se sempre a níveis elevados para as fermentações conduzidas com mosto de cana não armazenada. A utilização de matéria-prima deteriorada refletiu consideravelmente na manutenção de brotos viáveis, alcançando valores próximos a 70%, quando colmos de cana armazenados por 96 horas foram utilizados no preparo do mosto (Figura 23).

A redução no número de brotos viáveis pode estar relacionada com o aumento da população de bactérias e leveduras selvagens no fermento reciclado, e consequente produção de ácidos orgânicos, decorrentes dos colmos de cana armazenados. A menor disponibilidade de açúcares na matéria-prima armazenada, também pode ter contribuído com a maior competição pelo substrato do meio, refletindo em condições de estresse ao inóculo.

A duração da fase *lag* de crescimento microbiano é proporcional ao aumento da concentração de ácidos fracos, que reflete na capacidade das leveduras em bombear o excesso de prótons requeridos para manutenção do pH intracelular, responsável pela regulação do crescimento (LAMBERT; STRATFORD, 1999). Os maiores níveis de acidez podem ter contribuído com o aumento do período de adaptação do inóculo, as condições físicas e aos nutrientes do meio, afetando as taxas de crescimento e a velocidade específica de conversão do substrato em biomassa.

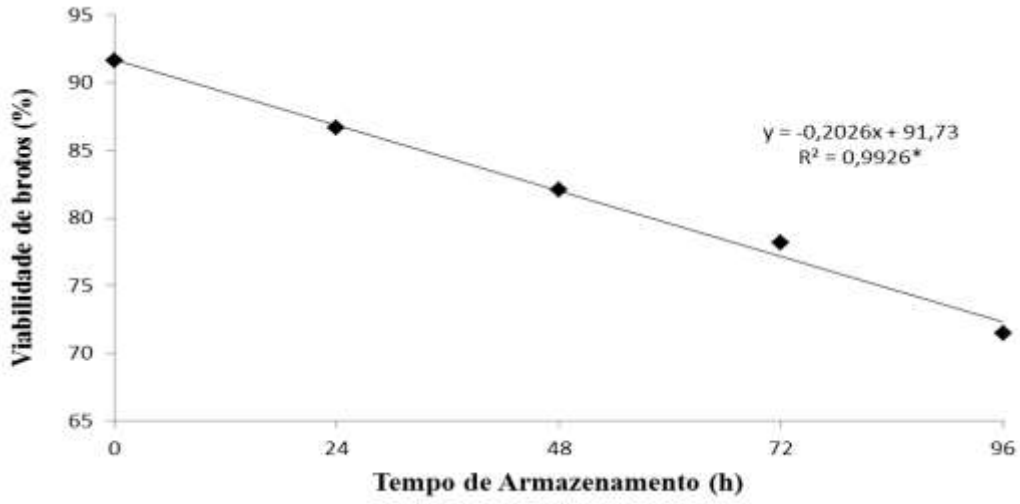

Figura 23 - Valores médios de viabilidade de brotos (%) em fermentações conduzidas com caldo de cana colhida e armazenada.

Observou-se significativa redução na viabilidade de brotos quando se analisou a reutilização do fermento nos ciclos (Figura 24). As fermentações conduzidas com mosto de cana colhida e armazenada por até 24 horas permitiram uma melhor manutenção de brotos viáveis durante os ciclos. Para os demais tratamentos, podemos observar reduções significativas, principalmente após o 3° ciclo, onde foi registrado um decréscimo de 33%, em fermentações do caldo de cana armazenada por 96 horas.

No decorrer dos ciclos as viabilidades de brotos foram reduzidas para os tratamentos com colmos de cana armazenados, possivelmente pela composição do meio em que se encontrava a levedura ao final do processo. A maior concentração de bactérias láticas e leveduras selvagens nas fermentações do mosto, e a consequente elevação nos níveis de acidez, favorecem e facilitam o comprometimento das leveduras ao longo dos ciclos fermentativos.

Em condições normais, essa redução ocorre, porém sem interferir na condução da fermentação e na viabilidade celular das leveduras (MUTTON, 1998). Considerando-se que as leveduras são reutilizadas em ciclos fermentativos posteriores, é de extrema importância a manutenção de células e brotos viáveis até o final da fermentação, sendo fundamental a utilização de matéria-prima de qualidade, visando criar um ambiente favorável ao seu metabolismo.

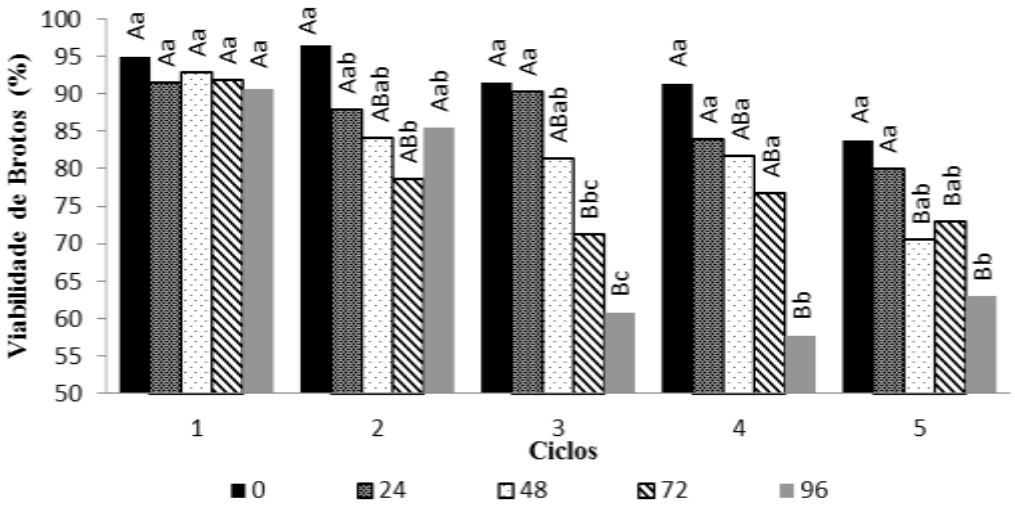

Figura 24 - Desdobramento da interação entre tratamentos e ciclos para viabilidade celular de brotos no inicio do processo fermentativo. Letras maiúsculas comparam médias entre ciclos com mesmo tratamento. Letras minúsculas comparam médias entre os tratamentos de cada ciclo

Embora os índices de brotamento tenham sofrido uma redução para tratamentos, não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey (P=0,05), indicando que mesmo com a deterioração da qualidade do caldo as células de leveduras mantiveram um

brotamento constante, porém a viabilidade destes brotos ao longo dos ciclos foi comprometida (Tabela 5; Figura 25). Amorim, Basso e Alves (1996) relatam que a porcentagem ideal de brotamentos varia entre 5 a 15%, sendo que valores superiores podem ser indicativos de aumento da temperatura ou baixa manutenção do fermento nas dornas.

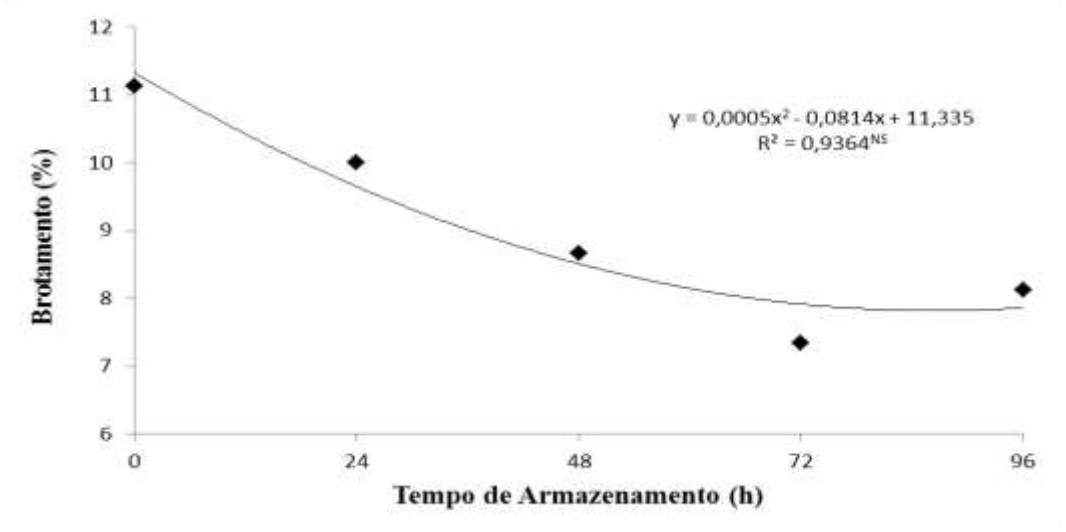

Figura 25 - Valores médios de índice de brotamento (%) em fermentações conduzidas com caldo de cana colhida e armazenada.

4.2.2 Características microbiológicas do fermento

Diferenças significativas foram encontradas através da análise de variância para as contagens de micro-organismos no fermento, em meio PCA, MRS, WLN e WLD, enquanto as concentrações de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces cerevisiae* (LWYM) não diferiram estatisticamente para os tratamentos avaliados. Durante a reciclagem de células, observaram-se reduções nas contagens de micro-organismos, exceto para a população de bactérias, que foi aumentada ao longo dos ciclos, principalmente após o terceiro reciclo (Tabela 6).

Tabela 6 – Resultados da análise de variância (teste F) e teste de Tukey (5% de probabilidade) para as contagens de micro-organismos no fermento (UFC.mL^{-1}), sobre cultivo em meio PCA, MRS, WLN, WLD e LWYM

Causas de variação	**PCA**	**MRS**	**WLN**	**WLD**	**LWYM**
Tempo de armazenamento (A)					
0 h	8,90A	5,44B	8,94A	3,85C	8,73A
24 h	8,87A	5,55AB	8,91A	3,94ABC	8,79A
48 h	8,89A	5,63AB	8,92A	3,92BC	8,76A
72 h	8,86A	5,69AB	8,92A	3,99AB	8,76A
96 h	8,74B	5,78A	8,74B	4,05A	8,73A
F	13,11*	2,40*	22,40*	5,57*	0,56^{NS}
DMS (Tukey)	0,072	0,33	0,07	0,13	0,15
Ciclos (B)					
1	9,00A	4,69C	9,06A	4,32A	9,01A
2	8,97A	5,33B	8,98B	4,21A	8,86AB
3	8,81B	5,98A	8,86C	3,77B	8,80B
4	8,76BC	6,02A	8,80C	3,73B	8,58C
5	8,73C	6,08A	8,73D	3,71B	8,52C
F	47,24*	51,84*	59,21*	88,39*	27,26*
DMS (Tukey)	0,072	0,33	0,07	0,13	0,15
A x B	1,68^{NS}	0,15^{NS}	1,09^{NS}	0,47^{NS}	0,67^{NS}
CV	0,78	5,78	0,76	3,08	1,71

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ^{ns} = não significativo; * = significativo ao nível de 5%; ** = significativo ao nível de 1%; PCA = micro-organismos totais (10^{7}UFC.mL^{-1}); MRS = bactérias láticas (10^{4}UFC.mL^{-1}); WLN = leveduras totais (10^{7}UFC.mL^{-1}); WLD = leveduras não-*Saccharomyces* (10^{2}UFC.mL^{-1}); LWYM = leveduras não-*Sacharomyces* e não-*Sacharomyces cerevisiae* (10^{6}UFC.mL^{-1}).

Os resultados da análise de variância para o plaqueamento do fermento, diluído a 10^{-6}, e plaqueado em meio PCA, demonstraram diferenças significativas para tratamentos (Figura 26). A população de micro-organismos totais no pé-de-cuba manteve-se praticamente constante nas fermentações conduzidas com mosto de cana armazenada entre 0 e 72 horas, com redução significativa para o período de 96 horas de armazenamento.

A redução na concentração de micro-organismos totais no fermento pode ser reflexo da menor contagem de leveduras durante a recirculação de células. Embora a população de bactérias tenha aumentado, as leveduras encontravam-se em maiores proporções no pé-de-cuba, predominando nas contagens de micro-organismos cultivados em meio PCA.

As condições de estresse proporcionadas as leveduras, referentes a maior produção de ácidos pela utilização de matéria-prima de baixa qualidade, contribuiu com a redução da microbiota fermentativa durante as fermentações do mosto.

