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

Qualidade química e sensorial de cachaças produzidas a partir do reciclo de células de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) comerciais

Luisa Costa de Carvalho

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

**Piracicaba
2021**

Luisa Costa de Carvalho
Bacharela em Gastronomia

**Qualidade química e sensorial de cachaças produzidas a partir do reciclo de células
de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) comerciais**
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2021

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

Carvalho, Luisa Costa de

Qualidade química e sensorial de cachaças produzidas a partir do reciclo de células de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) comerciais / Luisa Costa de Carvalho. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2021.

93 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Cachaça 2. Reciclo 3. Levedura 4. Aceitação 5. Cromatografia gasosa 6. RATA I.
Título

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus queridos pais, José e Alba.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida, da minha família e amigos. Muito obrigada por permitir um caminho que me trouxesse até aqui.

A José Lucas, meu pai, por me inspirar a não medir esforços para conquistar meus objetivos. À minha mãe Albalúcia, por me contagiar com o amor pelo trabalho e pela ciência. Acima de tudo, muito obrigada pelas provas diárias de amor e pelos valores éticos e morais, tão evidentes em suas vidas.

Ao meu irmão Rafael, minha cunhada Bel e minha sobrinha Liz por acreditarem em mim e me ajudarem sempre. Obrigada por tanto carinho, amor e momentos felizes.

Ao meu namorado e parceiro de vida, Lucas, por seu companheirismo e apoio incondicional, estando presente nos momentos em que mais precisei. Obrigada pelo seu amor, por sua capacidade de extrair o melhor de mim e por me trazer paz e tranquilidade em qualquer situação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André, pela oportunidade e confiança depositada, que foram essenciais para meu desenvolvimento pessoal e acadêmico.

Aos amigos que além de tornarem mais leve e divertida a vivência no Laboratório de Tecnologia e Qualidade de Bebidas, me ajudaram em toda realização deste projeto: Amanda, Maitê, Marcelo, Giulia, Paulo, Aline Nascimento e Aline Bortoletto e, em especial, Carol, Mari e Giovanni que tanto me ensinaram e contribuíram.

Às amigas da pós-graduação Marcelle, Mariane e Lethicia pela companhia, troca de conhecimentos e pelas gargalhadas dos almoços, cafés e happy hours.

Às amigas que a gastronomia me presenteou e que me apoiaram, mesmo longe, na concretização desse trabalho, bem como, me proporcionaram momentos de alegria: Lys e Karinne.

À Maju, meu animal de apoio emocional.

A todos os meus amigos pela força, incentivo e momentos de descontração.

Aos funcionários do departamento Pedrinho, Rose, Silvino, Dito e Joana pela simpatia e por todo auxílio concedido.

Aos professores das disciplinas da pós-graduação por todo conhecimento compartilhado.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e contribuições.

Aos provadores que participaram da análise sensorial.

À Lallemand pela parceria na realização deste projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. Cachaça: aspectos históricos e econômicos.....	13
2.2. Processo de produção	14
2.3. Análise sensorial.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. Elaboração das cachaças.....	30
3.2. Preparo do mosto.....	30
3.3. Fermentação	30
3.4. Destilação	31
3.5. Análises físico-químicas.....	32
3.6. Análise sensorial das cachaças	35
3.7. Análise de dados.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Tempo das fermentações.....	39
4.2. Caracterização do caldo de cana	40
4.3. Caracterização dos vinhos	41
4.4. Caracterização dos destilados	42
4.5. Análise de dados físico-químicos	58
4.6. Resultados das análises sensoriais	65
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
REFERÊNCIAS	77
APÊNDICES.....	87
ANEXOS	91

RESUMO

Qualidade química e sensorial de cachaças produzidas a partir do reciclo de células de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) comerciais

A cachaça é um produto tipicamente brasileiro que vem ganhando cada vez mais reconhecimento internacional. O processo fermentativo de cachaça emprega o reciclo de células de levedura, normalmente por decantação, para servir de inóculo para a fermentação subsequente. O objetivo do estudo foi avaliar a qualidade química e sensorial da levedura comercial DistilaMax RM (*Lallemand Biofuels and Distilled Spirits*) na produção de cachaça com uso de ciclos fermentativos. Cepas esta, destinada à produção de destilados a base de cana de açúcar e ainda não utilizada na produção de cachaça. Além disso, foi possível compará-la com a levedura comercial CanaMax (*Lallemand Biofuels and Distilled Spirits*), já estabelecida na produção de cachaça. A contribuição dessas cepas na formação de compostos que melhoram a qualidade química e sensorial da aguardente foram avaliadas. Para as análises físico-químicas foi utilizada a cromatografia gasosa para a quantificação de compostos voláteis (CG-DIC), carbamato de etila e ésteres (CG-MS). Sensorialmente, os testes realizados foram de aceitação e RATA (*Rate All That Apply*). Os resultados foram estatisticamente avaliados através de Análise Fatorial Múltipla (AFM) e Análise de Componentes Principais (APC). Ao longo dos reciclos, o rendimento, bem como, os congêneres voláteis formados apresentaram variações devido à possíveis interferentes. Foi possível relacionar o perfil sensorial com a composição química obtida pelas diferentes cepas de levedura e observou-se que o coeficiente de congêneres das cachaças produzidas pela cepa CanaMax foi mais consistente se comparado com a cepa DistilaMax RM, porém a amostra mais bem aceita sensorialmente foi referente ao sétimo ciclo da cepa DistilaMax RM.

Palavras-chave: Cachaça, Reciclo, Levedura, Aceitação, Cromatografia gasosa, RATA

ABSTRACT

Chemical and sensory quality of cachaças produced from the recycling of commercial yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*)

Cachaça is a typical Brazilian product that is, progressively gaining international recognition. The fermentative process of cachaça employs the recycling of yeast cells, usually by decantation, to serve as an inoculum for subsequent fermentation. The objective of the research was to evaluate the chemical and sensory quality of commercial yeast DistilaMax RM (*Lallemand Biofuels and Distilled Spirits*) in the production of cachaça with fermentative recycle. This strain is intended for the production of sugarcane-based distillates and not yet used in the production of cachaça. In addition, it was possible to compare it with yeast CanaMax (*Lallemand Biofuels and Distilled Spirits*), already established in the production of cachaça. The contribution of these strains in the formation of compounds that improve the chemical and sensory quality of the distillate were evaluated. For chemical analysis, gas chromatography was used to quantify volatile compounds (GC-FID), ethyl carbamate and esters (GC-MS). Sensorially, the tests was acceptance and RATA (*Rate All That Apply*). The results were statistically evaluated using Multiple Factor Analysis (MFA) and Principal Component Analysis (APC). Throughout the recycles, the yield, as well as, the volatile congeners formed, showed variations due to possible interferences. It was possible to relate the sensory profile with the chemical composition obtained by different yeast strains and it was observed that the coefficient of congeners of the cachaças produced by CanaMax strain was more consistent comparing to the DistilaMax RM strain, however, the best sensorially accepted sample was related to the seventh cycle of DistilaMax RM strain.

Keywords: Sugar cane spirit, Recycle, Yeast, Acception, Gas chromatography, RATA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma de produção das cachaças e análises realizadas.....	29
Figura 2: Esquema do alambique simples utilizado na produção das cachaças.	31
Figura 3: Representação gráfica do tempo (em horas) de fermentação das cepas CanaMax e DistilaMax RM durante os ciclos fermentativos.....	39
Figura 4: Concentração (% v/v) do grau alcoólico proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e Canamax.	42
Figura 5: Rendimento fermentativo (%) proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e Canamax.....	43
Figura 6: Concentração de ácido acético (mg/100mL de álcool anidro) proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e Canamax.....	44
Figura 7: Concentração de acetato de etila (mg/100mL de álcool anidro) proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e Canamax.....	46
Figura 8: Concentração de lactato de etila (mg/100mL de álcool anidro) proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e Canamax.....	47
Figura 9: Concentração de acetaldeído (mg/100mL de álcool anidro) proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e CanaMax.	48
Figura 10: Concentração de furfural e 5-hidroximetilfurfural (mg/100mL de álcool anidro) proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e Canamax..	49
Figura 11: Concentração de n-propanol (mg/100mL de álcool anidro) proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e Canamax.....	50
Figura 12: Concentração de isobutanol (mg/100mL de álcool anidro) proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e Canamax.....	51
Figura 13: Concentração de álcool isoamílico (mg/100mL de álcool anidro) proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e Canamax.	52
Figura 14: Concentração de álcoois superiores (mg/100mL de álcool anidro) proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e Canamax.	53
Figura 15: Concentração de coeficiente de congêneres (mg/100mL de álcool anidro) proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e Canamax.....	54
Figura 16: Concentração de metanol (mg/100mL de álcool anidro) proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e Canamax.....	55
Figura 17: Concentração de carbamato de etila (µg/L) proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e Canamax.	56

Figura 18: <i>Scree Plot</i> da variância obtida para cada dimensão gerada pela Análise Fatorial Múltipla (AFM).	58
Figura 19: Contribuição das variáveis quantitativas suplementares (em verde) e ativas (em preto) nas dimensões 1 e 2 da AFM.	60
Figura 20: Representação das cachaças produzidas a partir das cepas DistilaMax RM (RM), CanaMax (CNX) e seus respectivos ciclos (1°,3°,5°,7°,10°,12°,14°) nas duas primeiras dimensões geradas na AFM.	61
Figura 21: Contribuição das variáveis quantitativas suplementares (em verde) e ativas (em preto) nas dimensões 1 e 3 da AFM.	62
Figura 22: Representação das cachaças produzidas a partir das cepas DistilaMax RM (RM), CanaMax (CNX) e seus respectivos ciclos (1°,3°,5°,7°,10°,12°,14°) nas dimensões 1 e 3 geradas na AFM.	62
Figura 23: Dendograma de análise hierárquica de agrupamento referente às 14 amostras analisadas quimicamente.	63
Figura 24: Representação gráfica por AFM do posicionamento das amostras em relação à sua composição química.	64
Figura 26: <i>Scree Plot</i> da variância obtida para cada dimensão gerada pela Análise de Componentes Principais (ACP).	65
Figura 27: Análise de Componentes Principais (ACP) para as variáveis analisadas sensorialmente nas dimensões 1 e 2.	66
Figura 28: Análise de Componentes Principais (ACP) para as variáveis analisadas sensorialmente nas dimensões 1 e 3.	66
Figura 29: Representação das amostras de cachaças brancas fermentadas por diferentes cepas em diferentes ciclos nas dimensões 1 e 2.	67
Figura 30: Representação das amostras de cachaças brancas fermentadas por diferentes cepas em diferentes ciclos nas dimensões 1 e 3.	68
Figura 31: Representação das amostras de cachaças brancas e de suas elipses de confiança (95%) nas dimensões 1 e 2 geradas pela Análise de Componentes Principais.	69
Figura 32: Mapa de preferência gerado a partir das amostras de cachaças brancas.	70
Figura 25: Representação gráfica dos resultados do teste de aceitação em relação aos atributos aroma, sabor e avaliação global demonstrando a frequência (%) entre gostei “moderadamente” e “muitíssimo”.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características físicas e químicas para a aguardente de cana-de-açúcar e cachaça, estabelecidas pela legislação brasileira.....	20
Tabela 2: Índice de retenção, (IR), Limite de Detecção (LD), e Limite de Quantificação (LQ) de congêneres voláteis e contaminantes, e coeficientes de correlação (a, b, r^2) das curvas de calibração em solução alcoólica (40 % v / v).....	34
Tabela 3: Sessões e amostras dos testes sensoriais	35
Tabela 4: Valores de pH, Brix, açúcares redutores totais (ART) e acidez total nos mostos de caldo de cana-de-açúcar referentes aos ciclos das cepas DistilaMax RM (DRM) e CanaMax (CNX). 40	
Tabela 5: Resultados obtidos para Teor alcoólico, pH, Acidez total e Rendimento fermentativo dos vinhos referentes aos ciclos das fermentações com as leveduras DistilaMax RM (DRM) CanaMax (CNX).....	41
Tabela 6: Concentração dos congeners voláteis das cachaças provenientes dos 1°, 3°, 5°, 7°, 10°, 12° e 14° usos da cepa DistilaMax® RM (DRM) e da cepa CanaMax® (CNX) (em g/100mL de álcool anidro).....	57
Tabela 7: Médias de aceitação das amostras de cachaça obtidas em teste de aceitação	72

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO

A cachaça é definida como aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 a 48% vol a 20°C, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcares até 6g/L (BRASIL, 2005). É a quarta bebida destilada com maior produção no mundo, tendo em seu país de origem, uma capacidade produtiva de aproximadamente 1,7 bilhão de litros por ano. No entanto, apenas 1% da produção nacional é exportada. A qualidade desta bebida foi, aos poucos, melhorando com o uso de boas práticas de fabricação, equipamentos adequados e novas tecnologias. Dessa forma, a cachaça foi ganhando valor e novos consumidores, podendo ser atualmente comparada aos melhores destilados do mundo (BORTOLETTO; ALCARDE, 2020).

Considerando-se o ano de 2019, os produtores de cachaça totalizavam-se em 894 estabelecimentos registrados no Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Dentre estes, o estado de Minas Gerais ocupa a primeira posição e em segundo colocado, destaca-se o estado de São Paulo. Evidenciou-se a concentração da produção de cachaça na Região Sudeste com 622 estabelecimento registrados, sendo que Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo e Rio de Janeiro juntos concentram aproximadamente 70% dos produtores de cachaça registrados. O Nordeste e o Sul vêm em seguida com, respectivamente, 14,4 e 11,3% da produção brasileira (BRASIL, 2020).

A cachaça de boa qualidade não deve possuir na composição elevados teores de substâncias prejudiciais ao ser humano, mesmo que estas não danifiquem a qualidade sensorial da bebida (cor, aroma, sabor). Assim, as aguardentes devem ser analisadas físico-química e sensorialmente. (ISIQUE; LIMA-NETO; FRANCO, 2002).

O sabor é uma característica determinante na qualidade de alimentos e bebidas. Os compostos voláteis presentes nas aguardentes, juntamente com o etanol, são grandes responsáveis pelo sabor característico da cachaça. São esses compostos secundários, que também podem ser chamados de congêneres ou compostos voláteis, que distinguem e caracterizam os produtos fermento-destilados e são, assim, os determinantes da qualidade. Boa parte desses congêneres são formados durante a fermentação, e a quantidade formada é definida pela linhagem da levedura empregada (JANZANTTI, 2004).

Oliveira (2001) afirmou que vários fatores interferem na qualidade das bebidas alcoólicas destiladas, como matéria-prima, fermentação, destilação e envelhecimento. Porém, as leveduras e as condições de fermentação foram registradas como os fatores que mais influenciam no sabor das bebidas alcoólicas, devido a ser durante a fermentação que a maioria dos compostos que promovem sabor são formados. Esses compostos se mostram como principais componentes nas

diversas bebidas alcoólicas, independente da matéria - prima utilizada, evidenciando a importância das leveduras na formação do sabor das bebidas alcoólicas.

Tradicionalmente, a produção de cachaça é realizada através do processo fermentativo espontâneo que é mediado por microbiota formada no próprio mosto do caldo de cana e na superfície dos equipamentos utilizados. Foi comprovado que a *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie predominante utilizada na fermentação. Considerando as condições de produção normalmente encontradas em destilarias de cachaça, as cepas fermentativas enfrentam diferentes tipos de estresses (osmótico, altas temperaturas e altas concentrações de etanol) (OLIVEIRA, 2008).

Com a utilização de uma cepa derivada de fermentação espontânea, a cachaça pode sofrer variações na produção, rendimento e qualidade da bebida pois essa prática proporciona fermentações totalmente aleatórias, pois dependem da qualidade e quantidade de microrganismos presentes no caldo (CAMPOS et al., 2010; ALCARDE; MONTEIRO; BELLUCO, 2012).

Nesse contexto, o uso de cepas selecionadas é recomendado, principalmente *S. cerevisiae*, na produção de cachaça pois apresentam características desejáveis principalmente em relação à acidez e concentração de álcoois superiores (SOARES; SILVA; SCHWAN, 2011).

Visando o melhor aproveitamento do processo de fermentação, na indústria de etanol, bem como nas destilarias de cachaça, é realizado o reciclo das células fermentativas. Esse processo proporciona maior concentração de células no início da fermentação e, por isso, é mais rápido do que o processo no qual não é realizado o reciclo. Além disso, o reciclo proporciona uma redução de custos de operação em relação à reposição do fermento e ao consumo de água (LOPES et al., 2016; LIMA, 2004).

O objetivo do estudo foi avaliar a qualidade química e sensorial da levedura comercial DistilaMax RM (*Lallemand Biofuels and Distilled Spirits*) na produção de cachaça com uso de ciclos fermentativos. Cepas esta, destinada à produção de destilados a base de cana de açúcar e ainda não utilizada na produção de cachaça. Além disso, foi possível compará-la com a levedura comercial CanaMax (*Lallemand Biofuels and Distilled Spirits*), já estabelecida na produção de cachaça. Os produtos foram avaliados e comparados através de análise cromatográfica dos compostos voláteis (CG-FID e CG-MS) e carbamato de etila (CG-MS). As aguardentes foram analisadas sensorialmente por meio da união de análise sensorial afetiva e descritiva de avaliação dos atributos sensoriais das cachaças em busca de direcionadores da preferência.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cachaça: aspectos históricos e econômicos

No século XVI o cultivo de cana-de-açúcar começou a ter valor de exploração. Era utilizado, juntamente com a mão-de-obra escrava, para fabricação do açúcar e foi introduzida no Brasil como alternativa ideal de cultivo, devido ao potencial das terras e clima encontradas aqui. Assim, a cana foi sendo introduzida no país pois o açúcar era um produto muito valorizado no período, além de ter a matéria-prima da cachaça, bebida que foi, aos poucos, moldando o cenário do país. Inicialmente, apreciada apenas por cativos, a cachaça passou, ao longo da história, pelas diversas classes sociais e foi, aos poucos, ganhando espaço e se popularizando. Porém, ainda é desafio tornar-se conhecida por sua história, todos os aspectos econômicos e sociais que a circunda, quebrando pré-conceitos e paradigmas (BRAGA; KIYOTANI, 2015).

A produção se iniciou no período colonial após a introdução na Capitania de São Vicente e a montagem do primeiro engenho de açúcar. Até o final da segunda guerra mundial, a cachaça era produzida em pequenas fábricas. Ao longo dos anos começou a aparecer no país um consumidor novo para o produto, e o mercado tem se tornado cada vez mais exigente. Os produtores passaram a se preocupar em agregar mais valor à bebida, tanto em controle de qualidade, como em embalagens mais sofisticadas, com o objetivo de se implantar em melhores pontos de consumo do país, ao lado de outras bebidas destiladas consagradas (MIRANDA, 2005).

Historicamente, os engenhos de açúcar e de cachaça foram as primeiras indústrias do Brasil. A aguardente é uma das mais autênticas expressões da cultura brasileira. Foi por muito tempo pejorativamente mal apreciada pelos ricos, pois era consumida largamente pela população escrava. Ao longo de sua história, deixou o ambiente das senzalas dos engenhos de açúcar e começou a frequentar as mesas da classe média e da elite brasileira, transformando-se na bebida nacional e em importante produto na engrenagem industrial e comercial do país (SANDRE, 2004).

Visto o ponto alto da cana-de-açúcar na economia, era previsível que seus derivados, como o açúcar, o melão, a rapadura e a cachaça tivessem destaque na cozinha brasileira. Inicialmente, a cachaça participou da culinária brasileira acompanhando pratos das cozinhas mineira e nordestina. Sua mistura com suco de frutas deu origem à variados licores e batidas como a caipirinha. No passado, pouco se sabia sobre o uso da cachaça na culinária, apenas aparecendo como aperitivo ou acompanhamento de pratos regionais. Porém atualmente, com a evolução da gastronomia brasileira, a cachaça está experimentando uma nova fase de ascensão sendo utilizada na forma de molhos, de temperos ou flambados conferindo sabor apurado (SILVA, 2018).

É considerado que o Brasil tem capacidade instalada de produção de cachaça de aproximadamente 1,2 bilhão de litros anuais. Porém, se produz anualmente menos de 800 milhões de litros. São 11.024 estabelecimentos produzindo a bebida no país, mas existem estimativas somadas de associações regionais que chegam a quase 15 mil estabelecimentos. Mas, corretamente registrados no Ministério de Agricultura e Receita Federal são cerca de 1.500 estabelecimentos, com 4.000 marcas. Isto demonstra que, embora 90% da produção em volume seja legalizada, avalia-se que 85% dos produtores, na maioria micro e pequenos, sejam informais. Os principais estados consumidores são: São Paulo, Pernambuco, Rio de Janeiro, Ceará, Bahia e Minas Gerais (IBRAC, 2019a).

Em relação ao mercado externo, no ano de 2018, a cachaça foi exportada para 77 países, com mais de 50 empresas exportadoras, gerando receita de US\$15,61 milhões (8,41 milhões de litros). Esses números representam queda de 1,24% em valor e de 3,80% em volume, em comparação a 2017. Em 2018, os principais países de destino em valor foram: Estado Unidos, Alemanha, Paraguai, Portugal e Itália. Em se tratando das exportações por Estado, em 2018, os cinco principais estados exportadores em termos de valores foram: São Paulo, Pernambuco, Rio de Janeiro, Paraná e Ceará. Em quantidade exportada, os cinco principais estados exportadores foram: São Paulo, Pernambuco, Paraná, Rio de Janeiro e Ceará (IBRAC, 2019b).

Fato é que, por muitos anos, a cachaça foi desprezada, provavelmente por ter surgido no cotidiano de escravos e pobres, e principalmente quando comparada com bebidas a mais tempo estabelecidas no mercado internacional. Hoje, a aguardente brasileira começa a expandir seus domínios, mostrando ótimo potencial para enriquecimento da cozinha brasileira e a permanência em ser a bebida mais popular do País, prova sua força enquanto patrimônio e um dos principais componentes da identidade brasileira, sobretudo quando se trata dos aspectos gastronômicos (SILVA, 2018; TAVARES; DA PAZ DANTAS; DE MENDONÇA NÓBREGA, 2015).

2.2. Processo de produção

2.2.1. Preparo da matéria prima e correção do mosto

Após determinado o estágio de maturação da cana-de-açúcar, o corte manual é realizado com auxílio de um facão bem rente ao solo e a parte superior do colmo (palmito) é eliminada. Previamente, há o despalhe manual ou a fogo, antes da colheita. Por mais que este último modo seja difundido, a prática vem sendo recriminada devido aos inconvenientes ambientais que acarreta e à exsudação de sacarose, o que afeta o rendimento final da produção da bebida. A cana é levada à moagem que consiste em um processo de desintegração, visando destruir a resistência da parede

dura da cana (casca e nós) e romper o maior número de células parenquimatosas que armazenam o caldo. (NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2005).

O caldo segue para a filtração e decantagem, pois a presença de materiais estranhos pode acarretar sérios problemas na fermentação. Essas impurezas podem vir do campo ou bagacilhos do próprio caldo. A filtragem é feita utilizando uma tela (filtro) na saída da bica, junto ao decantador. O decantador possui divisões as quais o caldo decanta o material que passou pela tela, sendo que na última o caldo sai praticamente limpo, estando em boas condições de medir-se os sólidos solúveis (Brix) inicial, que é fundamental para a determinar a quantidade de água que será utilizada para a diluição do caldo para o preparo do mosto. A diluição é o processo em que o teor de sólidos é reduzido à 14 e 16 °Brix. Isso ocorre com a adição de água de boa qualidade na dorna de diluição (VIANA, 2008; EMBRAPA, 2019).

2.2.2. Fermentação

Ao misturar o inóculo ao mosto, inicia-se o processo de fermentação alcoólica dos açúcares fermentescíveis presentes. O começo do processo é caracterizado pelo desprendimento do gás carbônico, passando a multiplicar as células do fermento e a produção de álcool. Dessa forma, à medida que o açúcar se transforma em etanol, o valor dos sólidos solúveis diminui. Em seguida, inicia-se a fase tumultuosa, que permanece por volta de doze a dezesseis horas. Rapidamente a temperatura se eleva, a densidade do mosto reduz e eleva-se a percentagem do álcool e a acidez. O substrato agita-se como se estivesse em ebulição. Ao fim dessa etapa, o teor de álcool atinge quase o máximo. Nessa fase é necessário o controle da temperatura que não deve ultrapassar 35°C, com intuito de evitar perdas e contaminações (AMORIM; LEÃO, 2005).

A temperatura tem influência no desenvolvimento da levedura de acordo com o tipo, idade das células e reação do meio. A temperatura adequada está entre 25 e 35°C. Abaixo da temperatura mínima, a fermentação se encontrará paralisada. Porém, a célula não é destruída pois a levedura é resistente a até 130°C abaixo de zero Celsius. As atividades retomam quando são novamente recolocadas em condições favoráveis de vida. Porém, em temperaturas mais altas que 35°C, a levedura pode atingir a zona mortal, por isso, a pequena elevação da temperatura pode tornar-se perigosa (LIMA, 1999) e deve ser evitada.

Após a fermentação, o mosto passa a ser denominado vinho que deve ser isento de açúcares redutores ou apresentar o mínimo teor de açúcares infermentados. Deve acusar acidez sulfúrica entre 2 e 3 gramas por litro, e pH variável de 3,8 a 4,8, com mínimo de acidez volátil. O teor alcoólico deve variar de 6 a 8% (AQUARONE et al., 2001).

É durante a fermentação que ocorre a transformação de açúcares simples, como glicose e frutose, em álcool. A sacarose, também presente e em maior quantidade no caldo, é hidrolisada em açúcares simples para fermentação através das leveduras. Nessa fase, o caldo é chamado de mosto. Além disso, necessita de atenção pois é nela que serão formados os compostos secundários que serão capazes de afetar o produto final (VIANA, 2008; OLIVEIRA, 2011).

Para que haja resultados positivos na fermentação, o mosto precisa satisfazer determinadas condições, ser proveniente de caldo de cana sadio, com baixa concentração inicial de microrganismos contaminantes e concentração correta de açúcares fermentescíveis. O mosto deve, teoricamente, ser isento de microrganismos, o que seria possível somente através de esterilização do meio. Porém a esterilização não é comumente feita, por isso deve-se tomar medidas para que o meio de fermentação seja bastante favorável à levedura alcoólica. Um mosto com baixa contaminação é possível através do uso de medidas de asseio na fabricação. No entanto, nas grandes instalações essa assepsia não é muito simples, porque as grandes quantidades de matéria-prima manipuladas, por caminhões trazem muitas quantidades de impurezas para a destilaria, incluindo grande quantidade de solo e areia (AQUARONE et al., 2001).