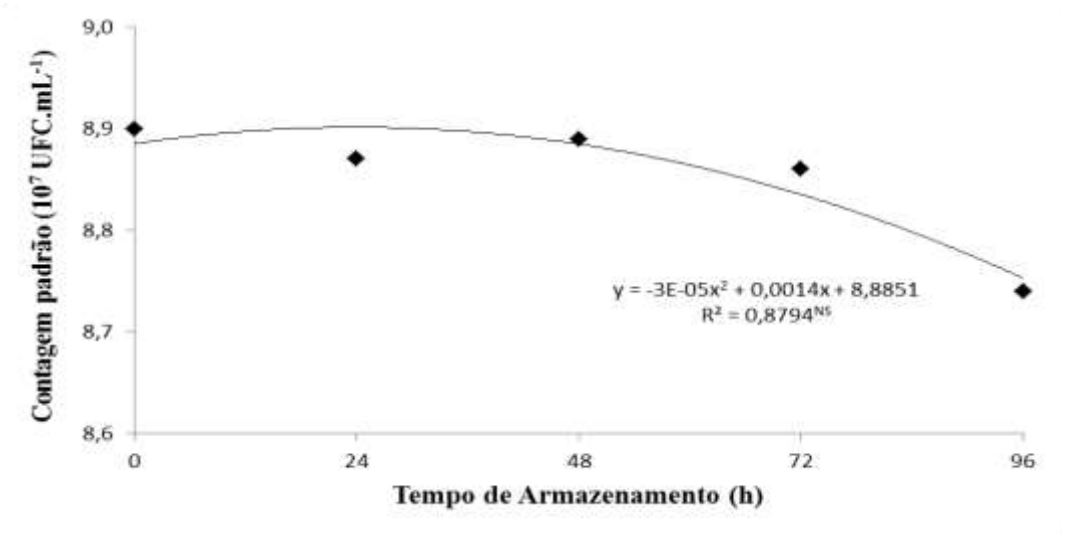

Figura 26 - Contagem padrão de micro-organismos totais ($UFC.mL^{-1}$) reciclados no fermento para tratamentos.

A análise de variância demonstra que as contagens de bactérias láticas no fermento diluído a 10^{-3}, diferiram estatisticamente entre si para os tratamentos estudados (Figura 27). Verificou-se um aumento significativo na concentração de bactérias recicladas com o fermento, proporcional a extensão do período de armazenamento dos colmos de cana. A qualidade da matéria-prima empregada no processo contribuiu decisivamente com a elevação da carga de contaminantes durante as fermentações do mosto.

Contagens bacterianas entre 10^6 - 10^8 $UFC.mL^{-1}$ são consideradas elevadas para fermentações alcoólicas, podendo ocasionar complicações no processo, resultando em competição entre leveduras e bactérias pelos substratos do meio, produção de ácidos orgânicos e gomas, redução da viabilidade das leveduras e menores rendimentos (NARENDRANATH et al., 1997; OLIVA-NETO; YOKOYA, 2001).

Embora, os níveis de bactérias no fermento reciclado sejam baixos (10^4 $UFC.mL^{-1}$), verificou-se que estes micro-organismos provavelmente contribuíram com a redução da viabilidade das leveduras em fermentações conduzidas com colmos de cana armazenados por 72 e 96 horas. A redução na viabilidade das leveduras aumentam os riscos de contaminação durante as fermentações, devido à presença de vitaminas e aminoácidos provenientes das células hidrolisadas, que atuam como fontes de nutrientes para as bactérias (AMORIM, 2005).

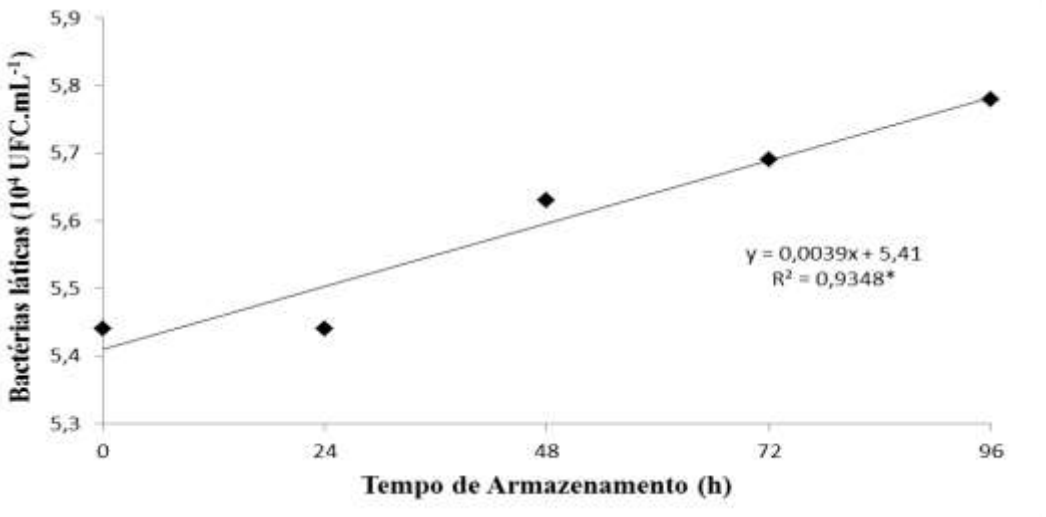

Figura 27 - Bactérias láticas (UFC.mL^{-1}) recicladas no fermento para tratamentos.

Para pé-de-cuba diluído a 10^{-6} e plaqueado em meio WLN, próprio para o crescimento de leveduras, a análise de variância do número de UFC.mL^{-1} revelou a existência de diferenças significativas para tratamentos e ciclos ($P<0,01$) (Tabela 6; Figura 28).

Observou-se um decréscimo na concentração de leveduras totais em fermentações conduzidas com mosto de cana armazenada por 96 horas, demonstrando que a deterioração da matéria-prima refletiu em condições desfavoráveis ao seu desenvolvimento. A maior concentração de bactérias e leveduras selvagens no fermento reciclado, pode ter ocasionado estresse ao inóculo, reduzindo o número de células viáveis, como foi observado quando se avaliou a viabilidade celular.

Nas fermentações destinadas a produção de bebidas alcoólicas, é interessante a persistência de linhagens de *S.cerevisiae* não somente produtoras de etanol, mas também de outros compostos, oriundos do metabolismo secundário das leveduras, como glicerol, ésteres, álcoois, dentre outros (LURTON et al., 1995). A manutenção de números viáveis de leveduras durante as fermentações é de extrema importância, visando a produção adequada dos compostos químicos responsáveis pelas características aromáticas do destilado. Assim, verificou-se a importância da utilização de matéria-prima de qualidade nos processos de industrialização da cachaça.

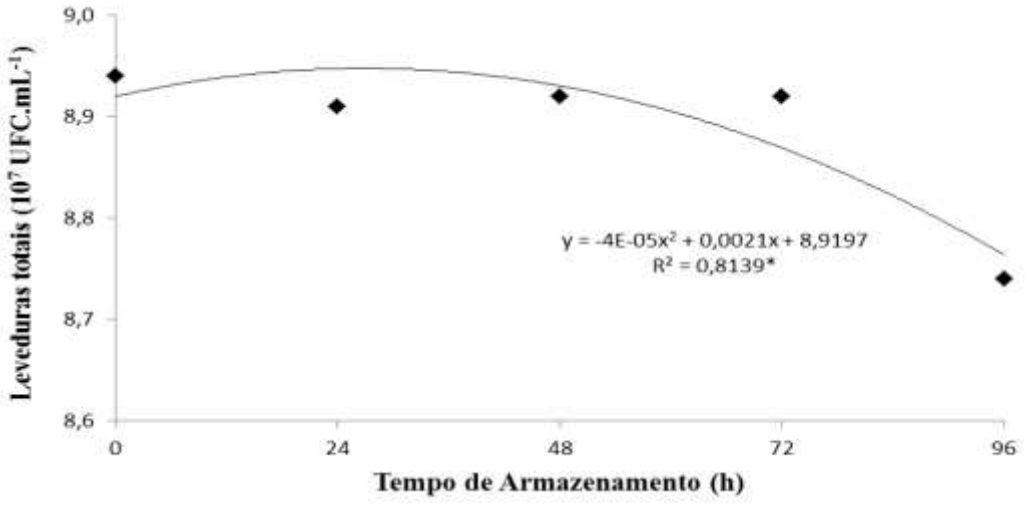

Figura 28 - Leveduras totais (UFC.mL^{-1}) recicladas no fermento para tratamentos.

A análise de variância para as contagens de leveduras não-*Saccharomyces* no fermento diluído a 10^{-1} e plaqueado em meio WLD, revelaram a existência de diferenças significativas para tratamentos e ciclos ($P<0,01$) (Tabela 6; Figura 29). As concentrações de leveduras não-*Saccharomyces* no pé-de-cuba, aumentaram significativamente em fermentações conduzidas com mosto de cana armazenada. Para ciclos, observou-se uma redução na população destas leveduras, provavelmente decorrente do reciclo de células.

As fermentações conduzidas com mosto de cana armazenada proporcionaram condições mais favoráveis ao metabolismo das leveduras não-*Saccharomyces*. Gabriel et al. (2012), observaram elevação e posterior redução no número de leveduras selvagens no fermento natural, e aumento e estabilização no fermento comercial, durante três ciclos fermentativos. Estes pesquisadores atribuíram o fato, a introdução de linhagens selvagens no processo, decorrentes de novas alimentações de caldo.

Embora as contagens destes micro-organismos tenham sido menores na matéria-prima armazenada, verificou-se que o armazenamento dos colmos de cana, contribuiu com a elevação da população de leveduras não-*Saccharomyces* no fermento reciclado. Possivelmente, o desenvolvimento destas leveduras foi favorecido pelas características tecnológicas da fermentação. O comportamento das diferentes espécies de *S. cerevisiae* e não-*Saccharomyces* é diretamente afetado pelo substrato, taxa de inoculação, espécies de leveduras e interação entre espécies (DUARTE; AMORIM; SCHWAN, 2013).

Oliveira et al. (2004), observaram que as espécies não-*Saccharomyces* podem ocasionar maior formação de ácido acético e glicerol em fermentações destinadas à produção de

cachaça. Assim, acredita-se que estas leveduras possuem perfil de desenvolvimento favorável em ambientes ácidos, evidenciando suas maiores concentrações nos vinhos com maiores índices de acidez, provenientes de colmos de cana armazenados.

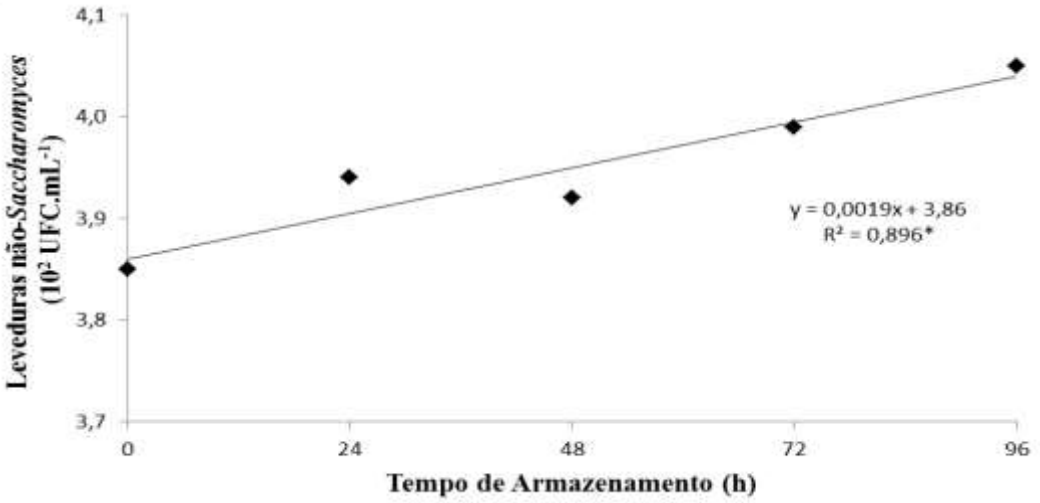

Figura 29 - Leveduras não-*Saccharomyces* (UFC.mL^{-1}) recicladas no fermento para tratamentos.

Para as contagens de leveduras no fermento diluído a 10^{-5} e plaqueado em meio LWYM, verificou-se que os gêneros de leveduras *Saccharomyces*, não pertencentes a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, predominaram nas fermentações, porém não foram constatadas diferenças significativas para tratamentos (Figura 30). Esses resultados demonstraram que as leveduras inoculadas podem ter sido rapidamente substituídas por outras linhagens características do processo.

As fermentações para produção de cachaça são caracterizadas pela extensa variabilidade genética de leveduras, decorrentes da introdução de novas linhagens, através de adições sucessivas de caldo, e pela capacidade de adaptação do inóculo as variações de pH, concentração de etanol, disponibilidade de substrato e temperatura no ambiente de fermentação (BADOTTI et al., 2010).

Leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, comumente utilizadas em panificação, quando aplicadas em fermentações com reciclo de células, ficam constantemente submetidas a condições de estresse. Essas linhagens não sobrevivem durante o processo, devido a reduzida viabilidade celular e aos baixos níveis de glicogênio e trealose intracelular, predominando por curtos períodos (BASSO et al., 2008).

A substituição do inóculo por linhagens dominantes e características do ambiente de fermentação, ocorreu independentemente da qualidade da matéria-prima empregada. Embora,

este estudo não tenha caracterizado a diversidade genética de leveduras na matéria-prima e no mosto em fermentação, verificou-se a grande variabilidade destes micro-organismos no processo. Assim, a aplicação de técnicas moleculares visando a caracterização genética da população de micro-organismos sobre as condições avaliadas, torna-se relevante para o desenvolvimento de novas pesquisas.

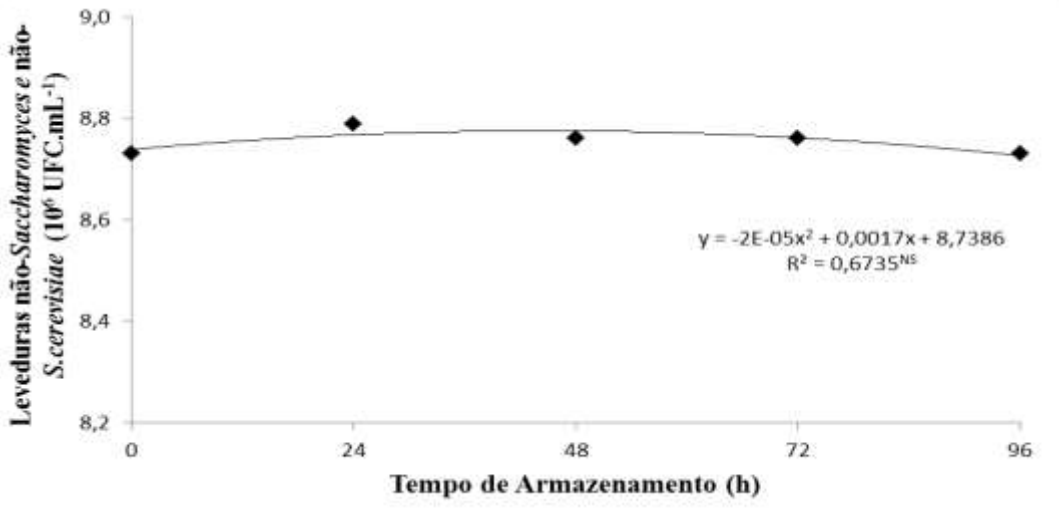

Figura 30 - Leveduras não-*Saccharomyces* e não-*Saccharomyces cerevisiae* (UFC.mL^{-1}) recicladas no fermento para tratamentos.

4.2.3 Avaliações tecnológicas do vinho

Diferenças significativas foram encontradas para os valores médios de pH, acidez total, açúcares redutores residuais totais (ARRT) e teor alcoólico dos vinhos, para os tratamentos avaliados. Durante os ciclos, verifica-se que o pH dos vinhos não diferiu estatisticamente, enquanto os valores de acidez e ARRT, foram significativamente aumentados e o teor alcoólico reduzido no primeiro e quinto ciclo fermentativo (Tabela 7).

Provavelmente, os maiores índices de acidez e açúcares residuais nos vinhos, provenientes de fermentações conduzidas com colmos de cana armazenados, são decorrentes das condições de estresse proporcionadas as leveduras, através do acúmulo de metabólitos no fermento reciclado.

Tabela 7 – Resultados da análise de variância (teste F) e teste de Tukey (5% de probabilidade) para os valores médios de pH, acidez total, açúcares redutores residuais totais (ARRT) e teor alcoólico dos vinhos

Causas de variação	**Ph**	**Acidez ($gH_2SO_4.L^{-1}$)**	**ARRT (%)**	**Teor alcoólico**
Tempo de armazenamento (A)				
0 h	3,55A	3,19B	0,41C	8,55A
24 h	3,51A	3,30AB	0,45BC	8,34AB
48 h	3,46AB	3,37AB	0,43BC	7,89BC
72 h	3,42AB	3,41A	0,45B	7,57C
96 h	3,41B	3,49A	0,50A	7,56C
F	$3,84^{*}$	$4,35^{*}$	$10,57^{**}$	$8,05^{**}$
DMS (Tukey)	0,123	0,22	0,043	0,635
Ciclos (B)				
1	3,40A	3,25B	0,45C	7,3B
2	3,48A	3,49A	0,42C	8,34A
3	3,50A	3,36AB	0,44BC	8,39A
4	3,48A	3,32AB	0,48AB	8,04A
5	3,50A	3,34AB	0,49A	7,84AB
F	$1,81^{NS}$	$2,58^{*}$	$10,39^{**}$	$7,8^{**}$
DMS (Tukey)	0,123	0,22	0,043	0,635
A x B	$0,33^{NS}$	$0,28^{NS}$	$3,52^{**}$	$1,18^{NS}$
CV	3,44	6,33	9,3	7,69

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ^{ns} = não significativo; * = significativo ao nível de 5%; ** = significativo ao nível de 1%.

Verificou-se reduções nos valores de pH e aumento na acidez total dos vinhos proporcional ao período de armazenamento dos colmos de cana. Estes parâmetros foram mais afetados, em fermentações conduzidas com mosto de cana armazenada por 72 e 96 horas (Figura 31). Provavelmente, a menor qualidade tecnológica do caldo e as maiores contagens de bactérias e leveduras não-*Saccharomyces* no fermento reciclado, contribuíram com a elevação dos níveis de acidez e redução do pH dos vinhos, comprometendo a manutenção de células e brotos viáveis de leveduras durante as fermentações.

Em fermentações alcoólicas é comum a redução do pH, devido a produção de ácidos por bactérias láticas e algumas espécies de leveduras, tão quanto pela expulsão de prótons intracelular (SCHWAN et al., 2001). Bactérias láticas podem produzir ácido lático e acético,

ocasionando inibição na taxa de crescimento específica das leveduras (NARENDRANATH; THOMAS; INGLEDEW, 2001), enquanto, linhagens de leveduras não-*Saccharomyces*, podem contribuir com a elevação dos níveis de ácido acético no caldo fermentado (DUARTE; AMORIM; SCHWAN, 2013).

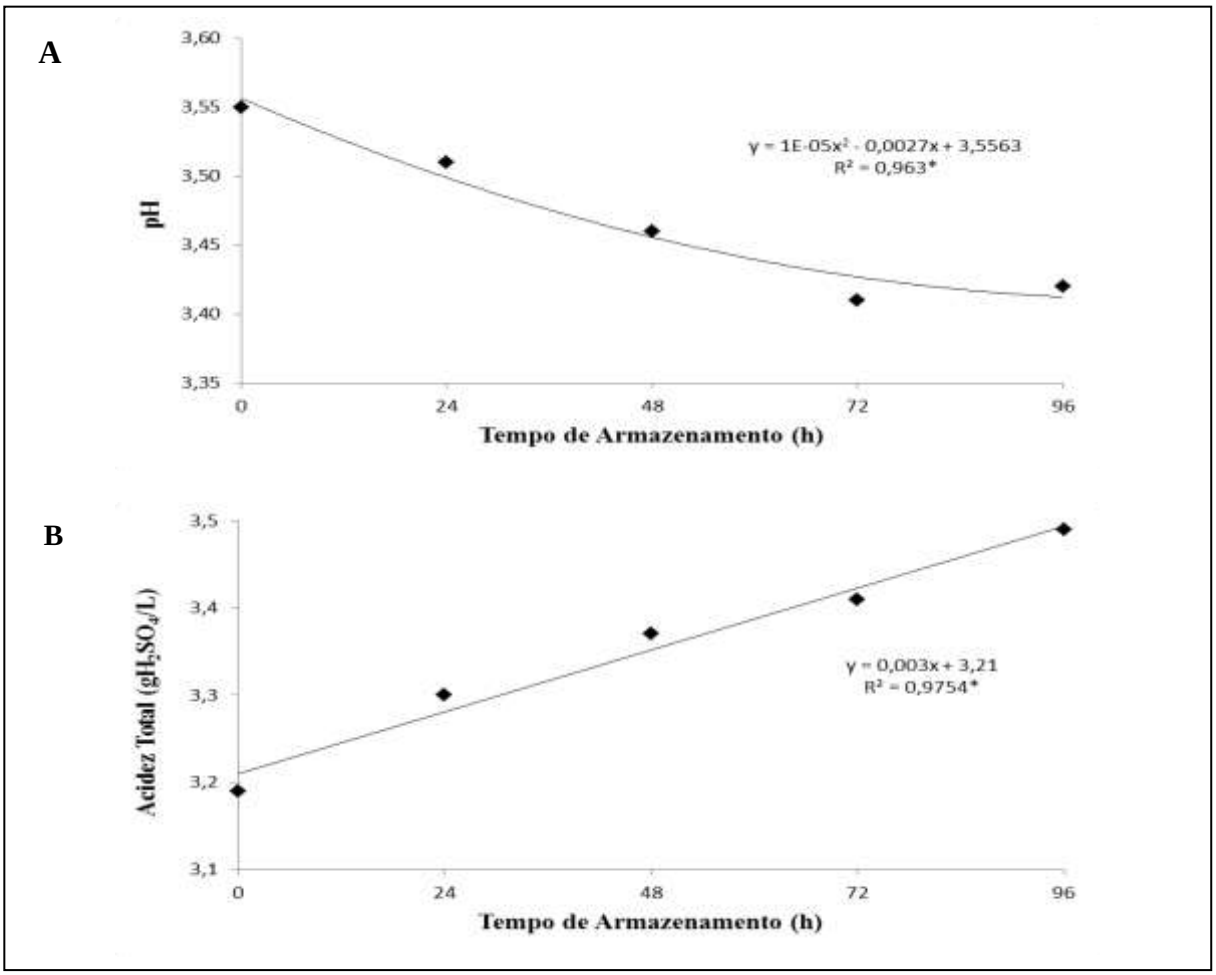

Figura 31 - Valores médios de pH (A) e acidez total (B) em mosto fermentado de cana colhida e armazenada.

Para a porcentagem de açúcares residuais nos vinhos, verificou-se que os maiores índices foram encontrados para as fermentações do caldo de cana armazenada por 96 horas (Figura 32). Durante os ciclos, observaram-se maiores porcentagens de açúcares residuais nos vinhos do 5°ciclo, para os períodos de armazenamento de 72 e 96 horas (Figura 33).

Este comportamento é resultado do estresse proporcionado às leveduras, decorrentes da menor qualidade da matéria-prima e do acúmulo de contaminantes e metabólitos no fermento reciclado. Como resultado, a viabilidade das leveduras foi comprometida e sua capacidade de assimilação dos substratos reduzida.

Nova et al. (2009), verificaram que leveduras não-*Saccharomyces* (*C. drosophilae-like*, *Zygosaccharomyces sp.*, *Candida sp.* e *P. guilliermondii*) podem elevar a concentração de

açúcares residuais ao final da fermentação, reduzindo a produtividade em etanol. A matéria-prima reflete diretamente no processo fermentativo, pois este é totalmente dependente dos componentes do caldo (MUTTON; MUTTON, 2002).

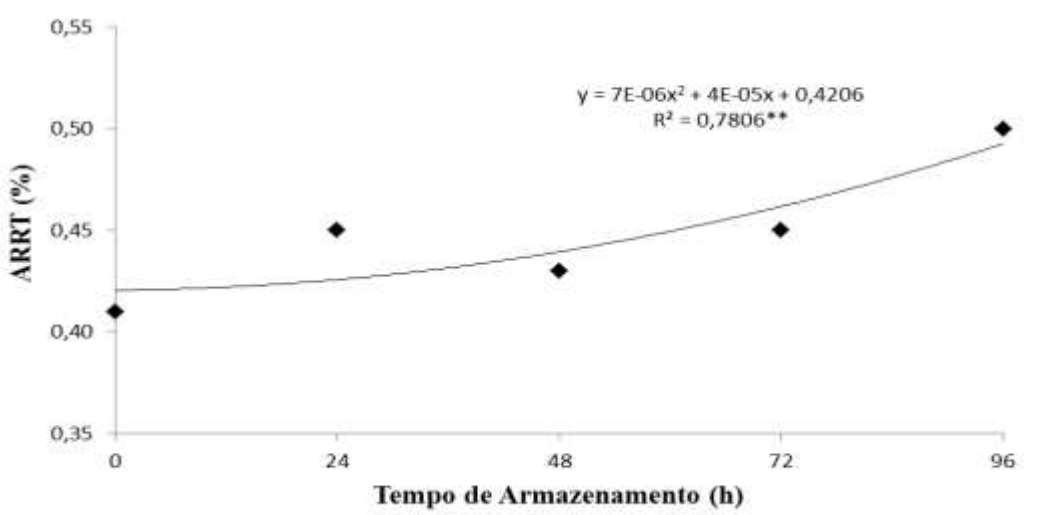

Figura 32 - Valores médios de açúcares redutores residuais totais (%) em mosto fermentado de cana colhida e armazenada.