Na fermentação utiliza-se da levedura *S. cerevisiae*, comumente encontrada em supermercados e padarias. Em fábricas pequenas, é comum a utilização do fermento caipira feito pelo próprio produtor à base de garapa (caldo de cana) e fubá, ou outros materiais como farelo de arroz. Independente do fermento usado, o processo deve ser concluído em, aproximadamente, 24 horas. Usualmente, verifica-se o fim da fermentação quando o caldo começa a soltar borbulhas de forma uniforme e com leve aroma de frutas. O vinho é retirado das dornas de fermentação e levado diretamente para a destilação em alambiques (EMBRAPA, 2019).

O ciclo fermentativo completa-se, quando todo o fermento que estava flutuando no líquido, se decanta. Esse processo é necessário para que não haja presença de fermento durante a destilação, o que pode afetar a qualidade final do produto. Também é a forma de separar o vinho do levedo, facilitando o reaproveitamento do pé-de-cuba em outras fermentações (SOUZA et al., 2013).

2.2.2.1. Levedura selecionada

O uso de leveduras selecionadas como inóculo fermentativo destinado à produção de cachaça, tem se mostrado muito importante quando existe o objetivo da obtenção de um destilado que atenda aos padrões de qualidade (CARDOSO, 2013; MUTTON; MUTTON, 2016). O fermento selecionado consiste em cepas de leveduras isoladas do processo de produção de

cachaça que demonstraram características favoráveis em testes de laboratório em relação ao rendimento e à produtividade fermentativa, tolerância à temperatura, acidez e teores alcoólicos e quanto a qualidade química e sensorial do vinho produzido (BORTOLETTO; ALCARDE, 2020).

Segundo Rosa, Soares Júnior e Faria (2016), a utilização de linhagens selecionadas de *S. cerevisiae*, agrega ganho de qualidade sensorial à bebida e evita perdas com dornas contaminadas, muito comuns com a utilização de fermento caipira. Normalmente, o fermento selecionado é produzido de forma desidratada e pode começar a produzir cachaça em até 24 horas após o início da propagação. Diferente da preparação do fermento caipira, que leva de 5 a 10 dias, o que pode atrasar a produção.

No mercado, existem algumas leveduras selecionadas utilizadas na fermentação de cachaça, dentre elas, a cepa UFMG 100. *S. cerevisiae* selecionada no Brasil pela Universidade Federal de Minas Gerais, que é comercializada com o nome de CanaMax. Dentre suas características, estão: boa tolerância à estresse osmótico e boa performance em condições adversas de até 40°C e pH entre 3,4 e 5,3 (LALLEMAND BIOFUELS & DISTILLED SPIRITS, 2021a).

Outra levedura *S. cerevisiae* selecionada é a DisitlaMax RM. Esta cepa foi selecionada para o uso na produção de rum e outros destilados à base de cana de açúcar. Foi isolada do melaço de cana em uma região tropical e esta linhagem demonstra tolerância à altas temperaturas e fornece desejável coeficiente de congêneres para a produção de rum, aguardente e rum agrícola. O uso desta cepa fornece suavidade desejável e frutado clássico para bebidas destiladas (LALLEMAND BIOFUELS & DISTILLED SPIRITS, 2021b).

2.2.2.2. Reciclo de levedura

Os maiores produtores de etanol são o Brasil e os Estados Unidos, porém, além da matéria-prima, seus processos de produção se diferenciam devido ao reciclo de células fermentativas (LOPES et al., 2016).

O processo brasileiro de fermentação é diferenciado pois as células de levedura são intensivamente reutilizadas (>90% da levedura é reciclada de uma fermentação para a outra), resultando em alta densidade celular dentro do fermentador, o que contribui para uma fermentação em curto tempo (BASSO et al., 2008; WHEALS et al., 1999).

Devido ao inóculo ser um creme rico em células e pobre em açúcares, a fermentação inicia-se de imediato. Assim, praticamente não há fase *lag*, e sim, fermentação principal desde o início da adição do mosto. Daí, o processo segue uniformemente, menos intenso, com menos espuma e menos perda de álcool (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Porém, no processo, os microrganismos contaminantes também são reciclados e isso pode agravar os problemas associados com a contaminação bacteriana, pois devido a fatores como temperatura, acidez, concentração de açúcares e de nutrientes, entre outros que ocorrem durante a fermentação alcoólica, há o desenvolvimento de muitos microrganismos como bactérias e várias espécies de leveduras selvagens (CHERUBIN, 2003).

Na produção de cachaça, o reuso de células segue um processo semelhante ao da produção de etanol e é um dos preferidos pelos produtores da bebida. É realizado por decantação das células que se depositam no fundo do fermentador. Ao final de cada fermentação, o vinho é separado para destilação e com o fermento depositado, inicia-se uma nova fermentação. Por vezes, alguns produtores realizam a reativação ou o revigoramento do fermento, por meio do abaixamento do pH, para reduzir a quantidade de bactérias contaminantes. (MUTTON; MUTTON, 2016).

Este processo baseado no reaproveitamento de células de levedura de uma fermentação anterior é chamado Melle-Boinot. A separação das leveduras do mosto é feita por centrifugação através da diferença de dimensões e densidades. Assim, bactérias presentes no mosto são arrastadas com o vinho, conferindo elevada pureza à biomassa de leveduras resultante. Ao sair da centrífuga, o fermento sofre tratamento com ácido sulfúrico, tonando o meio desfavorável à presença de bactérias e leveduras mortas. Após o tratamento, o fermento retorna ao processo de fermentação na forma de pé-de-cuba (NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2005).

Já o processo Melle-Boinoit-Almeida, é uma modificação do processo Melle-Boinot, o qual consiste em aguardar a decantação de maior parte das células de leveduras no fundo da dorna, após o término da fermentação, enviando o vinho sobrenadante à centrífuga. Esse vinho delevurado segue para destilação, enquanto o leite de leveduras é corrigido quanto a acidez, colocando as leveduras em atividade (NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2005).

2.2.3. Destilação

É o processo de volatilizar líquidos através do aquecimento, condensando-os em seguida, objetivando a purificação ou formação de produtos novos por decomposição das frações. Nesse processo, é possível separar os compostos voláteis (água, álcool etílico, aldeídos, álcoois superiores, ácido acético, etc.), dos não voláteis ou fixos (células de leveduras, bactérias, sólidos em suspensão, sais minerais, açúcares não fermentescíveis e proteínas, entre outros resíduos), obtendo-se duas frações, conhecidas como flegma e vinhaça (MUTTON; MUTTON, 2016).

No início da destilação em alambique, realiza-se a separação da fração “cabeça” correspondente a 1 a 2% do volume útil da caldeira. A fração “coração”, que dará origem ao destilado final, corresponde ao produto recuperado após a fração “cabeça”, até que o teor alcoólico do destilado na saída do condensador atinja 38 a 40% (v/v), tendo como resultado uma concentração alcoólica média entre 42 e 48% nesta fração do destilado. A fração “cauda”, é destilada após a fração “coração” e até que o destilado na saída do condensador apresente ausência de etanol. Além disso, é importante que as frações “cabeça” e “cauda” sejam separadas, pois, em geral, possuem compostos que depreciam a qualidade da bebida (BORTOLETTO; ALCARDE, 2020).

As aguardentes recém-destiladas podem apresentar sabor agressivo, além de buquê irregular, não sendo indicadaS para o consumo imediato. Por isso, recomenda-se o descanso da bebida, podendo ser armazenada em tonéis de madeira, que resulta em alteração de cor e melhoria de aroma e sabor. Após a destilação, a aguardente pode passar por filtros ou membranas, com o objetivo de eliminar impurezas, ou corrigir possíveis defeitos. Por fim, o o destilado é engarrafado (MUTTON; MUTTON, 2016).

Durante todo o processo de produção, a cachaça deve seguir um processo de padronização, que consiste no estabelecimento de um padrão uniforme para a bebida produzida durante toda safra. O produtor, portanto, deve estabelecer as características do processo e equipamentos empregados mediante a elaboração de um projeto, determinando todos os parâmetros desejados para que a bebida esteja sempre dentro dos padrões de qualidade (MUTTON; MUTTON, 2016).

2.2.3.1. Compostos secundários formados na produção da cachaça

Os compostos secundários, denominados coeficiente de congêneres, são os componentes voláteis “não etanol” desenvolvidos no processo de produção da cachaça. Estes são formados, em parte, no processo de fermentação em quantidades menos relevantes que o etanol e o gás carbônico. Tais compostos são ácidos carboxílicos, metanol, ésteres, aldeídos e álcoois superiores. Os mesmos têm, portanto, ativa participação na definição de aroma e sabor das bebidas destiladas (BORTOLETTO; ALCARDE, 2020).

O coeficiente de congêneres é a soma de acidez volátil (expressa em ácido acético), aldeídos (expressos em acetaldeído), ésteres totais (expressos em acetato de etila), álcoois superiores (expressos pela soma do álcool n-propílico, álcool isobutílico, e álcoois isoamílicos) e furfural + hidroximetilfurfural. A soma dos congêneres não deverá ficar abaixo de 200 mg e nem acima de

650 mg por 100 mL de álcool anidro, sendo que os componentes do coeficiente de congêneres, devem ser observados os limites de acordo com a Tabela 1 (BRASIL, 2005), para cachaça de boa qualidade.

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

Componente	Limites	
	Mínimo	Máximo
Acidez volátil, expressa em ácido acético em mg/100 ml de álcool anidro	-	150
Ésteres totais, expressos em acetato de etila, em mg/100 ml de álcool anidro	-	200
Aldeídos totais, em acetaldeído, em mg/100 ml de álcool anidro	-	30
Soma de Furfural e Hidroximetilfurfural, em mg/100 ml de álcool anidro	-	5
Soma dos álcoois isobutílico (2-metil-propanol), isoamílicos (2-metil -1-360- butanol +3 metil-1-butanol) e n-propílico (1- propanol), em mg /100 ml de álcool anidro	-	360

A qualidade e a aceitabilidade sensorial da bebida estão diretamente relacionada à fração volátil da cachaça. A composição da fração volátil da bebida é influenciada por todas as etapas do processo de produção. A água e o etanol pouco influenciam no sabor e o aroma, por mais que sejam os componentes principais da bebida. São os compostos secundários que definem a percepção sensorial da cachaça. Os álcoois, os ésteres e os ácidos são os grupos de compostos que mais influenciam neste sentido, seguido pelos aldeídos, compostos sulfurados e fenólicos (BORTOLETTO; ALCARDE, 2020).

Segundo Moreira, Netto e De Maria (2012), o acetato de etila e o lactato de etila são os ésteres mais presentes na bebida. Aldeídos como o acetaldeído, o propenaldeído e o furfural podem apresentar características negativas no sabor da bebida. O ácido acético é o ácido majoritário das bebidas destiladas etem grande influência sobre o aroma e o sabor da bebida sendo associado ao odor penetrante e irritante, comumente comparado ao odor de vinagre.

2.2.3.1.1. Acidez volátil

A acidez volátil é expressa em ácido acético o qual representa o principal ácido orgânico encontrado nas cachaças e compõe 90 a 93% do total de ácidos da bebida. É considerado

importante fator quando avaliada a qualidade do destilado, pois quanto menor a acidez, maior aceitação sensorial. A formação é favorecida quando há presença de bactérias acéticas, além disso, a produção pelas leveduras é estimulada quando é realizada a aeração do mosto durante a fermentação (BORTOLETTO; ALCARDE, 2020; MUTTON; MUTTON, 2016).

É um composto formado pela maioria das espécies de leveduras durante a fermentação, porém algumas cepas produzem mais do que outras. O ácido acético pode contribuir com sabor e aroma azedo-avinagrado. Uma alta concentração desse composto é o possível resultado do metabolismo do etanol por bactérias acéticas. Esse ácido também pode ser indicador de que as leveduras estão lutando para sobreviver ao meio fermentativo estressante (BUGLASS, 2011).

2.2.3.1.2. Ésteres totais

2.2.3.1.2.1. Acetato de etila

O acetato de etila, assim como o butanoato de etila são ésteres alifáticos, ou seja, originam-se durante a fermentação alcoólica através do metabolismo secundário intracelular das leveduras (NASCIMENTO; CARDOSO; FRANCO, 2009).

Segundo Lima (2006), esse composto é responsável pelo aroma típico, agradável e suave da cachaça. O mesmo, em pequenas quantidades incorpora um aroma agradável de frutas, porém em grandes quantidades confere sabor enjoativo e desagradável.

2.2.3.1.2.2. Lactato de etila

Segundo Nascimento, Cardoso e Franco (2009), em 2008, foi relatada pela primeira vez a presença do éster lactato de etila em aguardentes, ressaltando-se que este era o segundo éster mais abundante na cachaça. A presença está relacionada com a contaminação do mosto por bactérias (*Lactobacillus spp.*) responsáveis pela fermentação láctea, que é favorecida pelo controle deficiente da fermentação alcoólica. A origem das bactérias lácticas está associada à matéria-prima (cana-de-açúcar, levedura e água) e ao local de produção da bebida. Portanto, a presença do lactato de etila é indicador da qualidade da fermentação.

Tem o ácido láctico como precursor, o qual não é produzido por leveduras, indicando a presença de bactérias lácticas contaminantes na fermentação. A presença está associada à positiva contribuição para aroma e sabor de bebidas alcoólicas (ALCARDE, 2017).

Ao comparar técnicas obtidas de determinação de ésteres em cachaças, Nascimento, Cardoso e Franco (2009) concluíram que a técnica de CG/DIC recomendada pelo MAPA para detecção de ésteres não leva em consideração a presença do lactato de etila. Esse composto é o segundo mais abundante, podendo representar até 58% do total de ésteres. Assim, ao comparar essa determinação com os resultados obtidos por CG/EM-MSI, o teor de ésteres analisados segundo as técnicas recomendadas pelo MAPA, é em média, 30% inferior aos teores obtidos por outras técnicas.

2.2.3.1.3. Aldeídos

2.2.3.1.3.1. Acetaldeído

Os aldeídos participam da composição do aroma da cachaça, mas são considerados composição negativa devido ao odor desagradável, na maioria dos casos. Em excesso, são indesejáveis por serem grandes responsáveis pela ressaca. Porém, como esse composto reage facilmente com os álcoois formando aceítas, o odor pungente é reduzido (SOUZA et al., 2006; DOREA et al., 2008).

O acetaldeído é considerado composto carcinogênico em bebidas alcoólicas porém não há dados sistemáticos disponíveis sobre sua ocorrência e sobre o potencial carcinogênico da exposição humana a esta forma de acetaldeído ingerida diretamente fora do metabolismo do etanol (LACHENMEIER; SOHNIUS, 2008).

O Acetaldeído está presente em várias fontes como nas folhas do tabaco, no aroma de frutas como: pêra, maçã, morango e abacaxi; no óleo essencial de magnólia, alecrim, bálsamo, cânfora e mostarda. Nas bebidas, esse composto é formado durante o processo fermentativo (BURDOCK, 2002).

2.2.3.1.3.2. Furfural e hidroximetilfurfural

São formados, principalmente durante a destilação do vinho a partir de pentoses surgindo como um produto de cauda. Assim, o vapor permite um aquecimento mais uniforme, evitando o superaquecimento o qual afeta bastante a concentração desse composto no destilado (FARIA et al., 2003).

Segundo Oliveira Filho, Bortoletto e Alcarde (2016), o desempenho da levedura no processo de fermentação contribui para a formação de furfural durante a destilação, pois observou-

se que a produção deste composto foi proporcional ao aumento de açúcares residuais presentes no vinho.

Além disso, o furfural e o hidroximetilfurfural podem se originar no próprio caldo de cana, caso a colheita seja precedida de queima prévia o que pode acarretar a geração de açúcares livres (pentoses e hexoses) no caldo, cuja degradação origina-se na formação desses compostos, sendo que a degradação das pentoses leva a formação do furfural e a deterioração das hexoses forma o hidroximetilfurfural. Esses compostos são conhecidos por serem marcadores de processos térmicos, ou seja, quando determinado produto que contém açúcares passa por alguma etapa de aquecimento, há o aumento na formação de furfural e hidroximetilfurfural, dentre outros compostos (MILANI, 2016; MESÍAS-GARCÍA; GUERRA-HERNÁNDEZ; GARCIA-VILLANOVA, 2010; CIESAROVÁ et al., 2009; RAJCHL et al., 2009; CATTANEO et al., 2015; AQUINO et al., 2006).

Durante o processo de produção, o furfural pode ser transferido para a aguardente a partir da queima do palhço da cana-de-açúcar. Além disso, durante a destilação, o superaquecimento do alambique promove a pirogenação da matéria orgânica depositada no fundo do destilador, como resíduos de levedura, tornando-se comum a presença no furfural em meio à estas práticas. Para evitar a presença destes compostos, recomenda-se controlar o conteúdo de açúcar do vinho na final da fermentação e esperar até o fim da fermentação (0°Brix) para começar a destilação. Além disso, a maior parte destes compostos se encontram na fração “cauda”, os quais são simplesmente removidos ao realizar o corte desta fração (MASSON et al., 2007; BORTOLETTO; SILVELLO; ALCARDE, 2018).

2.2.3.1.4. Álcoois superiores

Os álcoois superiores são considerados os componentes mais abundantes entre os compostos secundários. O butanol, isobutanol, amílico, isoamílico e propanol são os álcoois superiores mais comumente encontrados em cachaças. A formação está intimamente ligada às condições de fermentação, como temperatura, pH e presença de oxigênio, além da cepa de levedura utilizada. A presença desses compostos é mais comum em cachaças destiladas em alambique do que em cachaças produzidas por destilação de colunas, pois as colunas são capazes de separar parcialmente os álcoois superiores dos vapores alcoólicos (LIMA, 2006; BORTOLETTO; ALCARDE, 2020).

A presença de n-propanol influencia negativamente no sabor da cachaça, estando presente em aguardentes de qualidade inferior. Seus teores podem ser reduzidos através da bidestilação, em

caso de operação intermitente, fracionando-se o destilado com subsequente remoção da fração cabeça, denominada a fração mais volátil. Porém, quando são excessivamente formados nos destilados, são impossíveis de remover, sendo o descarte do produto bastante recomendado (BOZA; HORII, 1998; BORTOLETTO; SILVELLO; ALCARDE, 2018).

Observou-se que a produção de álcoois superiores se deve a aminoácidos presentes no meio e que a composição (concentração de açúcar, pH, concentração e tipo de fonte de nitrogênio) influencia a quantidade formada. A temperatura, o grau de aeração e a linhagem da levedura também podem contribuir para a formação de álcoois superiores. Verificou-se também, que a produção de n-propanol está relacionada ao metabolismo de metionina e de treonina os quais são reguladores das rotas metabólicas de compostos sulfurados. As linhagens de leveduras capazes de produzir maiores concentrações de propanol são também aquelas que produzem pouca ou nenhuma concentração de sulfeto de hidrogênio (BOZI E HORII, 1998; GIUDICI; ZAMBONELLI; KUNKEE, 1993).

2.2.3.1.5. Metanol

O metanol é um álcool, cuja presença em bebidas destiladas está diretamente ligada à pectina contida na matéria-prima da bebida. Com isso, a concentração varia a depender do tipo de destilado. Durante o processo das bebidas destiladas, a pectina presente na matéria-prima é degradada pelas enzimas naturalmente ali presentes. Essa degradação que acontece no início da fermentação, gera a formação de quantidades significantes de metanol (BLINDER; VOGES; LAUGEL, 1988).

Por ser bastante tóxico, o metanol presente nos destilados, forma CO_2 por processo oxidativo causando acidose no sangue o que pode levar ao coma ou até a morte. Além disso, altas concentrações deste composto pode acarretar toxicidade ocular a nível da retina intervindo no processo visual (DÓREA et al., 2008; CARDOSO, 2006; BLINDER; VOGES; LAUGEL, 1988).

Porém, como o teor de matérias pécicas é muito baixo, o teor de metanol, é respectivamente baixo na cachaça, não comparável ao teor em destilado de frutas que geralmente possuem alto teor de pectina (MIRANDA; HORII E ALCARDE, 2006).

2.2.3.1.6. Carbamato de Etila

O carbamato de etila é um ester etílico ácido carbâmico, também chamado de uretana que pode ser encontrado em bebidas fermentadas, bem como em alimentos como pão e iogurte. É um

composto tóxico e potencialmente cancerígeno. No processo de produção da cachaça, a formação ocorre durante a fermentação pela reação entre o álcool etílico e os compostos nitrogenados, ou ainda durante os processos de destilação (NOVAES, 2009; MUTTON; MUTTON, 2016; ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002).

Com o objetivo de diminuir a formação deste composto, a adoção de boas práticas de fabricação, tais como o tratamento físico-químico do caldo e a red destilação da aguardente, bem como o controle da temperatura da destilação podem reduzir significativamente a presença deste contaminante na bebida (MUTTON; MUTTON, 2016; BORTOLETTO; SIVELLO; ALCARDE, 2018).

2.3. Análise sensorial

O campo de análise sensorial cresceu rapidamente na segunda metade do século XX, juntamente com a expansão do alimento processado e das indústrias de alimentos. A avaliação sensorial compreende um conjunto de técnicas que dão precisão à medição das respostas humanas aos alimentos e minimizam o potencial efeito preconceitual da identidade das marcas e outras informações que possam influenciar a percepção do consumidor (LAWLESS; HEYMANN, 2010)

A análise de alimentos e bebidas é influenciada pelas propriedades sensoriais de aparência, aroma, sabor e textura. As propriedades sensoriais dos alimentos são mediadas por todos os nossos sentidos incluindo visão, tato, audição, paladar e olfato assim como, dor e temperatura. A maioria das percepções humanas relacionadas a alimentos se tornam mais familiares de acordo com a repetição à exposição desse produto durante a vida. Por mais que normalmente a avaliação da qualidade sensorial seja centrada no entendimento da percepção sensorial, as sensações e sentimentos não devem ser deixadas de lado (PIGGOT, 2012).

2.3.1. Teste RATA (*Rate All That Apply*)

Rate-All-That-Apply é uma variação do questionário CATA no qual consumidores são solicitados a indicar quais termos de uma lista se aplicam para descrever um determinado produto e, se o fazem, para avaliar sua intensidade. Com as perguntas RATA e a geração de classificações de atributo, surgiu a oportunidade de criar índices somados de respostas que levam em consideração a intensidade dos atributos, aumentando assim, a capacidade discriminativa das questões RATA (VIDAL et al, 2018; ARES et al.; 2014).

O teste CATA (*Check-All-That-Apply*) foi originado de um trabalho de Coomb (1964) construído sob o ideal de perfil de livre escolha, uma técnica que permite que os participantes utilizem os próprios atributos. As questões consistem em lista de atributos as quais os participantes devem selecionar os que considerarem apropriados para descrever o produto. Os produtos são apresentados, um de cada vez para que o avaliador os analise separadamente e marque os termos que melhor os descrevem. Esse método gera descrição direta dos produtos, e tem a vantagem de não necessitar consumir tanto tempo quanto os métodos clássicos (VALENTIN et al., 2012).

Ares et al. (2014) inicialmente exploraram esse método com objetivo de investigar a possibilidade de usar classificações de atributos como uma variante das questões CATA a fim de envolver os participantes em um maior processo cognitivo e melhorar a discriminação e a descrição das amostras. O RATA sugere aumentar a capacidade discriminativa das perguntas do teste CATA ao medir a resposta emocional dos avaliadores.

Essa abordagem foi sugerida por NG, CHAYA e HORT (2013), ao pesquisarem sobre uma bebida à base de groselha preta com o objetivo de avaliar a eficácia da abordagem CATA em comparação com a escala de intensidade. O estudo mostrou que ambas abordagens geraram dados emocionais que claramente discriminavam os produtos de forma mais eficaz do que as pontuações hedônicas. A abordagem CATA forneceu uma lista rica e equilibrada de emoções positivas e negativas específicas para o produto avaliado, porém faltaram termos diferenciadores e sua natureza qualitativa limitou a análise estatística. Assim, foi sugerida uma abordagem híbrida onde é desenvolvido um dicionário emocional, e usado para avaliar produtos através do processo do RATA.

O formato do questionário CATA permite que os consumidores escolham todos os atributos disponíveis na lista para descrever o produto. Isso é diferente de escalar, no sentido de que nenhuma intensidade é dada aos atributos. Este tipo de metodologia tem a vantagem de coletar informações sobre os atributos percebidos do produto sem exigir escala, permitindo uma descrição mais direta das principais propriedades sensoriais do produto (DOOLEY; LEE; MEULLENET, 2010).

Por mais que o CATA seja um método de fácil reprodutibilidade e rápido, suas questões apresentam algumas limitações como seus dados dicotômicos (1/0) que não permitem discriminar amostras pouco diferentes sensorialmente. Visto isso, o RATA foi sugerido como um método pelo qual os avaliadores são obrigados a avaliar a intensidade do produto, o que evidenciou sua maior capacidade discriminativa. O maior poder de discriminação é importante ao trabalhar com pequenas equipes e/ou quando as diferenças sensoriais entre as amostras são sutis (GIACALONE; HEDELUND, 2016).

Jaeger e Ares (2015) ao pesquisarem se o uso concomitante de perguntas RATA está associada ao viés dos escores hedônicos, percebeu que quando as perguntas foram usadas simultaneamente com uma questão hedônica havia uma forte tendência para uma maior discriminação entre as amostras. Isso sugeriu que a capacidade discriminativa da questão hedônica foi aumentada pela inclusão da pergunta RATA, aumentando o envolvimento e a atenção dos consumidores à tarefa.

Opperman et al. (2016), utilizaram o método RATA com o objetivo de investigar os perfis sensoriais de dez modelos de emulsões com diferenças sutilmente perceptíveis com 80 avaliadores não treinados. Para isso foram seguidas duas abordagens de análises diferentes e em seguida comparados com os resultados obtidos na Análise Descritiva com 11 avaliadores treinados. Em geral, obtiveram resultados semelhantes entre os dois testes, mas que essas semelhanças devem ser interpretadas com cautela e necessitam de mais estudos em relação à como os consumidores interpretam as escalas do RATA.

Em estudo com bebidas usando o teste CATA, Jaeger et al. (2020) perceberam que essa análise é apropriada para caracterizar sensorialmente esses produtos com os consumidores, porém, suas questões precisam ser selecionadas com grande cautela, visto que nem sempre será possível obter a discriminação desejada da amostra devido à natureza binária das respostas. Por isso, concluíram que as perguntas CATA são capazes de discriminar as amostras em relação a atributos de interesse, porém seu formato impede a discriminação entre as amostras quando as intensidades são muito baixas e/ou muito altas. Nesses casos, sugerem que as perguntas RATA oferecem vantagens.