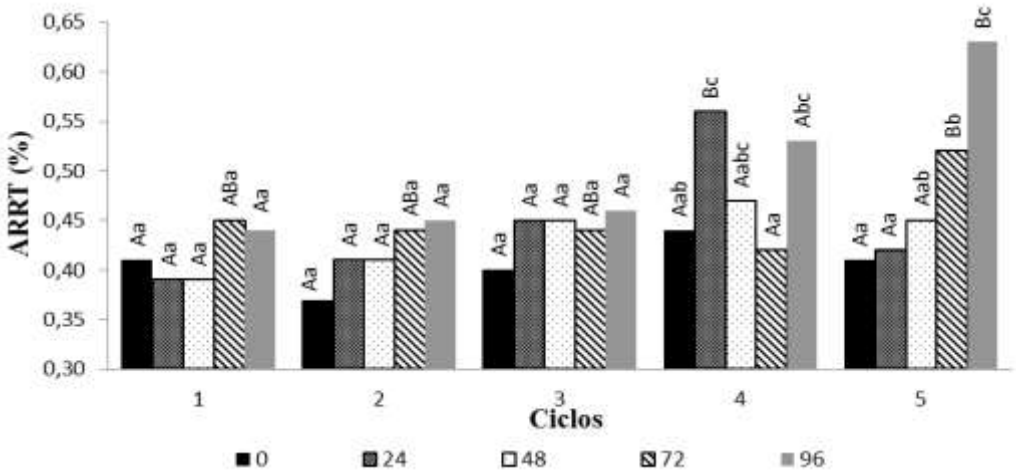

Figura 33 - Desdobramento da interação entre tratamentos e ciclos para açúcares redutores residuais nos vinhos. Letras maiúsculas comparam médias entre ciclos com mesmo tratamento. Letras minúsculas comparam médias entre os tratamentos de cada ciclo

O teor alcoólico dos vinhos foi significativamente reduzido à medida que se estendeu o período de armazenamento dos colmos de cana. Verificou-se uma redução de 11,58% na produção de álcool em fermentações conduzidas com mosto de cana armazenada por 96 horas (Figura 34). Ravaneli et al. (2011), também evidenciaram que a menor qualidade da matéria-prima, atacada por cigarrinha-das-raízes, proporcionaram reduções de 13,82% no conteúdo alcoólico dos vinhos durante a produção de etanol.

Estes resultados já eram esperados, pois o armazenamento dos colmos de cana influenciou negativamente o desempenho das leveduras durante as fermentações. Provavelmente, a menor quantidade de açúcares disponíveis no caldo e a elevação nos níveis de acidez e bactérias na matéria-prima armazenada, causaram estresse às leveduras, afetando as taxas de conversão do substrato em produto.

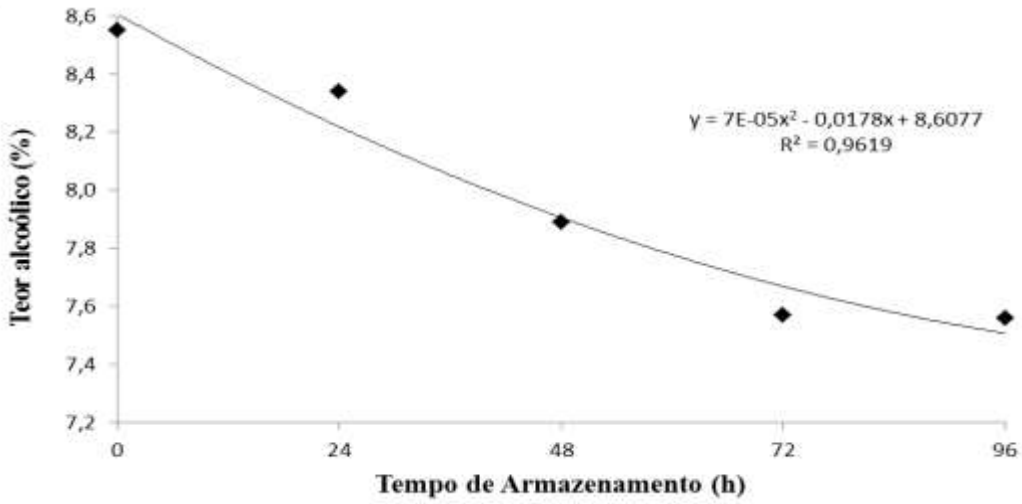

Figura 34 - Valores médios de teor alcoólico ($v.v^{-1}$) em mosto fermentado de cana colhida e armazenada.

4.3 Compostos químicos da cachaça

4.3.1 Compostos secundários

A água e o etanol são os componentes predominantes no vinho, entretanto uma diversidade de substâncias voláteis é produzida durante a fermentação do mosto e destilação do vinho. O equilíbrio químico entre estas substâncias é fundamental para o desenvolvimento das características sensoriais da cachaça.

Verificou-se que a acidez volátil das cachaças manteve-se a níveis baixos durante os ciclos fermentativos para todos os tratamentos avaliados (Figura 35). Para os tratamentos ao longo dos ciclos, foi encontrado média para acidez volátil de 18 $mg.100mL^{-1}$ A.A., valores bem inferiores ao estabelecido pela Legislação Brasileira (BRASIL, 2005a).

Embora, os vinhos de fermentações conduzidas com colmos de cana armazenados tenham apresentado maiores valores de acidez total, observou-se que as contagens de bactérias e leveduras não-*Saccharomyces* no fermento reciclado foram aumentadas, porém as

concentrações destes micro-organismos permaneceram baixas, contribuindo assim, com menores níveis de acidez volátil nos destilados.

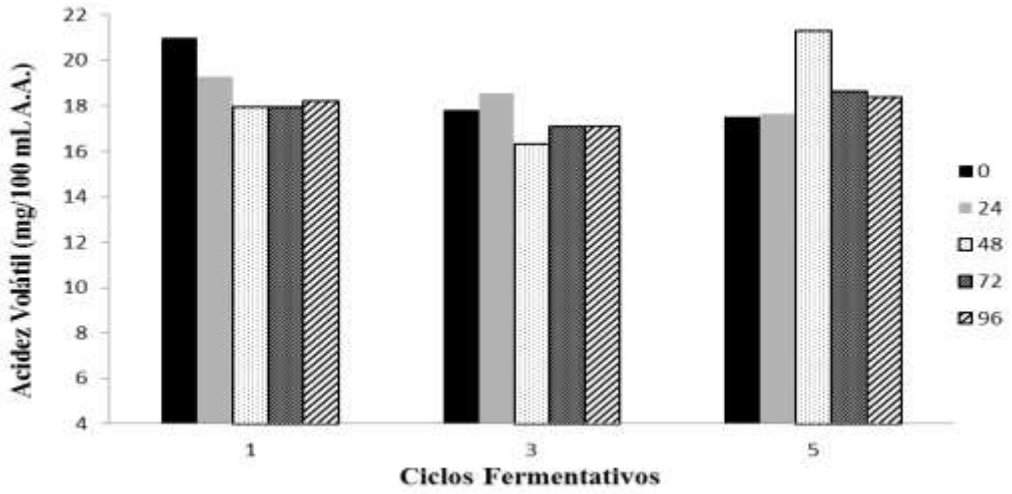

Figura 35 - Níveis de acidez volátil (mg.100 mL^{-1} A.A.) em cachaças produzidas em 5 ciclos fermentativos, utilizando-se mosto fermentado de cana colhida e armazenada

O principal aldeído encontrado na cachaça é o acetaldeído, o qual deve possuir limites inferiores a 30 mg.100mL^{-1} A.A. (BRASIL, 2005a). O conteúdo de acetaldeído nos destilados foi inferior ao estabelecido pela Legislação. Verificou-se uma variação na produção deste composto, com maiores níveis no 1° ciclo para cachaças produzidas com colmos armazenados e ao final do 5° ciclo para destilado de cana colhida e não armazenada (Figura 36).

Dato, Pizauro e Mutton (2005) encontraram maiores conteúdos de acetaldeído em cachaças produzidas por *Pichia anômala* e *Dekkera bruxelensis* no primeiro ciclo fermentativo, enquanto ao final de dez ciclos a produção deste composto foi superior para fermentações conduzidas com *Saccharomyces cerevisiae*. Podemos observar um comportamento semelhante no presente estudo, onde as concentrações de leveduras não-*Saccharomyces* foram maiores em fermentações conduzidas com colmos armazenados.

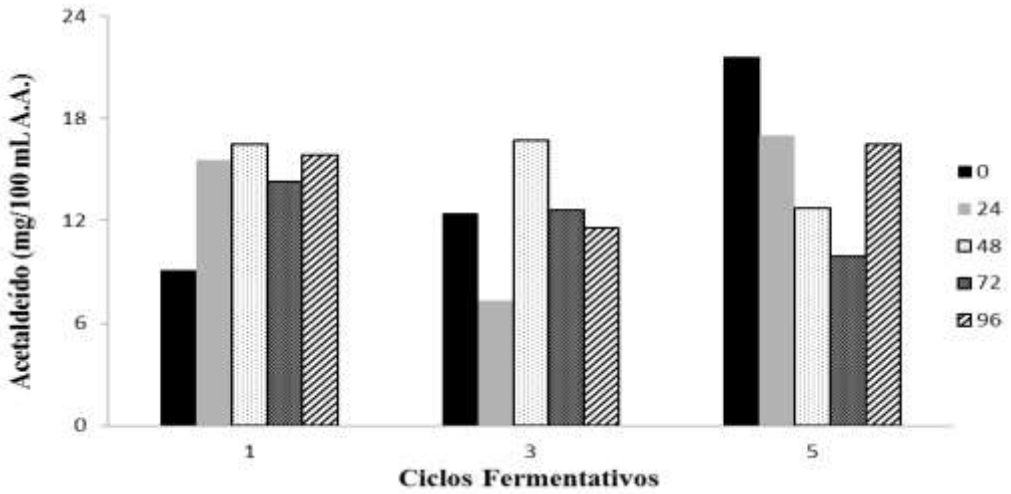

Figura 36 - Níveis de acetaldeído (mg.100 mL^{-1} A.A.) em cachaças produzidas em 5 ciclos fermentativos, utilizando-se mosto fermentado de cana colhida e armazenada

Os níveis de acetato de etila permaneceram baixos, exceto no 5° ciclo para destilados obtidos de colmos de cana armazenados por 72 e 96 horas (Figura 37). Entretanto, verificou-se que sua concentração não foi superior ao estabelecido pela Legislação.

Provavelmente, a maior acidez dos vinhos provenientes dos colmos armazenados contribuiu com a maior produção de acetato de etila, que refletiram em baixos níveis de acidez volátil nos destilado. Comportamento semelhante foi descrito por Dato, Pizauro e Mutton (2005), ao observarem uma maior produção de acetato de etila por *S.cerevisiae*, quando o pH dos vinhos foram menores.

O acetato de etila é o principal éster encontrado na cachaça, representando aproximadamente 70% do conteúdo total de ésteres (NASCIMENTO; CARDOSO; FRANCO, 2009), sendo considerado o acetato mais importante para a qualidade sensorial da bebida (SOUZA et al., 2012). Constatou-se então, que a produção deste composto não foi influenciada pela utilização de matéria-prima armazenada.

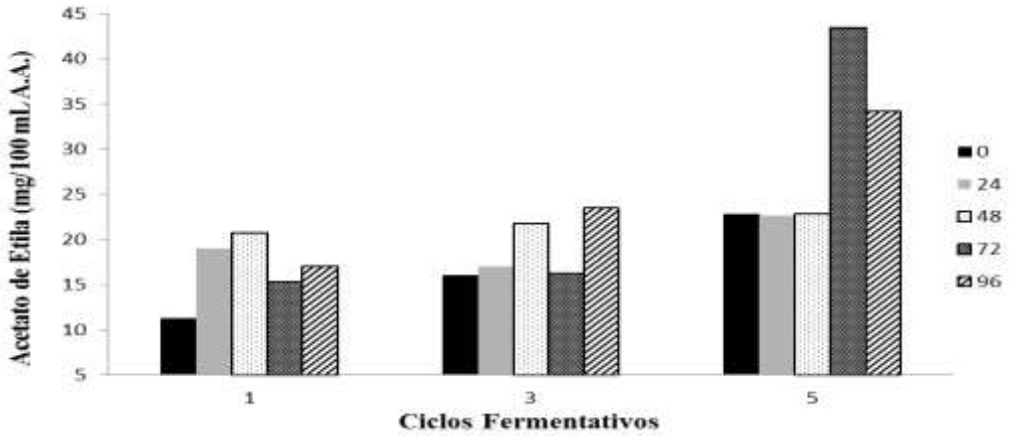

Figura 37 - Níveis de acetato de etila (mg.100 mL^{-1} A.A.) em cachaças produzidas em 5 ciclos fermentativos, utilizando-se mosto fermentado de cana colhida e armazenada

A análise dos álcoois superiores demonstrou que a concentração de propanol manteve-se a níveis relativamente constantes ao longo dos ciclos, com maior produção em cachaça produzida com colmos de cana armazenados por 48 horas (Figura 38).

Gutierrez (1993) encontrou maiores níveis de álcool n-propílico em cachaças produzidas por leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, quando o pH do meio foi reduzido. Possivelmente, os baixos valores de pH dos vinhos, característicos de fermentações alcoólicas, elevou a produção de propanol na cachaça, independentemente da qualidade do caldo.