2.3.2. Teste de aceitação

O teste de aceitação visa determinar o grau de aceitabilidade global de um produto, identificar fatores sensoriais determinantes da preferência ou medir respostas específicas a atributos sensoriais particulares de um produto. Essa é a avaliação escolhida quando deseja-se determinar o “*status* afetivo” de um produto, ou seja, quão bem é apreciado pelos consumidores (DUTCOSKY, 2013; MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2016).

Segundo Lawless e Heymann (2010), os testes de aceitabilidade não requerem uma escolha de alternativas. Em comparação aos testes de preferência, os de aceitação fornecem a informação sobre “gostar” ou “não gostar” do produto de forma absoluta. A quantificação do teste de aceitabilidade é feita através de escalas, sendo a escala hedônica de 9 pontos, popularizada em 1940, a mais comum.

A escala hedônica avalia a resposta de um grupo de consumidores a uma série de perguntas que visam a determinar o grau de aceitabilidade global de um produto, identificar fatores sensoriais determinantes da preferência ou medir respostas específicas a atributos sensoriais particulares de um produto. A escala hedônica de 9 pontos é a mais utilizada para estudos de preferência com adultos e a análise estatística dos resultados é realizada por análise de variância (ANOVA) para saber se existe ou não diferença no nível de aceitabilidade entre amostras, ou rejeição (DUTCOSKY, 2013).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram produzidas cachaças, utilizando duas cepas da levedura *S. cerevisiae* (DistilaMax® RM e CanaMax®) fabricadas pelo laboratório Lallemand Biofuels & Distilled Spirits.

A primeira cachaça foi produzida a partir do primeiro uso da cepa, e as outras foram fermentadas a partir do reciclo desta mesma cepa. Foram realizados 14 ciclos para cada levedura, e as cachaças foram obtidas a partir do 1º, 3º, 5º, 7º, 10º, 12º e 14º usos. Cada cepa teve, portanto, 07 cachaças para serem avaliadas. Após a produção, as amostras foram analisadas quimicamente e sensorialmente, com o objetivo de compará-las visando a semelhança entre os tratamentos. Os tratamentos das duas cepas foram realizados ao mesmo tempo e a destilação de cada fermentação foi realizada em triplicata. A Figura 1 mostra os processos que foram realizados.

Fonte: Autor

Figura 1: Fluxograma de produção das cachaças e análises realizadas.

3.1. Elaboração das cachaças

A elaboração e análises das cachaças foram realizadas no Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP). Sendo a produção das cachaças realizada na Destilaria Piloto.

3.2. Preparo do mosto

O mosto do caldo de cana foi obtido a partir da moagem de colmos de cana-de-açúcar da variedade CTC - 15, provenientes do cultivo nas dependências do LAN. Após a moagem, o caldo foi filtrado em tecido de algodão para a retirada de impurezas grosseiras, tais como resíduos de terra e bagacilhos. O líquido foi ajustado para 18 °Brix mediante adição de água filtrada e aquecido até 30 °C para o início das fermentações (BORTOLETTO; ALCARDE 2020).

3.3. Fermentação

Os baldes foram previamente higienizados e sanitizados para garantir que houvesse apenas a atividade das cepas selecionadas nos caldos. O processo de fermentação foi realizado em temperatura ambiente, a qual permaneceu entre 28-32 °C, seguindo o protocolo indicado pelo fabricante das cepas de levedura. O acompanhamento da temperatura foi feito com o auxílio de termômetro digital infravermelho com leitura instantânea e a leitura do °Brix do caldo foi realizada utilizando refratômetro portátil digital modelo Reichert AR200. O processo seguiu em fermentadores de prolipropileno de 35L com tampa.

As cepas foram escolhidas para este estudo pois foram selecionadas para a produção de bebidas destiladas à base de caldo de cana. O desempenho e uso na produção de cachaça ainda não foram testadas para as cepas DistilaMax RM. O processo da destilação foi conduzido em triplicata e igualmente em todos os tratamentos. Para a cepa DistilaMax RM, inoculou-se 0,60g/L, em massa seca e 0,50 g/L para cepa Canamax, ambas leveduras liofilizadas. Esse inóculo foi adicionado na primeira fermentação e as próximas seguiram sem retirada ou adição de leveduras. Para a hidratação da levedura, utilizou-se água filtrada a 33°C. Os dois tratamentos seguiram as recomendações do fabricante

Nenhum tratamento foi realizado na biomassa resultante entre as fermentações. As fermentações finalizaram quando todo o açúcar foi metabolizado em álcool pelas leveduras e o

fermento havia decantado no fundo do fermentador (SOUZA et al., 2013). O tempo de fermentação foi monitorado ao final de cada ciclo, quando toda a levedura havia decantado e a leitura do grau Brix atingiu valores próximos à zero.

3.4. Destilação

Triplícatas de cada tratamento foram conduzidas em alambique simples de cobre (Figura 2) com volume útil de 10 L, utilizando chama direta a gás e vazão de, em média, 3mL/seg.

Fonte: Stupiello (1992)

Figura 2: Esquema do alambique simples utilizado na produção das cachaças.

Os mostos fermentados foram destilados segundo a metodologia de Souza et al. (2013), o qual procedeu-se a separação das frações “cabeça” (1,5% do volume total na caldeira), “coração” (volume correspondente a até 16% do volume total do vinho ou, aproximadamente, 40% do total do destilado. O seu limite de recolhimento é determinado quando o teor alcoólico do destilado atinge entre 38 e 40%). Não foi feita separação da fração “cauda” (3% do volume total do vinho). A mesma foi descartada juntamente com a vinhaça.

O corte do coração foi realizado com auxílio de alcoômetro e armazenado em garrafas de vidro por um mês, ao abrigo de luz e calor. Esta fração foi diluída com água destilada até atingir 40% de volume de etanol do destilado final. O destilado diluído foi utilizado para a realização das análises sensoriais.

3.5. Análises físico-químicas

Os mostos foram submetidos às análises de pH, Brix, Acidez Total e Açúcares Redutores Totais para caracterização da quantidade de açúcares do caldo de cana após a extração; e os vinhos foram analisados quanto a Teor Alcoólico, pH e Acidez Total para caracterizar-los após a fermentação, seguindo metodologias descritas por Caldas (2012).

Os destilados submetidos às análises correspondem à fração “coração” da destilação e foram submetidas às análises físico-químicas descritas nos itens 4.5.1 e 4.5.2 sem prévia diluição.

3.5.1. Grau alcoólico

Os destilados foram submetidos à análises quanto ao teor de álcool por densimetria (BRASIL, 2005b), em densímetro digital Anton Paar DMA 4500.

3.5.2. Análises cromatográficas

3.5.2.1. Congêneres voláteis por cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chamas (GC-DIC)

Os padrões empregados para a análise foram: acetaldeído, acetato de etila, metanol, n-propanol, isobutanol, n-butanol, iso-amílico e ácido acético (Merck – Darmstadt, Germany), e n-butanol (Sigma-Aldrich – St. Louis, USA). Todos de grau cromatográfico com pureza >99%. A água utilizada foi destilada e purificada em sistema Milli-Q (Millipore). A metodologia do padrão interno foi empregada para quantificação dos compostos analíticos. As curvas analíticas foram dispostas contendo 5 pontos, nas seguintes faixas de concentração, em mg /100 mL de álcool anidro: acetaldeído (5 a 25), acetato de etila (5 a 150), metanol (1 a 10), 2-butanol (0,5 a 12,5), 1-propanol (30 a 150), iso-butanol (2 a 20), 1-butanol (0,75 a 3,75), iso-amílico (50 a 300) e ácido acético (30 a 300) em meio hidroalcoólico (etanol 40% v/v), buscando reproduzir as condições da matriz analisada. Foi utilizada a regressão linear, plotando-se a relação área dos picos dos padrões/área do padrão interno versus concentração. Os coeficientes de correlação foram sempre bem próximos à unidade. As amostras e padrões foram previamente filtrados em filtros Millex – HV (millipore) com membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno) de 13 mm de diâmetro e 0,45

µm de poro e injetados diretamente no cromatógrafo, em triplicata. Cada solução padrão foi inicialmente injetada de forma isolada, para identificação do tempo de retenção de cada composto.

As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás Shimadzu modelo QP-2010 PLUS, com coluna Stabilwax-DA (Crossbond Carbowax polyethylene glycol, 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 manual 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 (H₂) 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) (BORTOLETTO; ALCARDE, 2013).

3.5.2.2. Análise de lactato de etila por cromatografia gasosa acoplada a detector por ionização de chamas (GC-DIC) – *Lallemand Biofuels and Distilled Spirits*

A análise foi realizada utilizando um sistema Agilent 7890A GC acoplado a detector de ionização de chamas (DIC). Para separação cromatográfica foi utilizado uma coluna de whiskey Agilent CP-Wax 57 CB (50 m x 0,25 mm x 0,2 µm). 1-Pentanol foi usado como padrão interno. Hidrogenio foi usado como gas de arraste com um fluxo constate de 4mL/min. A temperatura do injetor foi fixada em 190 °C e o volume de injeção foi de 1 µL. A temperatura inicial do forno foi fixada em por 8 minutos, aumento de 6 °C/min para 110 °C e por fim, aumento 100 °C/min para 200 °C durante 7,57 minutos. A temperatura do detector (DIC) foi fixada a 220 °C. Todos os dados foram processados utilizando o software ChemStation.

3.5.2.3. Carbamato de etila por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM)

A análise de carbamato de etila foi realizada utilizando um cromatógrafo Shimadzu GC 2010, com detector de massas Shimadzu QP-2010 PLUS tendo como fonte de ionização o impacto eletrônico com energia de ionização de 70 eV. Foi utilizada coluna cromatográfica capilar de fase polar (polietilenoglicol esterificado), HP-FFAP (50 m x 0,20 mm x 0,33 µm de espessura do filme da fase estacionária). As temperaturas do injetor e da interface do detector foram 230 e 220 °C, respectivamente. A programação de temperatura para o forno foi: início com 90 °C, elevação para

150 °C a uma taxa de 10 °C / min, seguido de aquecimento para 230 °C a uma taxa de 30 °C / min na qual permanecerá por 10 min. O volume injetado foi de 1,0 µL no modo “splitless” automático. O gás de arraste foi o hélio (5.0) com fluxo de 1,2 mL / min. O modo de aquisição foi o SIM, monitorando os íons de m/z 62 para carbamato de etila e m/z 75 para carbamato de metila (CLEGG; FRANK, 1988). A quantificação foi realizada através da comparação dos resultados cromatográficos das amostras com uma curva analítica obtida a partir de uma solução estoque de carbamato de etila.

Os parâmetros analíticos das análises cromatográficas foram determinados de acordo com a relação linear simples, descrita pela equação $y = ax + b$. A determinação do limite de detecção (LD), do limite de quantificação (LQ) e o cálculo dos coeficientes de regressão das curvas analíticas (a , b e r^2), assim como o tempo de retenção obtido para cada composto, são apresentados na Tabela 2. O limite de detecção e limite de quantificação foram calculados segundo Lanças (2004).

Tabela 2: Índice de retenção, (IR), Limite de Detecção (LD), e Limite de Quantificação (LQ) de congêneres voláteis e contaminantes, e coeficientes de correlação (a , b , r^2) das curvas de calibração em solução alcoólica (40 % v / v).

Congêneres voláteis	TR (min)	LD (mg / 100 mL etanol)	LQ (mg / 100 mL etanol)	A	B	r^2
Acetaldeído	0,29	0,080	0,266	0,8096	-0,0652	0,998
Acetato de etila	1,41	0,044	0,144	0,0372	0,0905	0,994
Propanol	4,43	0,054	0,176	0,2317	0,0099	0,999
Isobutanol	5,22	0,029	0,098	0,0206	0,0037	0,999
Álcool isoamílico	6,72	0,015	0,044	0,1766	0,0145	0,999
Ácido acético	9,15	0,580	1,740	0,6238	0,1111	0,994
Congêneres contaminantes	TR (min)	LD (mg / 100 mL etanol anidro)	LQ (mg / 100mL etanol anidro)	A	B	r^2
Metanol	1,62	0,159	0,534	0,7847	0,0486	0,965
1-butanol	5,99	0,061	0,200	0,2036	0,1331	0,997
2-butanol	4,02	0,215	0,710	0,2667	0,0024	0,999
Carbamato de etila (µg/L)	10,15	0,180	0,550	64,714	1241,67	0,9984

3.6. Análise sensorial das cachaças

Após submissão do projeto ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e obtenção da aprovação (parecer nº 21491119.0.0000.5395 - Anexo A), as cachaças foram oferecidas em testes sensoriais para comparação dos destilados obtidos. Os testes foram realizados em cabines individuais do Laboratório de Análise Sensorial. Os recursos para essas análises foram provenientes do Laboratório de Tecnologia e Qualidade de Bebidas.

3.6.1. Condições dos testes

Para a realização das análises foram selecionadas seis amostras diante das 14 existentes (Tabela 3). As amostras foram escolhidas com o objetivo de avaliar o máximo de ciclos possíveis, abrangendo, assim, maior número de amostras. Com isso, os testes foram divididos em duas sessões sendo, em cada uma, realizada a análise de três amostras. As amostras de cada sessão foram referentes a uma cepa de levedura e seus reciclos. Todos os provadores estavam cientes dos objetivos da pesquisa e concordaram em participar por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Apêndice A).