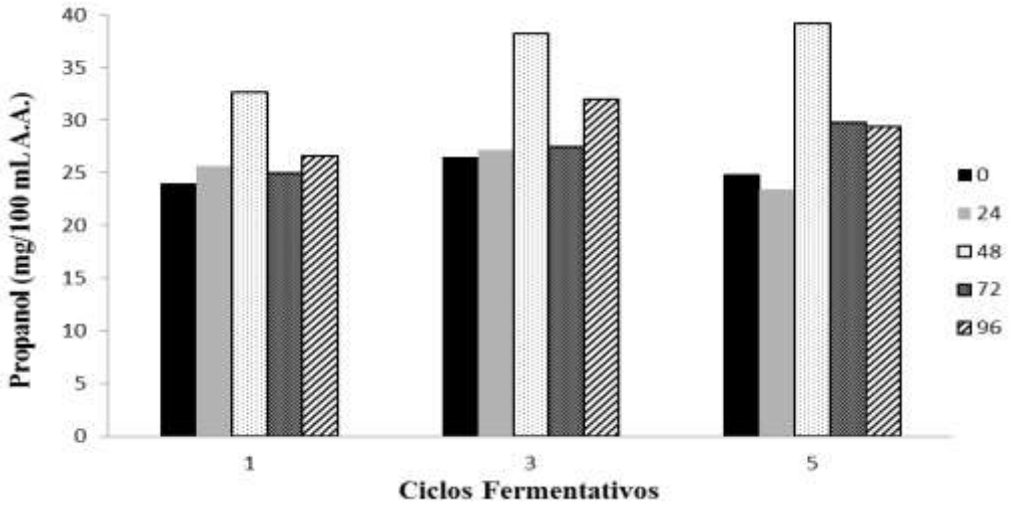

Figura 38 - Conteúdo de propanol (mg.100 mL^{-1} A.A.) em cachaças produzidas em 5 ciclos fermentativos, utilizando-se mosto fermentado de cana colhida e armazenada

A produção de isobutanol foi mais elevada no 1° e 3° ciclos fermentativos, com decréscimo mais acentuado no 5° ciclo para cachaças produzidas com colmos de cana colhidos e armazenados por período de 24 horas (Figura 39).

Acredita-se que a composição do substrato e as características microbiológicas do processo fermentativo, associadas com o menor brotamento das leveduras ao longo dos ciclos, contribuíram com a maior produção deste álcool ao final do 5° ciclo para cachaças produzidas com colmos de cana armazenados por períodos superiores a 48 horas.

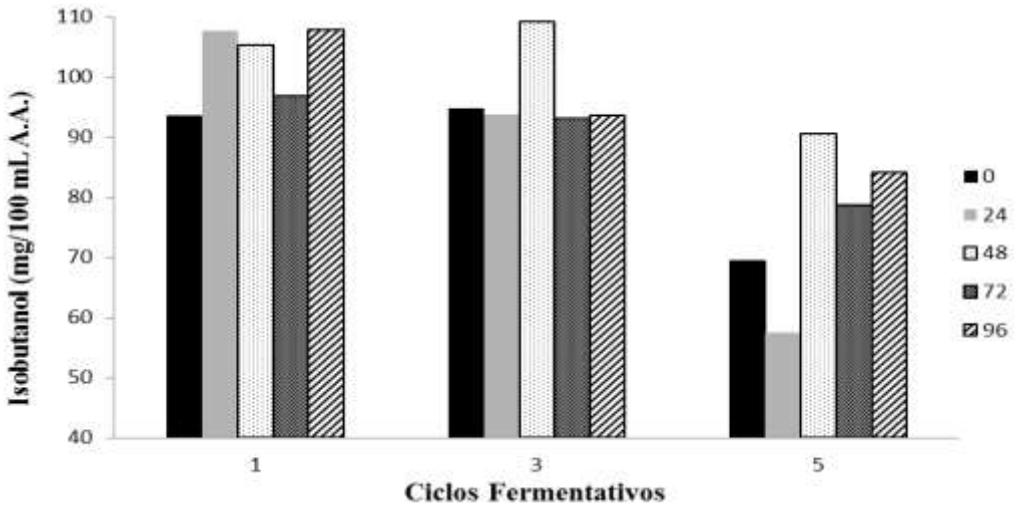

Figura 39 - Conteúdo de álcool isobutílico (mg.100 mL^{-1} A.A.) em cachaças produzidas em 5 ciclos fermentativos, utilizando-se mosto fermentado de cana colhida e armazenada

Características similares a produção de isobutanol foram observadas para as concentrações de álcool isoamílico ao longo dos ciclos. Os níveis de álcool isoamílico foram elevados no 1° e 3° ciclos, com consequente redução ao final do 5° ciclo (Figura 40).

A produção destes compostos é dependente da linhagem da levedura, sendo a síntese de álcoois superiores uma característica individual de cada espécie (ALCARDE; MONTEIRO; BELLUCO, 2012). Assim, verificou-se que a produção de álcool isoamílico também foi influenciada pelas características tecnológicas e microbiológicas do processo fermentativo.

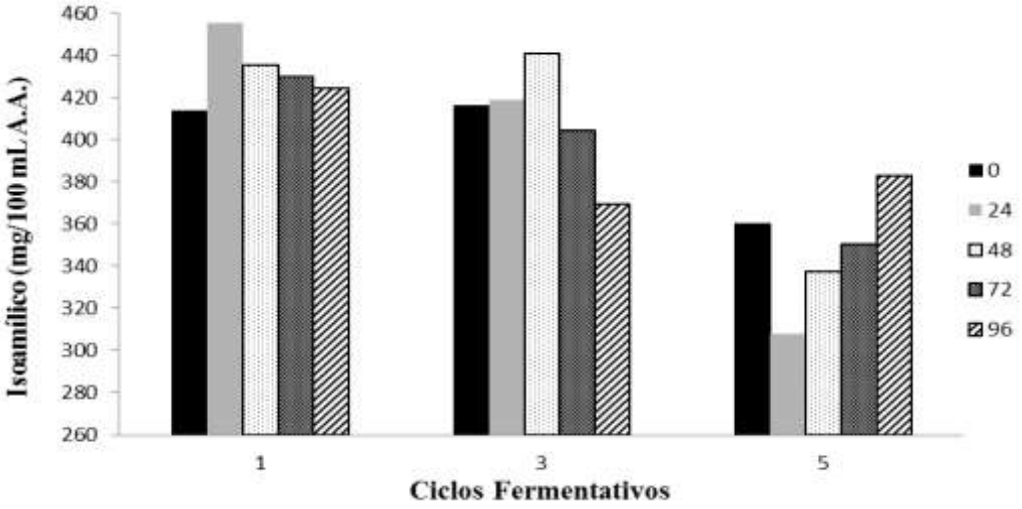

Figura 40 - Conteúdo de álcool isoamílico (mg.100 mL^{-1} A.A.) em cachaças produzidas em 5 ciclos fermentativos, utilizando-se mosto fermentado de cana colhida e armazenada

Observou-se elevada concentração de álcoois superiores em todas as amostras de cachaça, com valores médios de 560,6 e 460,4 mg.100mL^{-1} A.A., no 1° e 5° ciclos,

respectivamente (Figura 41). Independente do armazenamento dos colmos de cana, o conteúdo destes álcoois foram superiores ao estabelecido pela Legislação Brasileira (BRASIL, 2005a).

Gutierrez (1993), estudando a produção de álcoois superiores por três diferentes linhagens de leveduras, verificou que a *Saccharomyces cerevisiae* intensificou a produção dos álcoois isobutílico e isoamílico, em fermentações conduzidas com 16% de sacarose, pH 3,0 e temperatura de 34°C. Provavelmente, a produção elevada de álcoois superiores é característico do metabolismo destas leveduras, principalmente quando submetidas a estas condições de processo. A redução destes álcoois ao final do 5° ciclo provavelmente ocorreu pela introdução de novas linhagens de leveduras no processo, decorrentes de novas alimentações de mosto durante os ciclos fermentativos.

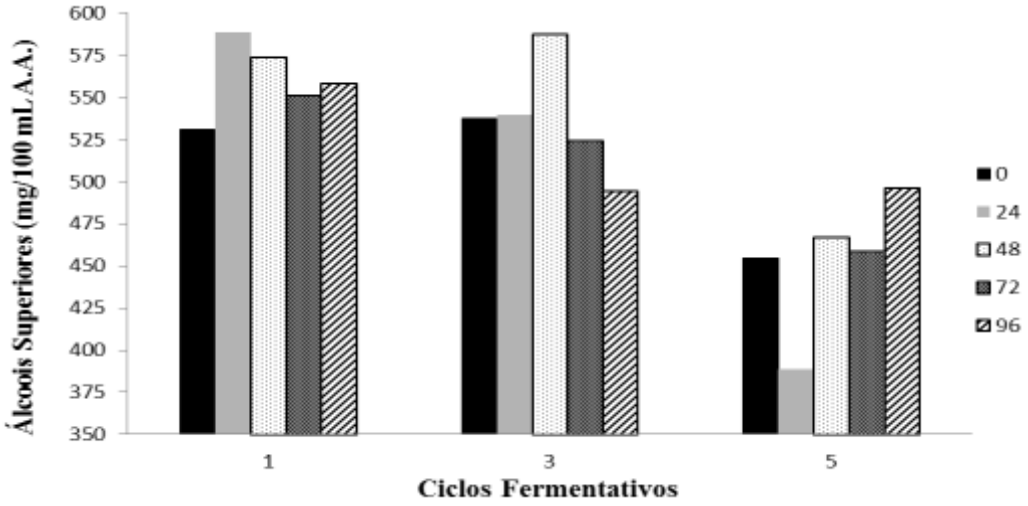

Figura 41 - Álcoois superiores totais (mg.100 mL^{-1} A.A.) em cachaças produzidas em 5 ciclos fermentativos, utilizando-se mosto fermentado de cana colhida e armazenada

Os níveis de furfural apresentaram comportamento crescente ao longo dos ciclos, com concentrações superiores ao estabelecido pela Legislação no 3° ciclo para cachaças produzidas com colmos armazenados por 24, 72 e 96 horas, e no 5° ciclo para todos os tratamentos avaliados (Figura 42).

Quanto mais elevada a concentração de açúcares residuais no vinho, maior a produção de furfural e hidroximetilfurfural através dos processos de desidratação de hexoses e pentoses (MAIA, 1994). Observou-se nesta pesquisa, que a produção de furfural foi proporcional ao aumento de açúcares residuais nos vinhos durante os ciclos, evidenciando que o comprometimento das leveduras no processo contribui para a formação deste composto durante a destilação do vinho.

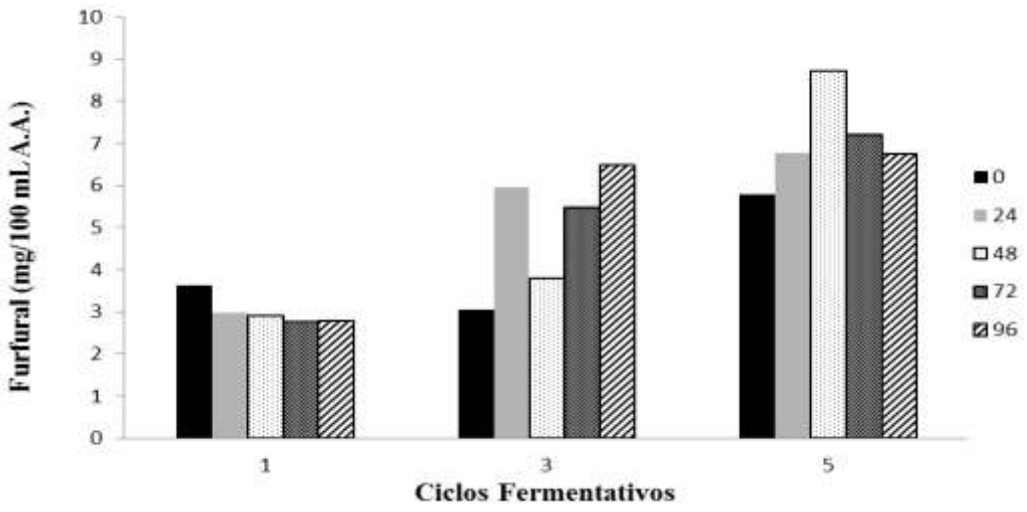

Figura 42 - Níveis de furfural (mg.100 mL^{-1} A.A.) em cachaças produzidas em 5 ciclos fermentativos, utilizando-se mosto fermentado de cana colhida e armazenada

Os compostos secundários totais foram maiores no 1° ciclo (média de 613,5 mg.100mL^{-1} A.A. para tratamentos) para cachaças produzidas com colmos de cana armazenados, devido a maior produção de álcoois superiores e acetaldeído.

Ao final do 5° ciclo fermentativo, a concentração média de congêneres nos destilados foi de 523,5 mg.100mL^{-1} A.A., devido ao menor recolhimento de álcoois superiores nas destilações dos vinhos (Figura 43). Os coeficientes de congêneres ficaram dentro dos limites estabelecidos pela Legislação vigente (BRASIL, 2005a).