Tabela 3: Sessões e amostras dos testes sensoriais

Sessões	Amostras	
	Uso/Reciclos	Cepa
1	1º	DistilaMax RM
	7º	
	14º	
	1º	
	7º	
2	14º	Canamax

Cada amostra foi previamente codificada com três letras aleatórias e apresentada aos provadores em ordem aleatória, seguindo o delineamento Quadrado Latino de Williams (WILLIAMS, 1949). As amostras de cachaças foram devidamente padronizadas a 40% v/v de etanol, com água destilada. Cada provador degustou 5 mL de cada amostra, a fim de não comprometer a avaliação devido a fadiga sensorial em decorrência do teor alcoólico das cachaças.

As amostras foram apresentadas em taça transparente, lisa e composta por cristal com, no máximo, 9 % de chumbo abertura de 4,6 cm, parte mais convexa com 6,5 cm e altura de 15 cm (ISO 3591:1977). Juntamente com as amostras foram oferecidos aos provadores bolacha de água e sal e água. Todos os provadores foram orientados a consumir a bolacha e a água entre a prova das amostras para remoção do sabor residual da amostra anterior.

3.6.2. Equipe de provadores

Uma equipe de 15 provadores treinados e participantes do Curso de Qualidade Sensorial de Cachaça realizado pelo Laboratório de Tecnologia e Qualidade de Bebidas da ESALQ/USP foi elegida, com base em seus conhecimentos técnicos em cachaça, para realizar os testes. A forma como a equipe foi selecionada baseou-se no estudo de Giacalone e Hedelund (2015), o qual, ao relizar o teste RATA, selecionou 16 provadores com experiência técnica na produção do alimento avaliado.

A análise foi procedida em duas sessões de avaliação das amostras em sala de análise sensorial com cabines independentes, seguindo procedimentos da International Organization for Standardization (padrão ISO 8589) (SENSORY ANALYSIS, 2007). Na primeira sessão, o painel realizou as análises das amostras referentes à cepa DistilaMax RM e na segunda sessão, foram analisadas as amostras referentes à cepa CanaMax. Em cada sessão, as 3 amostras foram entregues ao mesmo tempo.

Como critério de inclusão foram utilizados indivíduos apreciadores do produto, que se declararem habituados ao consumo de bebidas destiladas. Como critério de exclusão, foram desconsiderados os indivíduos que declararam idade abaixo de 18 anos e acima de 60 anos, pesassem menos de 50kg, portadores de doenças crônicas, gravidez ou em estado de amamentação, que fizessem o uso de algum medicamento e os que não apreciassem o produto ou que o consumam em excesso.

Nesta pesquisa, os riscos relacionados ao consumo de bebidas alcoólicas existem e foram minimizados, pois os adultos participantes foram aconselhados a não consumir, ou seja, não deglutir o produto durante a sessão de análise sensorial, visto que nenhuma quantidade de etanol no sangue é permitida pela legislação nacional para a condução de veículos. Não houve benefício direto ao voluntário. O benefício indireto para os voluntários foi a colaboração e participação em uma pesquisa inédita e importante para a área de tecnologia de bebidas.

3.6.3. Análise sensorial das cachaças

O teste RATA (*Rate All That Apply*) foi realizado segundo Áres et al. (2014). Os 15 provadores treinados foram instruídos à avaliarem a aplicabilidade dos termos que se aplicavam às amostras, usando escala de 5 pontos, sendo 0 = Baixo corpo; Transparente; Cristalina; Aroma fraco; Gosto fraco; Sensação fraca e 5 = Alto corpo; Marrom; Turva; Aroma forte; Gosto forte; Sensação forte. Os atributos utilizados para aroma foram: frutado, floral, adocicado, herbáceo/vegetal. Para gosto, foram: ácido, amargo, doce, salgado, umami e para sensação foram: picante, pungente, adstringente, alcoólico, apimentado, adocicado. Os termos foram selecionados com base nos atributos pré-definidos presentes na Roda Sensorial da Cachaça (BORTOLETTO, 2016) (Anexo B).

Para o teste de aceitabilidade, os 15 provadores treinados atribuíram valores às cachaças para a avaliação dos atributos: aroma, sabor e avaliação global numa escala hedônica estruturada com nove pontos. Os formulários destinados a este teste (Apêndice B) continham campos que possibilitaram aos provadores darem notas de quanto gostou ou desgostou da amostra.

3.7. Análise de dados

Os dados de análises físico-químicas foram submetidos ao método multivariado denominado Análise Fatorial Múltipla - AFM, uma vez que os dados representam grupos de variáveis de diferentes grandezas e unidades. Foram selecionados 5 grupos de variáveis ativas para compor os fatores relacionados aos parâmetros químicos, além de dois grupos de variáveis qualitativas suplementares indicando ciclo e cepa de levedura empregada. Os grupos de variáveis ativas corresponderam ao teor alcoólico (etanol), rendimento (%) coeficiente de congêneres (acetaldeído, acetato de etila, álcoois superiores, 1-propanol, isobutanol e isoamílico, ácido acético, furfural e lactato de etila), metanol e carbamato de etila.

No que se refere aos resultados dos testes estatísticos para a análise de aceitação, foi utilizado o Teste de Análise de Variância (ANOVA), também ao nível de significância de 5%. O software utilizado foi o SPSS versão 20.0 (2011).

Os dados das análises sensoriais do teste RATA foram submetidos à técnica multivariada de Análise de Componentes Principais (ACP) ou PCA (do inglês Principal Component Analysis).

Os dados citados acima foram analisados no software RStudio (R versão 3.4.3), utilizando os pacotes RcmdrMisc, FactoMineR, SensoMineR e factoextra (LÊ; JOSSE; HUSSON, 2008).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Tempo das fermentações

A Figura 3 representa a variação de tempo das fermentações ao longo dos ciclos. O primeiro ciclo levou, em média, 96 horas para a cepa DistilaMax RM e 74 horas para a cepa CanaMax. Notou-se que ao longo dos ciclos, o tempo de fermentação diminuiu representando o aumento do número de células presentes no fermentador. Após o sétimo ciclo para a CanaMax e o nono ciclo para a DistilaMax RM, o tempo voltou a aumentar informando o possível enfraquecimento das células devido à interferência de contaminantes no meio, afetando, assim a produtividade da fermentação. Segundo Mutton e Mutton (2016), quando o processo ocorre na presença de contaminantes, geralmente bactérias, o tempo de fermentação se torna maior.

As duas cepas tiveram, portanto, os primeiros ciclos lentos se comparados aos resultados de Guerra et al. (2001), o qual demonstrou que o ciclo fermentativo comumente realizado para cachaças foi de 24 horas. Essa atividade só foi alcançada no terceiro e quarto ciclos para, respectivamente, as cepas CanaMax e DistilaMax RM, sendo necessária a multiplicação de suas células para alcance, em 24 horas, do fim do ciclo fermentativo.

Figura 3: Representação gráfica do tempo (em horas) de fermentação das cepas CanaMax e DistilaMax RM durante os ciclos fermentativos.

4.2. Caracterização do caldo de cana

A tabela 4 apresenta os valores de pH, Brix, açúcares redutores totais (ART) e acidez total nos mostos de caldo de cana utilizados para as fermentações.

Tabela 4: Valores de pH, Brix, açúcares redutores totais (ART) e acidez total nos mostos de caldo de cana-de-açúcar referentes aos ciclos das cepas DistilaMax RM (DRM) e CanaMax (CNX).

Mostos (Reciclos)	pH	Brix	ART (g/ 100mL)	Acidez total (g H ₂ SO ₄ /L)
1 DRM	5,1	17,8	16,90	0,91
3 DRM	5,1	17,7	16,93	0,48
5 DRM	4,9	17,9	17,10	1,10
7 DRM	5,0	18,1	17,46	1,11
10 DRM	4,8	18,0	16,64	1,22
12 DRM	4,8	18,5	17,12	1,48
14 DRM	4,9	18,7	17,90	1,23
1 CNX	5,0	18,3	17,19	1,13
3 CNX	4,8	17,8	17,39	1,23
5 CNX	5,0	17,8	16,98	1,23
7 CNX	4,8	18,7	17,99	1,25
10 CNX	4,8	17,4	16,97	1,24
12 CNX	5,1	18,3	17,19	1,15
14 CNX	5,0	18,6	17,67	1,03

O mosto de caldo de cana apresentou pH entre 4,8 e 5,1, valores que se encontram dentro da faixa ideal (4,5-5,5) apresentada por Bortoletto, Silvello e Alcarde (2018). Resultados satisfatórios, considerando que Mutton e Mutton (2016) afirmam que as leveduras fermentativas crescem melhor em meio ácido quando o pH varia de 4,0 a 5,0. O Brix do mosto variou entre 17,4 e 18,7 após a diluição do caldo de cana, mantendo-se em valores ideais para a fermentação que são de 16 a 18 °Brix. Os caldos com concentrações elevadas de açúcar podem prejudicar a atividade fermentativa das leveduras e acarretar fermentações lentas e incompletas, diminuindo o rendimento industrial (ALCARDE, 2017).

O mosto do caldo de cana apresentou concentração de açúcares redutores totais (ART) entre 16,90 e 17,99 g/100mL, valores semelhantes aos encontrado por Corrêa (2020), que manteve a média de 17,99 g/100mL. A acidez total do mosto manteve-se entre 0,48 e 1,48g de H₂SO₄/L. Valores considerados abaixo da faixa ideal que se encontra entre 2,5 e 3,0g de H₂SO₄/L (BORTOLETTO; ALCARDE, 2020). Com baixos valores de acidez, o meio torna-se favorável à ocorrência de infecções bacterianas e impede o desenvolvimento de leveduras (MUTTON; MUTTON, 2016).

4.3. Caracterização dos vinhos

A Tabela 5 apresenta os valores de teor alcoólico, pH e acidez total dos vinhos obtidos através dos ciclos das fermentações com as leveduras DistilaMax RM (DRM) e CanaMax (CX).

Tabela 5: Resultados obtidos para Teor alcoólico, pH, Acidez total e Rendimento fermentativo dos vinhos referentes aos ciclos das fermentações com as leveduras DistilaMax RM (DRM) CanaMax (CNX).

Mostos (Reciclos)	Teor Alcoólico (%)	pH	Acidez total (g H ₂ SO ₄ /L)
1 DRM	10,09	3,5	3,99
3 DRM	10,23	3,9	2,70
5 DRM	10,35	4,2	2,77
7 DRM	10,62	3,9	3,62
10 DRM	9,63	3,0	4,08
12 DRM	8,98	3,2	7,57
14 DRM	10,96	3,4	4,79
1 CNX	10,26	3,5	4,65
3 CNX	10,52	3,9	3,40
5 CNX	10,25	3,7	3,50
7 CNX	11,00	4,0	2,85
10 CNX	10,05	3,9	3,51
12 CNX	10,27	3,9	3,18
14 CNX	10,64	3,9	3,53

Denomina-se vinho, o mosto fermentado cuja composição média em compostos voláteis é de 90-92% de água, 7-9% de etanol e 1-2% de compostos secundários (ALCARDE, 2017). O teor alcoólico dos vinhos mantiveram-se entre 8,98% e 11%, sendo o 10º e 12º ciclos da cepa DistilaMax RM, as únicas cepas com valores abaixo de 10%. Valores mais baixos que as demais possivelmente devido à interferência de contaminantes no meio afetando o rendimento da fermentação. Valores próximos aos referentes à cepa CanaMax foram encontrados por Corrêa (2020) ao fermentar um mosto de cana de açúcar com a mesma cepa.

As duas cepas apresentaram valores semelhantes de pH, sendo a média para a cepa DistilaMax RM de 3,5 e para a cepa CanaMax de 3,8. Em relação à acidez total, obteve-se o maior valor (7,57 g H₂SO₄/L) no 12º ciclo da cepa DistilMax RM. Valor alto que coincide com o do vinho referente ao ciclo de teor alcoolico mais baixo.

4.4. Caracterização dos destilados

4.4.1. Grau alcoólico

A Figura 4 representa o grau alcoólico obtido pelos ciclos das diferentes cepas, imediatamente após a destilação, antes da padronização. Os valores permaneceram entre 47,32% e 53,80%.

Os valores permaneceram constantes durante os ciclos fermentativos da cepa Canamax, porém a cepa DistilaMax RM obteve valores distintos no 10º e no 12º ciclo. O motivo desses resultados é, provavelmente, devido à contaminação derivada da presença de bactérias, visto que, as cachaças provenientes desses ciclos demonstraram alto teor de ácido acético. Obteveram-se, por fim, valores médios mais altos do que os obtidos por Corrêa (2020), indicando um rendimento fermentativo satisfatório.

Figura 4: Concentração (% v/v) do grau alcoólico proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e Canamax.

4.4.2. Rendimento fermentativo

O rendimento fermentativo é o fator mais importante para o controle da fermentação pois reflete todos os demais parâmetros de controle (ex: concentração de açúcares, temperatura do mosto, tempo de fermentação, acidez, pH, açúcares residuais) que, direta ou indiretamente, interferem no processo (MUTTON; MUTTON, 2016). É calculado através da equação de Gay-Lussac e expressa em valores quantitativos a eficácia com que as leveduras transformam o açúcar em álcool e deve ser expresso como relação entre a quantidade de etanol formado no processo fermentativo e o açúcar presente no mosto (NOGUEIRA; VENTURINI, 2005).

Na produção de etanol, a qual visa a maior eficiência fermentativa possível, um bom rendimento da fermentação deve atingir um valor de ordem de 90-92% do rendimento ideal (RIBEIRO; BLUMER; HORRI, 1999). Assim, neste trabalho (Figura 5) exceto os ciclos 10 e 12 da cepa DistilaMax RM devido à possíveis interferentes bacterianos, todas as outras fermentações obtiveram ótimos rendimentos fermentativos.