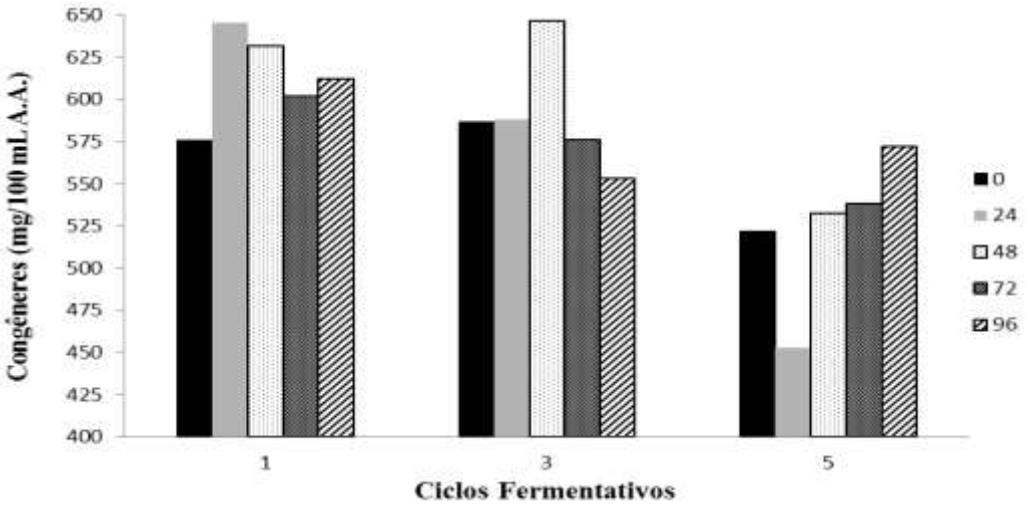

Figura 43 - Compostos secundários totais (mg.100 mL^{-1} A.A.) em cachaças produzidas em 5 ciclos fermentativos, utilizando-se mosto fermentado de cana colhida e armazenada

4.3.2 Contaminantes

Os níveis de álcool metílico foram inferiores a 20 mg.100mL^{-1} A.A. (BRASIL, 2005a) para todos os destilados (Figura 44). Este composto é liberado na fermentação quando as moléculas de ácido galacturônico, constituintes da pectina, são hidrolisadas em meio ácido (MAIA; PEREIRA; SCHWABE, 1994). Provavelmente, as boas práticas durante a extração do caldo e preparo do mosto contribuíram com a redução de metanol na cachaça.

Os teores de cobre nos destilados apresentaram-se dentro do limite estabelecido pela Legislação Brasileira, não excedendo a concentração de 5 mg.L^{-1} (BRASIL, 2005a), independentemente da utilização de colmos de cana armazenados nas fermentações do mosto (Figura 45). A higienização adequada do aparelho de destilação permite reduzir a formação de azinhavre nas superfícies, mantendo assim, baixas concentrações de cobre no destilado.

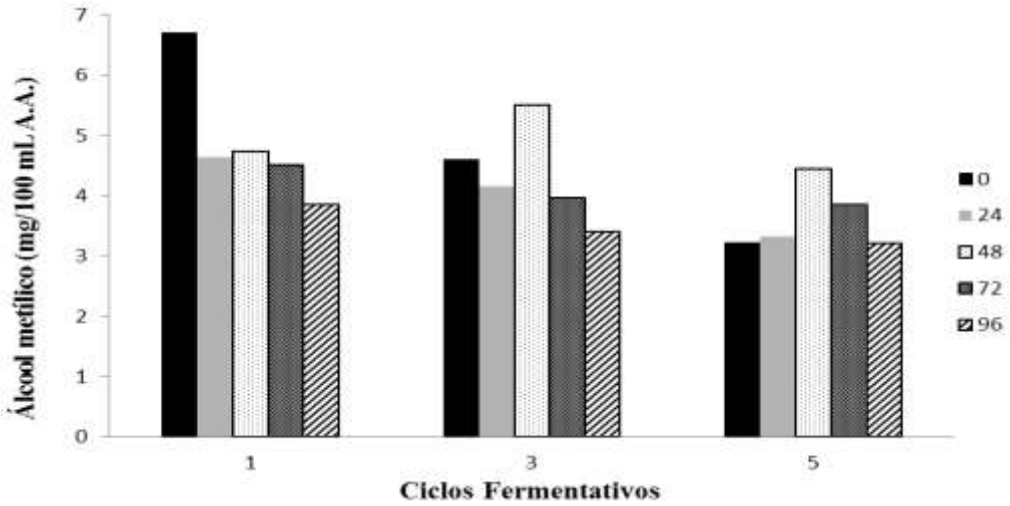

Figura 44 - Níveis de álcool metílico (mg.100 mL^{-1} A.A.) em cachaças produzidas em 5 ciclos fermentativos, utilizando-se mosto fermentado de cana colhida e armazenada

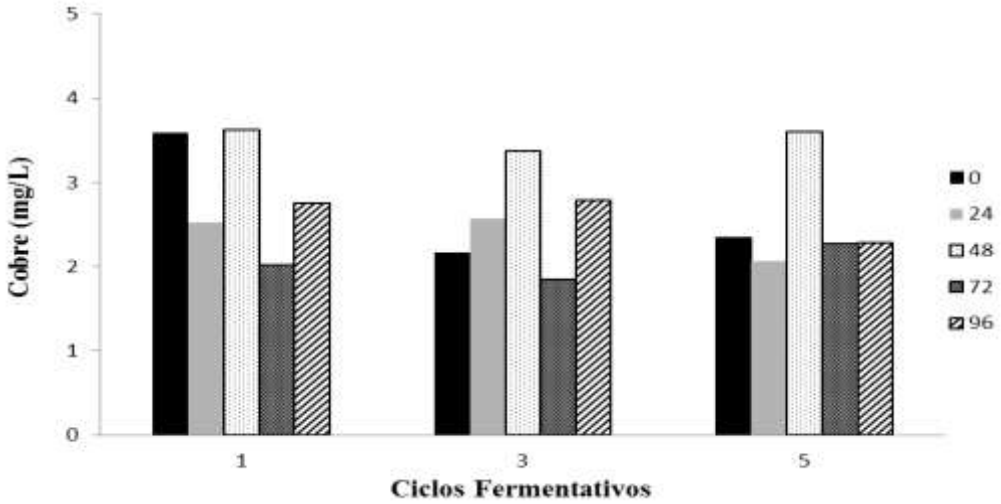

Figura 45 - Níveis de cobre (mg.L^{-1}) em cachaças produzidas em 5 ciclos fermentativos, utilizando-se mosto fermentado de cana colhida e armazenada

O conteúdo de carbamato de etila foi inferior a 210 mg.L^{-1} A.A. (BRASIL, 2005a; BRASIL, 2014) para todos os destilados, com valores mais elevados no primeiro ciclo para cachaça produzida com colmos de cana armazenados por até 24 horas. Ao longo dos ciclos, observou-se redução destes valores, exceto para destilados produzidos com colmos armazenados por períodos superiores a 48 horas (Figura 46).

A análise do número de células e brotos viáveis de leveduras demonstraram maiores índices de células inativadas em fermentações conduzidas com cana armazenada por períodos superiores a 48 horas. Assim, acredita-se que esta condição favoreceu a produção de precursores nitrogenados nos vinhos, através de aminoácidos provenientes das células de leveduras hidrolisadas, intensificando a formação de carbamato de etila na cachaça ao longo dos ciclos. Ough, Crowell e Mooney (1988), encontraram aumento deste composto, proporcional ao conteúdo de arginina e precursores nitrogenados (ornitina, ácido glutâmico + asparagina e uréia) em vinhos.

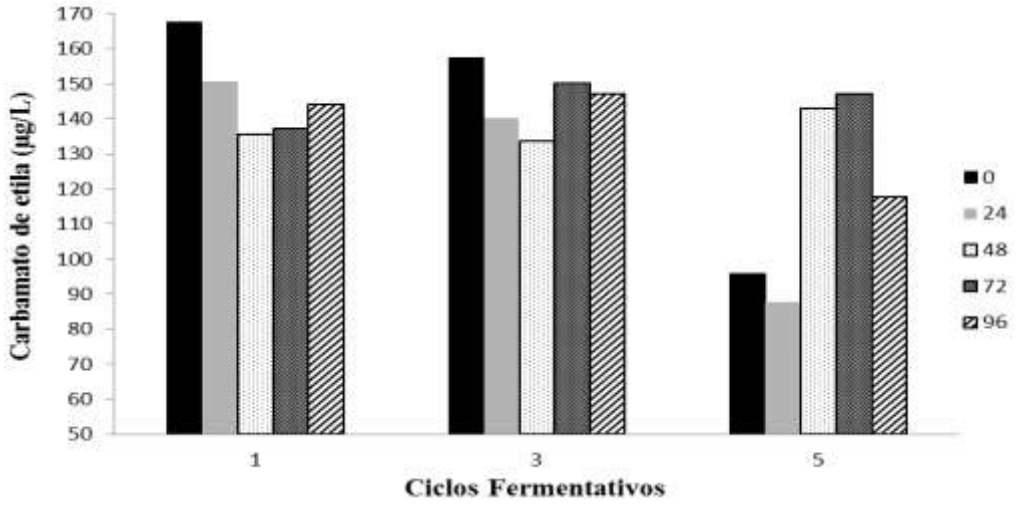

Figura 46 - Níveis de carbamato de etila (µg.L^{-1}) em cachaças produzidas em 5 ciclos fermentativos, utilizando-se mosto fermentado de cana colhida e armazenada

Verificou-se que para a condução adequada dos processos fermentativos, é necessário a utilização de colmos de cana armazenados por períodos inferiores a 48 horas, visando um melhor desempenho das leveduras durante as fermentações, entretanto, as concentrações dos compostos secundários e contaminantes da cachaça não foram superiores aos limites estabelecidos pela Legislação.

5 CONCLUSÕES

- O armazenamento dos colmos de cana por períodos superiores a 48 horas afetou negativamente a qualidade da matéria-prima, resultando em aumento na concentração de sólidos solúveis, açúcares redutores, acidez e bactérias láticas, e menor porcentagem de Pol, Pureza, açúcares redutores totais e no número de leveduras não-*Saccharomyces* no caldo;

- A utilização de colmos armazenados por 72 e 96 horas comprometeu o processo fermentativo, resultando em redução de células e brotos viáveis de leveduras ao longo dos ciclos e elevação na concentração de contaminantes no fermento reciclado;

- As características tecnológicas dos vinhos foram significativamente comprometidas em fermentações conduzidas com colmos de cana armazenados por períodos superiores a 48 horas, resultando em aumento da acidez total e ARRT, e redução do pH e álcool produzido;

- Os níveis de acidez volátil, acetato de etila, acetaldeído, álcool metílico, cobre e carbamato de etila das cachaças foram dentro do estabelecido pela Instrução Normativa, nº 13, de 29/06/2005 e Instrução Normativa, nº 28, de 08/08/2014, enquanto o conteúdo de álcoois superiores e furfural foram superiores em destilados de cana colhida e armazenada.

- As concentrações de acetato de etila e carbamato de etila permaneceram elevadas ao final do 5º ciclo para destilados de colmos de cana armazenados por períodos superiores a 48 horas, porém não excederam os limites especificados na Legislação.

- Verificou-se a importância da não utilização de colmos de cana armazenados por períodos superiores a 48 horas, visando a condução adequada do processo fermentativo e a manutenção dos níveis de acetato de etila, furfural e carbamato de etila da cachaça dentro dos padrões estabelecidos pela Legislação.

REFERÊNCIAS

ALCARDE, A.R. **Cachaça**: ciência, tecnologia e arte. São Paulo: Blucher. 2014. 96 p.

ALCARDE, A.R.; MONTEIRO, B.M.S.; BELLUCO, A.E.S. Composição química de aguardente de cana-de-açúcar fermentadas por diferentes cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, São Paulo, v.35, n.8, p.1612-1618, jul. 2012.

ALCARDE, A.R.; de SOUZA, L.M.; BORTOLETTO, A.M. Ethyl carbamate kinetics in double distillation of sugar cane spirit. **Institute of Brewing & Distilling**, London, v.118, n.1, p.27-31, May. 2012.

AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; ALVES, D.G. **Processos de produção de álcool**: controle e monitoramento. Piracicaba: USP, 1996. 93p.

AMORIM, H.V. **Fermentação alcoólica, ciência & tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 2005. 448 p.

ANDRADE SOBRINHO, L.G.; CAPPELINI, L.T.D.; SILVA, A.A.; GALINARO, C.A.; BUCHVISER, S.F.; CARDOSO, D.R.; FRANCO, D.W.. Teores de carbamato de etila em aguardentes de cana e mandioca: parte II. **Química Nova**, São Paulo, v.32, n.1, p.116-119, jan. 2009.

ANGELINO, S.A.G.F. Beer. In: MAARSE, H. **Volatile compounds in foods and beverages**. New York: Marcel Dekker, 1991. cap.16, p. 581-615.

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

BADOTTI, F.; BELLOCH, C.; ROSA, C.A.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Physiological and molecular characterization of Saccharomyces cerevisiae cachaça strains isolated from diferente geographic regions in Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v.26, n.4, p.579-587, Apr. 2010.

BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação agrícola**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 237 p.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J. de; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research,** Amsterdam, v.8, n.7, p.1155-1163, Nov. 2008.