Figura 5: Rendimento fermentativo (%) proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e Canamax.

4.4.3. Compostos voláteis

Após análises de congêneres voláteis foi possível comparar as cachaças provenientes dos reciclos das diferentes cepas. A Tabela 5 demonstra os resultados obtidos pela cepa DistilaMax RM e a Tabela 6 representa os resultados cromatográficos obtidos pela cepa CanaMax.

4.4.3.1. Acidez volátil

A concentração de ácido acético variou de 16,24 a 438,78 mg/ 100mL de AA para a cepa DistilaMax RM e de 24,38 a 62,83 mg/100 mL de AA para a cepa CanaMax (Figura 6). Sua concentração aumentou nos ciclos finais da cepa DistilaMax RM, além do primeiro e último ciclo da cepa CanaMax.

Os destilados provenientes da cepa DistilaMax RM mantiveram, até o 7º ciclo, concentrações inferiores ao limite máximo de 150 mg/100mL de AA apresentado pela legislação (Tabela 1), sendo que no 10º e 12º ciclos, a concentração desse ácido excedeu os limites e, em

seguida, no 14º ciclo, voltou aos padrões legislativos. Os ciclos da cepa CanaMax mantiveram-se integralmente dentro dos limites da legislação, sendo a mesma mais consistente entre os seus reciclos se comparada à cepa DistilaMax RM.

Bortoletto e Alcarde (2015) afirmaram que altos resultados em acidez volátil representam séria falha sensorial na cachaça e sugere que o aumento desses valores é relacionado à falta de boas práticas de fabricação. Corniani et al. (2015) complementaram, afirmando que altos valores de ácido acético podem ocorrer devido à instabilidade microbiológica do caldo de cana. Essa instabilidade pode ser previamente corrigida ao utilizar o tratamento térmico do caldo, pois ao se compararem amostras de cachaças tratadas e não tratadas, o ácido acético foi o composto que apresentou mais diferença de média e desvio padrão, sendo a amostra tratada a que apresentou menos ácido acético.

A presença de bactérias acéticas (*Acetobacter* e/ou *Glucanobacter*) favorecem a formação de ácido acético. Essa propagação é promovida pela agitação e aeração do tanque fermentador, estimulando a produção deste composto a partir do açúcar metabolizado. Visto isso, o 10º, 12º e 14º ciclos da cepa DistilaMax RM podem, possivelmente, ter sofrido contaminações de bactérias Gram-negativas, sendo no 12º ciclo, o pico da contaminação (ALCARDE, 2017; NARENDRANATH, 2003).

Gonçalves et al. (2017), ao avaliarem os compostos voláteis de cachaças produzidas com leveduras selecionadas, obteve valores de, em média de 59,99 mg/100mL de AA, para acidez volátil. Valor este, superior à grande parte das amostras presentes neste trabalho. Sendo assim, 10 das 14 amostras avaliadas tiveram valores considerados baixos em relação à acidez volátil, sendo esta, característica desejável em cachaças de qualidade.

Figura 6: Concentração de ácido acético (mg/100mL de álcool anidro) proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e Canamax.

4.4.3.2. Ésteres totais

4.4.3.2.1. Acetato de etila

O acetato de etila é o principal éster presente em cachaças (BORTOLETTO; ALCARDE, 2020; BOSCOLO et al., 2000). Na legislação (Tabela 1) as concentrações de ésteres totais são representadas por este composto. Em todas as amostras, o valor máximo permitido (200mg/100mL de AA) não foi atingido, sendo que a cepa DistilaMax RM obteve os maiores resultados se comparada com a cepa CanaMax (Figura 7).

Bortoletto e Alcarde (2015), ao avaliarem 268 amostras de cachaças produzidas em diversos estados brasileiros, concluíram que apenas 1,5% das amostras apresentavam valores acima do máximo permitido na legislação para a concentração de ésteres. A maior parte das amostras (95,9%) apresentaram valores menores que 100mg de acetato de etila/100mL de AA, assim como as amostras do presente estudo. No trabalho realizado por Dato, Pizauro Júnior e Mutton (2005), foram avaliados os componentes secundários em cachaças produzidas com *S. cerevisiae* e leveduras selvagens utilizando reciclo de células, e observou-se a que os altos resultados de acidez provavelmente contribuem para o aumento da produção de acetato de etila em *S. cerevisiae*. Resultados similares foram observados nos ciclos 10 e 12 da cepa DistilaMax RM.

Boscolo et al. (2000), ao quantificarem a dosagem de álcoois e ésteres em cachaças obteve médias menores que o limite permitido. Concluiu que, em geral, o valor médio do conteúdo de ésteres equivale a 1/10 do limite máximo permitido pela legislação. Esta conclusão foi aplicada para os resultados de todos os ciclos da cepa CanaMax, porém para a cepa DistilaMax RM, os ciclos 1, 10 e 12 não seguiram este padrão.

Pereira et al. (2003) avaliaram 45 amostras de aguardentes do estados de Minas Gerais e encontraram valores entre 13,79 e 161 mg/100mL de AA para a análise de ésteres, mostrando que nenhuma amostra estava fora da faixa estabelecida oficialmente. Bogusz Junior et al. (2006) não obteve limites médios de esteres acima do limite máximo permitido ao avaliar 27 amostras de cachaças do noroeste do Rio Grande do Sul, sendo o maior valor encontrado de 44,18 mg/100 mL de AA. No entanto, Miranda et al. (2007), ao avaliarem 94 marcas comerciais de cachaça obteve valor máximo de acetato de etila de 418,85 mg/100mL de AA, encontrando seis marcas em não conformidade com os padrões de qualidade relacionados aos ésteres.

Por mais que seja considerado um off-flavor, concentrações baixas de acetato de etila promovem um sabor e aroma doce de frutas e flores. Em concentrações mais altas (excedendo 150-200mg/100mL de AA) pode contribuir com um sabor semelhante ao de solvente (AMORIM et al., 2016; SCHWAM; DUARTE, 2016; PORTUGAL et al., 2017; ERTEN; TANGULER, 2010).

Assim, nenhuma amostra deste trabalho apresentou sabores e aromas indesejáveis em relação ao acetato de etila, de acordo com a análise físico-química.

Figura 7: Concentração de acetato de etila (mg/100mL de álcool anidro) proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e Canamax.

4.4.3.2.2. Lactato de etila

Os valores de lactato de etila variaram entre 0,52 e 70,45 mg/100mL de AA (Figura 8), indicando a possível presença de contaminação por bactérias lácticas (ALCARDE, 2017). Assim como o ácido acético, o pico da contaminação se encontrou no 12º ciclo da cepa DistilaMax RM.

Maia, Marinho e Nelson (2020), realizaram um levantamento dos registros de análise de 300 amostras, correspondentes a 110 marcas de cachaças e constataram a ocorrência extensiva de lactato de etila em proporções variáveis e obtiveram valores entre 0,2 e 90,4 mg/100mL de AA.

Nascimento, Cardoso e Franco (2008), analisaram 136 amostras de cachaças e, obtiveram valor mínimo de 0,07mg/100mL de AA, e valor máximo de 244 mg/100mL de AA referentes ao lactato de etila, ressaltando que este é o segundo principal éster presente em cachaças. Os mesmos autores afirmaram que uma possível fonte das bactérias lácticas contaminantes (*Lactobacillus* spp.) está associada à matéria - prima ou ao material do aparelho de destilação. Afirmaram também que, a fermentação láctica predomina em um pH abaixo de 4 e a temperaturas acima de 30 °C.

Isso sugere que os ciclos 10, 12 e 14 da cepa DistilaMax RM e os ciclos 1 e 14 da cepa CanaMax possivelmente sofreram contaminações relacionadas à cana-de-açúcar, bem como tiveram processo fermentativo ácido e com temperatura elevada, porém mesmo sob essas

circunstâncias, os resultados desta pesquisa se mantiveram abaixo das concentrações máximas apresentadas nos trabalhos acima.

Em relação à legislação, o limite máximo de ésteres totais é 200mg/100mL de AA expressos em acetato de etila. Nascimento, Cardoso e Franco (2008) ainda afirmaram que o método CG-FID sugerido pelo MAPA (BRASIL, 2005), por ser baseado exclusivamente na determinação de acetato de etila, subestima a quantidade total de ésteres e os limites de lactato de etila permanecem como problema, pois a concentração de lactato de etila é cerca de 40% do conteúdo total de ésteres.

Figura 8: Concentração de lactato de etila (mg/100mL de álcool anidro) proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e Canamax.

4.4.3.3. Aldeídos

4.4.3.3.1. Acetaldeído

O acetaldeído é o principal aldeído encontrado em cachaças. Os níveis dependem da cepa utilizada e, também, das condições em que os processos de fermentação e destilação foram conduzidos, considerando que as frações foram separadas da forma correta, visto que, este composto se concentra na fração “cabeça”. Altas concentrações de acetaldeído podem ser tóxicas ao ser humano, pois é o responsável pelos efeitos desagradáveis relacionados à ressaca, devido à ingestão de bebidas em grande quantidade (DATO; PIZAULO JUNIOR; MUTTON, 2005; AMORIM; SCHWAN; DUARTE, 2016). Em altas concentrações, possui odor pungente e irritante, mas em concentração diluída apresenta aroma frutado agradável (MIYAKE; SHIBAMOTO, 1993).

Os destilados obtiveram valores entre 4,09 e 19,86 mg/100mL de AA (Figura 9), as quais se mantiveram abaixo do limite máximo permitido pela legislação (30mg/100mL de AA). Sendo a média dos valores obtidos pela cepa DistilaMax RM de 8,27mg/100mL de AA, e 7,73mg/100mL de AA para a cepa Canamax. Valores médios de acetaldeído semelhantes foram obtidos por Duarte et al. (2011), que ao inocularem a cepa UFLA CA11 (*S. cerevisiae*) obteve valores médios de 10,59mg/100mL de AA em 4 repetições.

Oliveira et al. (2005a), ao isolar 24 cepas de *S. cerevisiae* provenientes de destilarias de cachaça e de álcool combustível, obteve valores de acetaldeído entre 12 e 49 mg/100mL de AA derivado dos destilados obtidos com o uso destas cepas. Oliveira et al. (2005b) obtiveram resultados entre 7,4 e 18,2 mg/100 mL de AA ao avaliar a influência de diferentes cepas de leveduras na composição e qualidade sensorial da cachaça.

Figura 9: Concentração de acetaldeído (mg/100mL de álcool anidro) proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e CanaMax.

4.4.3.3.2. Furfural e hidroximetilfurfural

O furfural e o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) são aldeídos comumente presentes em cachaças. Em excesso, são indesejáveis e afetam a qualidade do destilado conferindo sabor de queimado à bebida. São resultantes da decomposição química de carboidratos e podem originar-se em diferentes passos da produção de cachaça (BORTOLETTO; SILVELLO; ALCARDE, 2018).

Todos os ciclos tiveram resultados dentro dos padrões da legislação (BRASIL, 2005) (Tabela 1). Os valores ficaram entre 0,09 e 0,45 mg/100 mL de AA (Figura 10), comprovando o uso de cana não queimada, visto que, os resultados máximos obtidos são próximos aos valores

médios resultantes (0,63mg/100 mL de AA) da produção de cachaça com uso de cana não queimada por Masson et al. (2007). Por outro lado, estudo conduzido por Souza et al. (2009) avaliaram teores de compostos orgânicos em cachaças produzidas na região norte fluminense do Rio de Janeiro, e obtiveram resultados entre 1,1 e 9,5 mg/100 mL de AA, contabilizando 30% das amostras em situação fora do padrão legislativo, sendo a soma dos compostos 5-hidroximetilfurfural e furfural um dos parâmetros com maiores índices de irregularidades apresentados pelas amostras.

Figura 10: Concentração de furfural e 5-hidroximetilfurfural (mg/100mL de álcool anidro) proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e Canamax.

4.4.3.4. Álcoois superiores

Os álcoois superiores representam os compostos de maior abundância nos destilados. A produção é estimulada por parâmetros da fermentação, tais como, temperatura elevada, altos níveis de inóculo, aeração do meio e substituição de açúcares como matose por glicose. Esses efeitos podem aumentar os níveis de todos os álcoois superiores presentes no meio, porém os níveis individuais dos álcoois superiores podem ser manipulados a partir de mudanças nas cepas (BERRY; SLAUGHTER, 2003).

Em bebidas destiladas, são frequentemente encontrados os álcoois superiores com 3 a 5 átomos de carbono. Também são chamados de óleo fúsel, e costumam apresentar odor característico de flores. Juntamente com os ésteres, são os responsáveis pelo *flavour* da cachaça. Em cachaça, os principais álcoois superiores encontrados são os álcoois isoamílico (3-metilbutanol-1),

n-propanol (1-propanol) e o isobutanol (2-metilpropanol-1) (PIGGOTT et al., 1989; VILELA et al., 2007; BORTOLETTO; ALCARDE, 2020).

As maiores concentrações totais de 1-propanol (Figura 11) foram nas destilações a partir do vinho da cepa DistilaMax RM, com exceção do 10º e 12º ciclos. O teor de propanol influi negativamente no *flavour* da aguardente e deprecia a qualidade da bebida (BOZA; HORII, 1998; VILELA et al., 2007). Boscolo et al. (2000), ao avaliar álcoois e ésteres presentes em amostras de cachaças, obteve valores médios de 48 mg/100mL de AA para 1-propanol, valor próximo aos valores máximos obtidos por este trabalho.