BHATIA, S.; JYOTI; UPPAL, S.K.; THIND, K.S.; BATTA, S.K. Post harvest quality deterioration in sugarcane under different environmental conditions. **Sugar Tech**, Indian, v.11, n.2, p.154-160, June. 2009.

BOSCH, S.; GROF, C.P.L.; BOTHA, F.C. Expression of neutral invertase in sugarcane. **Plant Science**, Limerick, v.166, n.5, p.1125-1133, May. 2004.

BOZA, Y.; HORII, J. Influência da destilação sobre a composição e a qualidade sensorial da aguardente de cana de açúcar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.18, n.4, p.391-396, out./dez., 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa n. 28**, de 08 de agosto de 2014. Alterar o subitem 5.1.2. do Anexo da Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 04 set. 2014

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa n. 13**, de 29 de junho de 2005a. Aprova o regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 03 set. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 24** de 08 de setembro de 2005b. Aprova o manual operacional de bebidas e vinagres. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 19 out. 2013.

BRUNO, S.N.F.; VAITSMAN, D.S.; KUNIGAMI, C.N.; BRASIL, M.G. Influence of the distillation processes from Rio de Janeiro in the ethyl carbamate formation in Brazilian sugar cane spirits. **Food Chemistry,** Barking, v.104, n.4, p. 1345-1352, Feb. 2007.

CAMPOS, C.R.; SILVA, C.F.; DIAS, D.R.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; SCHWAN, R.F. Features of *Saccharomyces cerevisiae* as a cultures starter for the production of the distilled sugar cane beverage, cachaça in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.108, n.6, p.1871-1879, June. 2010.

CARDOSO, D.R.; LIMA-NETO, B.S.; FRANCO, D.W.; NASCIMENTO, R.F. Influência do material do destilador na composição química das aguardentes de cana: parte II. **Química Nova**, São Paulo, v.26, n.2, 2003. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000200004 > Acesso em: 31 mar. 2015.

CARDOSO, M.G. **Produção de aguardente de cana**. 2. ed., Lavras: UFLA, 2006. 178p.

CARVALHO-NETTO, O.V.; ROSA, D.D.; CAMARGO, L.E.A. Identification of contaminant bacteria in cachaça yeast by 16S rDNA gene sequencing. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.65, n.5, p. 508-515, Sept./Oct. 2008.

CECCATO-ANTONINI, S.R. **Microbiologia da fermentação alcoólica**: a importância do monitoramento microbiológico em destilarias. São Carlos: EdUFSCar, 2010, 105p.

CHAVES, J.B.P; PÓVOA, M.E.B. A qualidade da aguardente de cana-de-açúcar. In: MUTTON, M.J.R.; MUTTON, M.A. (Ed.). **Aguardente de cana**: produção e qualidade. Jaboticabal, FUNEP, 1992. p. 93-132.

CHERUBIN, R.A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. 124 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CLEGG, B.S.; FRANK, R. Detection and quantitation of trace levels of ethyl carbamate in alcoholic beverages by selected ion monitoring. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v.36, n.3, p.502-505, May. 1988.

CONSECANA. **Manual de instruções**. 3. ed. Piracicaba, 2006. 112p. Disponível em: <http://www.orplana.com.br/novosite/manual_consecana.pdf >Acesso em: 15 jul. 2014.

COPERSUCAR. **Manual de controle químico da fabricação de açúcar**. Piracicaba, 2001. 1 CD-ROM.

CORDENTE, A.G.; CURTIN, C.D.; VARELA, C.; PRETORIUS, I.S. Flavours-active wine yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.96, n.3, p.601-618, Nov. 2012.

COSTA, V.M.; BASSO, T.O.; ANGELONI, L.H.P.; OETTERER, M.; BASSO, L.C. Produções de ácido acético, etanol e dos isômeros óticos do ácido lático por linhagens de *Lactobacillus* isoladas de fermentações alcoólicas industriais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.2, p. 503-509, mar./abr. 2008.

DATO, M.C.F.; PIZAURO, J.M.; MUTTON, M.J.R. Analysis of the secondary compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* and wild yeast strains during the production of "cachaça". **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.36, n.1, p. 70-74, jan./mar. 2005.

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

DUARTE, W.F.; SOUZA, M.V.F.; DIAS, D.R.; SCHWAN, R.F. Effect of co-inoculation of saccharomyces cerevisiae and lactobacillus fermentum on the quality of the distilled sugar cane beverage cachaça. **Journal of Food Science**, Chicago, v.76, n.9, p. 307-318, Nov./Dec. 2011.

EGGLESTON, G. Deterioration of cane juice: sources and indicators. **Food Chemistry**, Barking, v.78, n.1, p. 95-103, July. 2002.

EGGLESTON, G.; LEGENDRE, B.L. Mannitol and oligosaccharides as new criteria for determining cold tolerance in sugarcane varieties. **Food Chemistry**, Barking, v.80, n.4, p. 451-461, Apr. 2003.

EMBRAPA. **Árvore do conhecimento:** cana-de-açúcar. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-açucar/arvore/CONT000 fiog1ob502 wyiv80z4s473 agi63ul.html>. Acesso em: 25 dez. 2014.

ESCALANTE, A.; RODRÍGUEZ, M.E.; MARTÍNEZ, A.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A.; BOLÍVAR, F.; GOSSET, G. Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.235, n.2, p.273-279, June. 2004.

ETIÉVANT, P.X. Wine. In: MAARSE, H. **Volatile compounds in foods and beverages**. New York: Marcel Dekker, 1991. cap.14, p. 483-546.

GABRIEL, A.V.M.D.; VERRUMA-BERNARDI, M.R.; MARGARIDO, L.A.C.; BORGES, M.T.M.R.; NASSU, R.T.; LAVORENTI, N.A.; CECCATO-ANTONINI. Effect of the spontaneous fermentation and the ageing on the chemo-sensory quality of Brazilian organic cachaça. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.5, p. 918-925, mai. 2012.

GALLO, C.R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. 1990. 388 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990.

GALLO, C.T.; CANHOS, V.P. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica revisão. **STAB.** Açúcar, Álcool e Subprodutos, Piracicaba, v.9, n.4/5, p. 35-40, mar./jun. 1991.

GARCIA, D.B.; RAVANELI, G.C.; MADALENO, L.L.; MUTTON, M.A.; MUTTON, M.J.R. Damages of spittlebug on sugarcane quality and fermentation process. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.67, n.5, p.555-561, Sept./Oct. 2010.

GOMES, F.C.O.; SILVA, C.L.C.; VIANNA, C.R.; LACERDA, I.C.A.; BORELLI, B.M.; NUNES, A.C.; FRANCO, G.R.; MOURÃO, M.M.; ROSA, C.A. Identification of lactic acid bacteria associated with traditional cachaça fermentations. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.41, n.2, p. 486-492, Apr./Jun. 2010.

GONÇALVES, T.D. **Danos causados por *Mahanarva fimbriolata* em cana-de-açúcar**: reflexos na qualidade da matéria-prima e fermentação etanólica. 2003, 51 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdades de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2003.

GUERRA, J.B.; ARAÚJO, R.A.C.; PATARO, C.; FRANCO, G.R.; MOREIRA, E.S.A.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; ROSA, C.A. Genetic diversity *of Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artesanal Brazilian cachaça. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.33, n.2, p.106-111, Aug. 2001.

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

HATCH, M.D.; GLASZIOU, K.T. Sugar accumulation cycle in sugar cane. *II.* Relationship of invertase activity to sugar content e growth rate in storage tissue of plants grown in controlled environments. **Plant Physiology**, Lancaster, v.38, n.3, p.344-348, May, 1963.

INSTITUTO BRASILEIRO DA CACHAÇA. **Mercado**. Disponível em: <http://www.ibraccachacas.org> Acesso em: 16 fev. 2010.

Instituto Brasileiro da Cachaça. **Mercado externo**. Disponível em: <http://www.ibraccachacas.org> Acesso em: 28 dez. 2014.

IIDA, Y.; SUGANUMA, Y.; MATSUMOTO, K.; SATOH, I. Novel determination system for urea in alcoholic beverages by using an FIA system with an acid urease column. **Analytical Science**, Tokyo, v.22, n.1, p.173-176, Jan. 2006.

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, London, v.17, n.1, 1997. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/07352689891304195>. Acesso em: 5 jun. 2015.

JANZANTTI, N.S. **Compostos voláteis e qualidade de sabor da cachaça**. 2004. 179p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

KRISHNAKUMAR, T.; THAMILSELVI, C.; DEVADAS, C.T. Effect of delayed extraction and storage on quality of sugarcane juice. **African Journal of Agricultural Research**, Victoria Island, v.8, n.10, p. 930-935, Mar. 2013.

LABANCA, R.A.; GLÓRIA, M.B.A.; AFONSO, R.J.C.F. Determinação de carbamato de etila em aguardentes de cana por CG-EM. **Química Nova**, São Paulo, v.31, n.7, p. 1860-1864, out. 2008.

LAMBERT, R.J.; STRATFORD, M. Weak acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.86, n.1, p. 157-164, Jan. 1999.

LANE, J.H.; EYNON, L. **Determination of reducing sugars by Fehling solution with methylene blue indicator.** London: Normam Roger, 1934. 8p.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. P**rincípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.

LILLY, M.; BAUER, F.F.; STYGER, G.; LAMBRECHTS, M.G.; PRETORIUS, I.S. The effect of increased branched-chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of higher alcohols and on the flavour profiles of wine and distillates. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v.6, n.5, p.726-743, Aug. 2006.

LIMA, A.J.B.; CARDOSO, M.G.; GUERREIRO, M.C.; PIMENTEL, F.A. Emprego do carvão ativado para remoção de cobre em cachaça. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.2, p.247-250, jan. 2006.

LIMA, U. de A. **Estudos dos principais fatores que afetam os componentes não alcoólicos das aguardentes de cana**. 1964. 141 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1964.

LONTOM, W.; KOSITTRAKUN, M.; LINGLE, S.E. Relationship of acid invertase activities to sugar content in sugarcane internodes during ripening and after harvest. **Thai Journal of Agricultural Science**, Bangkok, v.41, n.3/4, p.143-151, Sept./Dec. 2008.

LUDWING, K.M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D.F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.1, p.63-68, jan./abr. 2001.

LURTON, L.; SNAKKERS, G.; ROULLAND, C.; GALY, B. Influence of the fermentation yeast strain on the composition of wine spirits. **Journal of the Science of Food and Agricultural**, Oxford, v.67, n.4, p.485-491, Apr. 1995.

MADALENO, L.L. **Infestação de *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) e controle químico na qualidade da matéria-prima e clarificação do caldo de cana**. 2006, 49p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdades de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2006.

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

MAIA, A.B.R.A.; CAMPELO, E.A.P. **Tecnologia da cachaça de alambique**. Belo Horizonte: SEBRAE/MG; SINDBEBIDAS, 2005. 129 p.

MAIA, A.B.R.A.; PEREIRA, A.J.; SCHWABE, W.K. **Segundo curso de tecnologia para produção de aguardente de qualidade**. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG e Fundação Cristiano Otoni, 1994.65 p.

MAO, L.; QUE, F.; WANG, G. Sugar metabolism and involvement of enzymes in sugarcane (*saccharum officinarum* L.) stems during storage. **Food Chemistry**, Barking, v.98, n.2, p. 338-342, Aug. 2006.

MASSON, J.; CARDOSO, M.G.; VILELA, F.J.; PIMENTEL, F.A.; MORAIS, A.R.; ANJOS, J.P. Parâmetros físico-químicos e cromatográficos em aguardentes de cana queimada e não-queimada. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.6, p. 1805-1810, nov./dez. 2007.

MEHROTRA, P.; MEHROTRA, A.; SURYAWANSHI, R. Effect of post harvest deterioration on efficiency of clarification and crystallization process of white sugar manufacture of CoS 91269 Cane Variety. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON EMERGING TRENDS IN ENGINEERING AND TECHNOLOGY , 2, 2009. **Anais**… Washington, 2009. p. 781-784.

MUTTON, M.J.R. **Avaliação da fermentação etanólica do caldo de cana-de-açúcar (Saccharum spp) tratadas com maturadores químicos**. 1998, 178 p. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 1998.

MUTTON, M.J.R.; MUTTON, M.A. Maturadores químicos em cana-de-açúcar: III efeitos na fermentação etanólica e microbiota do mosto. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 8, 2002, Recife. **Anais**... Recife: STAB, 2002. p. 452-457.

MUTTON, M.J.R. Reflexos da qualidade da matéria-prima sobre a fermentação alcoólica. In: WORKSHOP SOBRE "PRODUÇÃO DE ETANOL: QUALIDADE DE MATÉRIA-PRIMA", 2008. Lorena. **Anais**... Lorena, 2008. p. 9-10.

NARENDRANATH, N.V. Bacterial contamination and control in etanol production. In: JACQUES, K.A.; LYON, T.P.; KELSALL, D.R. (Eds.). **The alcohol textbook**: a reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries. Nottingham: University Press, 2003. cap. 20, p. 287-298.

NARENDRANATH, N.V.; HYNES, S.H.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.11, p.4158-4163, Nov. 1997.

NARENDRANATH, N.V.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Houndmills, v.26, n.3, p. 171-177, Mar. 2001.

NASCIMENTO, E.S.P.; CARDOSO, D.R.; FRANCO, D.W. Comparação de técnicas de determinação de ésteres em cachaça. **Química Nova**, São Paulo, v.32, n.9, p.2323-2327, nov. 2009.

NASCIMENTO, E.S.P.; CARDOSO, D.R.; FRANCO, D.W. Quantitative ester analysis in cachaça and distilled spirits by gas chromatography – mass spectrometry (GC/MS). **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.56, n.14, p.5488-5493, July. 2008.

NASCIMENTO, R.F. Aldeídos em bebidas alcoólicas fermento-destiladas. **Engarrafador Moderno**, São Paulo, v. 49, n.7, p.75-77, jan./fev. 1997.

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

NOBRE, T.P.; HORII, J.; ALCARDE, A.R. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n.1, p. 20-25, jan./mar. 2007.

NOVA, M.X.V.; SCHULER, A.R.P.; BRASILEIRO, B.T.R.V.; MORAIS Jr., M.A. Yeast species involved in artesanal cachaça fermentation in three stills with diferente technological levels in Pernambuco, Brazil. **Food Microbiology**, London, v.26, n.5, p.460-466, Aug. 2009.

OKOLO, B.; JOHNSTON, J.R.; BERRY, D.R. Toxicity of ethanol, n-butanol and iso-amyl alcohol in Saccharomyces cerevisiae when supplied separately and in mixtures. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.9, n.6, p. 431-434, June. 1987.

OLIVA-NETO, P. **Estudo de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por leveduras**. 1995, 183p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria from de alcohol industry to several antimicrobial compounds. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.32, n.1, p.10-14, Jan./Mar. 2001.

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

OLIVEIRA, E.S.; ROSA, C.A.; MORGANO, M.A.; SERRA, G.E. The production of volatile compounds by yeasts isolated from small Brazilian cachaça distilleries. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v.21, n.8/9, p.1569-1576, Dec. 2005a.

OLIVEIRA, E.S.; ROSA, C.A.; MORGANO, M.A.; SERRA, G.E. Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeasts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York. v.20, n.1, p.19-24, Feb. 2004.

OLIVEIRA, M.C.F.L.; PAGNOCA, F.C. Aplicabilidade de meios seletivos empregados na indústria cervejeira para detecção de leveduras selvagens em unidades sucroalcooleiras. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 8., 1988, São Lourenço: **Anais**... São Lourenço: SINAFERM, 1988. p.78-81.

OUGH, C.S.; CROWELL, E.A.; MOONEY, L.A. Formation of ethyl carbamate precursors during grape juice (Chardonnay) fermentation. I. Addition of amino acids, urea, and

ammonia: effects of fortification on intracellular and extracellular precursors. **American Journal of Enology and Viticulture**, California, v. 39, n. 3, p.243-249, Sept. 1988.

PATARO, C.; SANTOS, A.; CORREA, S.R.; MORAIS, P.B.; LINARDI, V.R.; ROSA, C.A. Physiological characterization of yeast isolated from artesanal fermentation in aguardente distillery. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.29, n.2, p.69-73, jun. 1998.

PIGGOT, J.R.; PATERSON, A. The contribuitions of the process to flavour in Scotch malt whisky. In:_____. **Destilled beverage flavour**: recent developments. New York: VCH, 1989. 352p.

RAKKIYAPPAN, P.; ESTHER SHEKINAH, D.; GOPALASUNDARAM, P.; MATHEW, M.D., ASOKAN, S. Post-harvest deterioration of sugarcane with special reference to quality loss. **Sugar Tech**, Indian, v.11, n. 2, p.167-170, June. 2009.

RAVANELI, G.C.; GARCIA, D.D.; MADALENO, L.L.; MUTTON, M.A.; STUPIELLO, J.P.; MUTTON, M.J.R. Spittlebug impacts on sugarcane quality and ethanol production. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, n.2, p.120-129, fev. 2011.

RAVANELI, G.C.; MADALENO, L.L.; PRESOTTI, L.E.; MUTTON, M.A.; MUTTON, M.J.R. Spittlebug infestation in sugarcane affects ethanolic fermentation. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.63, n.6, p.534-539, nov./dez. 2006.

RECHE, R.V.; LEITE NETO, A.F.; SILVA, A.A.; GALINARO, C.A.; OSTI, R.Z.; FRANCO, D.W. Influence of type of distillation apparatus on chemical profiles of Brazilian cachaças. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.55, n.16, p. 6603-6608. July. 2007.

RIFFKIN, H.L.; WILSON, R.; HOWIE, D.; MÜLLER, S.B. Ethyl carbamate formation in the production of pot still whisky. **Journal of the Institute Brewing**, London, v.95, n.2, p.115-119. Mar./Apr.1989.

ROSE, S.; BOTHA, F.C. Distribution patterns of neutral invertase and sugar contente in sugarcane intermodal tissues. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.38, n.11, p.819-824, Nov. 2000.

SCHWAN, R.F.; MENDONÇA, A.T.; SILVA Jr., J.J.; RODRIGUES, V.; WHEALS, A.E. Microbiology and physiology of *Cachaça (Aguardente)* fermentations. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.79, n.1, p.89-96, Jan. 2001.

SEBRAE. **Oportunidades para a cachaça no mercado interno e externo**. Disponível em: < http://www.sebraemercados.com.br>. Acesso em: 29 dez. 2014.

SIDDHANT; SRIVASTAVA, R.P.; SINGH, S.B.; SHARMA, M.L. Assessment of sugar losses during staling in different varieties of sugarcane under subtropical condition. **Sugar Tech**. Indian, v.10, n.4, p.350-354, Dec. 2008.

SIEBALDE, H.G.L.; CANUTO, M.H.; LIMA, G.M. de; SILVA, J.B.B. Alguns aspectos toxicológicos da cachaça. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte: EPAMIG, v.23, n.217, 2002, p.59-62.

SILVA, L.F.L.F.; BERNADINO, C.D.; RÉ, F.E.; FURTADO, C.H.F.; AMORIM, H.V. **Métodos analíticos para o controle da produção de açúcar e álcool**. 3. ed. Piracicaba: Fermentec, 2003, 126 p.

SINGH, P.; SOLOMON, S.; SHRIVASTAVA, A.K.; PRAJAPATI, C.P.; SINGH, R.K. Post-harvest deterioration of sugarcane and its relationship with the activities of invertase and dextransucrase during late-crushing season in sub-tropics. **Sugar Tech**, Indian, v.10, n.2, p.133-136, June. 2008.

SINGH, P.; SOLOMON, S.; SHRIVASTAVA, A.K.; SINGH, R.K.; SINGH, J. Post-harvest quality deterioration of cane juice: physio-biochemical indicators. **Sugar Tech**, Indian, v.8, n.2/3, p.128-131, Sept. 2006.

SISWOYO, T.A.; OKTAVIANAWATI, I.; DJENAL; MURDIYANTO, U.; SUGIHARTO, B. Changes of sucrose content and invertase activity during sugarcane stem storage. **Indonesian Journal of Agricultural Science**, Yogyakarta, v.8, n.2, p.75-81, Oct. 2007.

SKINNER, K.A.; LEATHERS, T.D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Houndmills, v.31, n.9, p. 401-408, Oct. 2004.

SOLOMON, S. Post-harvest cane deterioration and its milling consequences. **Sugar Tech**, Indian, v.2, n.1/2, p. 1-18, June. 2000.

SOLOMON, S. Post-harvest deterioration of sugarcane. **Sugar Tech**, Indian, v.11, n.2, p. 109-123, June. 2009.

SOLOMON, S.; BANERJI, R.; SHRIVASTANA, A.K.; SINGH, P.; SINGH, I.; VERMA, M.; PRAJAPATI, C.P.; SAWNANI, A. Post-harvest deterioration of sugarcane and chemical methods to minimize sucrose losses. **Sugar Tech**, Indian, v.8, n.1, p. 74-78, Mar. 2006.

SOLOMON, S.; RAMADURAI, R.; SHANMUGNATH, S.; SHRIVASTAVE, A.K.; DEB, S.; SINGH, I. Management of biological losses in milling tandem to improve sugar recovery. **Sugar Tech**, Indian, v.5, n.3, p. 137-142, Sept. 2003.

SOUZA, A.P.G.; VICENTE, M. de A.; KLEIN, R.C.; FIETTO, L.G.; COUTRIM, M.X. de CÁSSIA FRANCO AFONSO, R.J.; ARAÚJO, L.D.; da SILVA, P.H.; BOUILLET, L.E.; CASTRO, I.M.; BRANDÃO, R.L. Strategies to select yeast starter culture for production of flavor compounds in cachaça fermentations. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.101, n.2, p. 379-392, Feb. 2012.

SOUZA LIBERAL, A.T.; BASÍLIO, A.C.M; MONTE RESENDE, A. do; BRASILEIRO, B.T.V.; SILVA FILHO, E.A. da; MORAIS, J.O.F. de; SIMÕES, D.A. MORAIS Jr., M.A. de. Identification of Dekkera bruxellensis as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.102, n.2, p. 538-547, Feb. 2007.

SOUZA, M.A.C.; MUTTON, M.J.R. Floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum* em processos industriais de fermentação alcoólica avaliada por técnica fotométrica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.4, p.893-898, July/Ago. 2004.

SUMAN, A.; SOLOMON, S.; YADAV, D.V.; SINGH, M. Post-harvest loss in sugarcane quality due to endophytic microrganisms. **Sugar Tech**, Indian, v.2, n.4, p. 21-25, Dec. 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2004. 719 p.

THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi continuous alcoholic fermentation of corn mash. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.90, n.5, p. 819-828, May. 2001.

VENTURA, R. **Quantificação do ácido lático na fermentação etanólica como parâmetro de monitoramento do processo**. 2007, 102p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2007.

VERMA, A.K.; SINGH, S.B.; AGARWAL, A.K.; SOLOMON, S. Influence of postharvest storage temperature, time, and invertase enzyme activity on sucrose and weight loss in sugarcane. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.73, p. 14-21, Nov. 2012.

VICENTE, M.A.; FIETTO, L.G.; CASTRO, I.M.; SANTOS, A.N.G.; COUTRIM, M.X.; BRANDÃO, R.L. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains producing higuer levels of flavoring compounds for production of "cachaça" the Brazilian sugarcane spirit. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.108, n.1, p.51-59, Apr. 2006.

WATT, D.A.; CRAMER, M.D. Post-harvest biology of sugarcane. **Sugar Tech**, Indian, v.11, n.2, p.142-145, June. 2009.

WEBER, J.V.; SHARYPOV, V.I. Ethyl carbamate in food and beverages: a review. **Environmental Chemistry Letters**, Heidelberg v.7, n.3, 2009. Disponível em: < http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10311-008-0168-8>. Acesso em: 7 maio 2015.

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

YUSOF, S.; SHIAN, L.S.; OSMAN, A. Changes in quality of sugar-cane juice upon delayed extraction and storage. **Food Chemistry**, Barking, v.68, n.4, p.395-401, Mar. 2000.

ZHU, Y.J.; KOMOR, E.; MOORE, P.H. Sucrose accumulation in the sugarcane stem is regulated by the difference between the activities of soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase. **Plant Physiology**, Lancaster, v.115, n.2, p.609-616, Oct. 1997.

ZIMMERLI, B.; SCHLATTER, J. Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. **Mutation Research**, Amsterdam,v. 259, n. 3/4, 1991. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165121891901267# > Acesso em: 4 May 2015.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

FRATESCHI, C.S.; DURIGAN, J.F.; MARQUES, M.O.; HOJO, E.T.D.; SANTOS, L.O.; CUNHA JÚNIOR, L.C.C.; TEIXEIRA, G.H.A. Storage of sugarcane stalks (*Saccharum officinarum* cv. SP79-1011) in low oxygen atmosphere and the effects on enzymatic browning. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.86, p.154-158, Aug. 2013.

RAMOS, E.L.; RAVELO, S. Sugarcane oligosaccharides and their impact on sucrose quality and factory efficiency. **Sugar Tech**, Indian, v.11, n.2, p.185-188, June. 2009.

ROJA, V.; GIL, J.V. PIÑAGA, F.; MANZANARES, P. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeast. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.70, n.3, p.283-289, Nov. 2001.

SILVA, P.H.A.; SANTOS, J.O.; ARAÚJO, L.D.; FARIA, F.C.; PEREIRA, A.F.; DE OLIVEIRA, V.A.; VICENTE, M.A.; BRANDÃO, R.L. Avaliação cromatográfica de compostos voláteis de cachaça produzidas com leveduras de diferentes procedências. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, n.1., p.100-106, jan./mar. 2009.

SINGH, I.; SOLOMON, S. Post-harvest quality loss of sugarcane genotypes under sub-tropical climate: deterioration of whole stalk and billets. **Sugar Tech**, Indian, v.5, n.4, p.285-288, Dec. 2003.