Figura 11: Concentração de n-propanol (mg/100mL de álcool anidro) proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e Canamax.

Ao comparar cachaças com rum, whiskey e vinho, Boscolo et al. (2000) afirmou que o conteúdo de isobutanol em cachaças é menos abundante, encontrando valores entre 40 e 96 mg/100 mL de AA obtendo média de 63 mg/100mL de AA. Bortoletto e Alcarde (2015) encontraram valores médios de isobutanol de 60,14 mg/100mL de AA em 268 amostras de cachaça. Valores estes, quase duas vezes maiores do que as médias obtidas nesta pesquisa para a cepa DistilaMax RM (37,08 mg/100mL de AA) e para a cepa Canamax (35,31 mg/100 mL de AA) (Figura 12).

Figura 12: Concentração de isobutanol (mg/100mL de álcool anidro) proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e Canamax

Pesquisas como a de Lima et al. (2009) e a de Penteado e Mansini (2009) afirmaram que, dentre os álcoois superiores, o álcool isoamílico é quantificado como majoritário. Corrêa (2020) destaca que a destilação realizada em alambique não admite bom controle do teor de álcoois superiores por fracionamento devido à afinidade pelo etanol. Em consequência, os vapores ricos em álcool são arrastados juntamente com o etanol ao longo da destilação. O sistema de destilação em coluna permitiria a diminuição do teor destes álcoois superiores. Dessa forma, na obtenção de monosdestilados foi observado alto teor de álcoois superiores, principalmente álcool isoamílico. Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho (Figura 13).

Figura 13: Concentração de álcool isoamílico (mg/100mL de álcool anidro) proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e Canamax.

Os valores de álcoois superiores são o resultado da soma dos álcoois isoamílico, n-propanol e isobutanol e nenhuma das amostras de cachaça analisadas neste trabalho apresentou concentração de álcoois superiores (Figura 14) acima da permitida pela legislação (BRASIL, 2005). Boza e Horrii (1998) avaliaram 16 amostras de cachaças e, também, obtiveram todos os resultados dentro dos padrões da legislação. Porém Pereira et al. (2003) encontraram 15,6% das 45 amostras de cachaças fora do limite estabelecido e Bortoletto e Alcarde (2015) encontraram 25,7% das 268 amostras também em desacordo com a legislação brasileira.

O n-butanol (1-butanol) e o sec-butanol (2-butanol) classificam-se como compostos contaminantes e devem ser apenas encontrados em valores baixos (BORTOLETTO; ALCARDE, 2020; SOUZA et al., 2009). O principal fator de formação destes contaminantes é a presença de bactérias acétobutílicas durante a fermentação (BORTOLETTO; ALCARDE, 2015; SOUZA et al., 2009). Segundo a Instrução Normativa N° 13 (BRASIL, 2005), o álcool sec-butanol tem limites de 10mg/100mL de AA e o álcool n-butanol não deve ultrapassar o valor de 3mg/100mL de AA. Todas as amostras mantiveram valores de n-butanol abaixo de 1mg/100mL de AA e o 2-butanol não foi detectado em nenhuma das amostras. Os valores evidenciam as boas práticas de fabricação utilizadas (BORTOLETTO, SILVELLO E ALCARDE, 2018) visto que, a destilação foi iniciada em período curto após o final da fermentação. Prática obrigatória para a redução destes contaminantes.

Figura 14: Concentração de álcoois superiores (mg/100mL de álcool anidro) proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e Canamax.

4.4.3.5. Coeficiente de congêneres

O coeficiente de congêneres voláteis é a soma de acidez volátil, aldeídos, ésteres totais, furfural, hidroximetil furfural e álcoois superiores (CORRÊA, 2020). Segundo a legislação (BRASIL, 2005), seus valores não podem ser inferiores a 200mg/100 mL de AA e nem superiores a 650mg/100mL de AA. Todas as amostras mantiveram-se dentro desta faixa limite (Figura 15), sendo a cepa DistilaMax RM a que apresentou maior coeficiente em todos os ciclos, se comparada à cepa CanaMax. Nas fermentações usando a cepa CanaMax, observa-se uma constância em relação aos valores apresentados, sem grandes variações. A cepa DistilaMax RM obteve valores desde 257,57mg/ 100mL de AA até 608,56mg/100 mL de AA.

Duarte et al. (2011), ao produzir cachaças utilizando *S. cerevisiae*, obteve valores médios de 330,09mg/100mL de AA, próximo porém menor, que a média dos ciclos obtida pela DistilaMax RM (371mg/100mL de AA) e superior à média dos ciclos obtidos pela CanaMax (271mg/100mL de AA). Corrêa (2020) ao avaliar cachaças monodestiladas com caldo de cana não tratado e fermentadas com cepa CanaMax, obteve valores médios (339,57mg/100mL de AA) próximos aos de Duarte et al. (2011) e superiores aos deste trabalho para a mesma cepa.

Figura 15: Concentração de coeficiente de congêneres (mg/100mL de álcool anidro) proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e Canamax.

4.4.3.6. Metanol

O metanol é contaminante orgânico em cachaças. A presença desse composto é indesejável devido à toxicidade e presença excessiva na fração “cabeça” do destilado (BORTOLETTO; SILVELLO; ALCARDE, 2018). Seus valores não devem ultrapassar 20mg/100 mL de AA (BRASIL, 2005). Em todas as amostras foram encontrados valores baixíssimos de metanol, sendo assim, nenhuma das amostras ultrapassou os limites permitidos (Figura 16). A presença desse contaminante pode estar ligada à má filtragem do caldo, o que possibilita a presença de bagacilhos no processo de fermentação, os quais podem ser degradados a metanol (VILELA et al., 2007). Dados de baixos níveis de metanol são de grande relevância, principalmente devido à segurança toxicológica relativa a este composto (BOGUSZ JUNIOR et al., 2006).

Segundo Pereira et al. (2015), o metanol não é proveniente da atividade do metabolismo de *S. cerevisiae*, mas da atividade de enzimas pécicas. Os valores referentes à cepa CanaMax, mesmo que baixíssimos, foram, em média, 6 vezes superiores aos valores obtidos com a cepa DistilaMax RM, mesmo seus respectivos caldos sendo tratados da mesma forma. Bogusz Junior et al. (2006), a avaliar cachaças produzidas na Região Noroeste do Rio Grande do Sul, obteve valores médios semelhantes entre “não detectado” e 2,95mg/100mL de AA. Vilela et al. (2007) também encontrou valores baixíssimos de metanol, evidenciando resultado positivo visto a indesejabilidade da presença deste composto na bebida.

Figura 16: Concentração de metanol (mg/100mL de álcool anidro) proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e Canamax.

4.4.3.7. Carbamato de etila

O carbamato de etila é um composto potencialmente carcinogênico, encontrado naturalmente em alimentos fermentados e bebidas alcoólicas (EFSA, 2007). É preferencialmente encontrado na fração “cabeça” (SERAFIM, 2015). As maiores concentrações destes compostos ocorreram nos ciclos finais de ambas as leveduras sendo o 12º ciclo da cepa DistilaMax RM (Figura 17), o único que superou os limites de 210 µg/L (BRASIL, 2005). A formação do carbamato de etila se dá pela presença de seus precursores associados à reação com o etanol, tais como, ureia, fosfato de carbamila, citrulina e cianeto, produzidos durante a fermentação e arrastados na destilação (RIACHI et al., 2014; PORTUGAL et al., 2017). A presença destes precursores esta associada às cepa de levedura e aos subprodutos do metabolismo, além de outros fatores que também podem influenciar a formação do carbamato de etila, tais como, radiação luminosa, temperatura, bactérias deteriorativas, teor de álcool, acidez e pH (ANDRADE SOBRINHO et al., 2009; ZIMMERLI; SCHLATTER, 1991; BORTOLETTO; SILVELLO; ALCARDE, 2018; CORRÊA, 2020; PORTUGAL et al., 2017).

A cepa Canamax causou aumento gradativo de carbamato de etila ao longo dos ciclos fermentativos. Por outro lado, a cepa DistilaMax RM manteve o nível de carbamato constante ao longo dos sete primeiros ciclos, vindo a aumentar apenas nos últimos ciclos (Figura 17). Esse aumento nas duas cepas pode ter sido influenciado pela acidez do meio bem como pelas possíveis bactérias presentes. Silva et al. (2020), obteve valores médios de 70,35 µg/L utilizando cepa selecionada de *S.cerevisiae* (CA-11) em cachaças monodestiladas. Em trabalhos utilizando a cepa

CanaMax, Corrêa (2020) encontrou valores médios de 90,09 $\mu\text{g/L}$ e Portugal et al. (2017) não obteve valores detectáveis deste componente para a mesma cepa e confirmaram que, em cepas selecionadas os valores para este composto costumam ser mais baixos, o que mostra que, neste trabalho, possivelmente houveram interferentes do meio nos últimos ciclos realizados por cada cepa.

Figura 17: Concentração de carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$) proveniente dos destilados resultantes das fermentações das cepas DistilaMax RM e Canamax.

A Tabela 6 apresenta a concentração dos congêneres voláteis e de etanol das cachaças brancas avaliadas.

Tabela 6: Concentração dos congeners voláteis das cachaças provenientes dos 1°, 3°, 5°, 7°, 10°, 12° e 14° usos da cepa DistilaMax® RM (DRM) e da cepa CanaMax® (CNX) (em g/100mL de álcool anidro).

Reciclos	%v/v	mg/100mL Álcool Anidro												
	Etanol	Acetato	2-	1-	Iso-	1-	Álcool	Acido		Álcoois	C.	Lactato		
		Acetaldeído de Etila	Metanol	Butanol	propanol	Butanol	Butanol	Isoamílico	Acético	Furfural	Superiores	Congêneres	de Etila	
1RM	52,38	19,86	31,87	< LD*	< LD*	32,05	77,12	0,30	244,03	25,28	0,14	353,12	430,28	1,33
3RM	52,58	8,79	19,01	0,58	< LD*	43,62	62,87	0,27	233,32	16,24	0,26	339,69	384,02	0,52
5RM	53,57	10,24	12,94	0,48	< LD*	54,72	38,99	0,25	139,92	20,36	0,37	233,57	277,53	0,56
7RM	53,49	4,30	8,19	0,82	< LD*	53,65	33,75	0,24	123,03	34,39	0,27	210,40	257,57	5,29
10RM	49,57	5,29	27,39	0,00	< LD*	20,70	16,99	0,00	62,28	232,53	0,16	99,84	365,30	50,11
12RM	47,32	5,35	49,95	0,31	< LD*	21,33	16,89	0,32	75,92	438,78	0,17	114,16	608,56	70,45
14RM	51,16	4,09	12,23	0,29	< LD*	40,81	12,97	0,83	92,78	115,21	0,40	146,54	278,54	46,79
1CNX	53,80	9,34	13,64	1,41	< LD*	23,92	44,45	0,19	201,61	62,83	0,09	269,76	355,69	1,59
3CNX	52,21	6,33	7,69	2,27	< LD*	30,91	44,11	0,23	173,31	24,38	0,30	248,33	287,02	0,54
5CNX	52,07	6,94	7,39	1,70	< LD*	31,80	40,79	0,24	129,80	28,73	0,31	202,39	245,75	0,68
7CNX	51,41	12,15	13,25	1,67	< LD*	40,85	27,40	0,34	104,72	24,89	0,39	172,55	223,18	0,53
10CNX	51,63	8,61	14,17	2,54	< LD*	37,53	34,56	0,31	132,59	26,81	0,43	204,63	254,70	4,32
12CNX	51,17	6,16	9,02	2,56	< LD*	35,08	29,61	0,28	154,46	26,75	0,45	219,13	261,53	9,04
14CNX	51,43	4,64	6,52	2,92	< LD*	37,42	26,41	0,41	153,75	40,66	0,42	217,67	269,87	13,12

*< LD: menor que o Limite de Detecção

4.5. Análise de dados físico-químicos

A Análise Fatorial Multivariada (AFM) foi aplicada em resultados de análises físico-químicas e cromatográficas tendo em vista o entendimento do papel dos conjuntos de variáveis para a contribuição com a variância entre as amostras. A AFM foi escolhida pois existem diferentes grupos de variáveis medidas segundo diferentes metodologias: cromatografia (CG-DIC e CG-EM) e densimentria digital. Assim é possível padronizar o peso dos grupos de variáveis para caracterizar multidimensionalmente as amostras de cachaça branca.

O gráfico *scree plot* (Figura 18) foi utilizado como guia para avaliar quais dimensões seriam exploradas. Nota-se que, as dimensões 1, 2 e 3 representam a maior parte (74%) da variância total entre as amostras. A primeira dimensão contém 41,2% do total de informação, a segunda contém 23,2% e a terceira, 9,6% da variância entre as amostras segundo os parâmetros usados para análise de cachaças brancas.

Figura 18: *Scree Plot* da variância obtida para cada dimensão gerada pela Análise Fatorial Múltipla (AFM).

O primeiro plano multidimensional foi avaliado segundo a representação dos grupos de variáveis explorados na AFM e representação das amostras, além da contribuição de cada uma das variáveis quantitativas (Figuras 19 e 20).

No gráfico de contribuição das variáveis nas dimensões 1 e 2 (Figura 19), observou-se a presença de variáveis ativas e suplementares. Dentre as suplementares encontram-se rendimento, teor alcoólico, álcoois superiores e coeficiente de congêneres. As variáveis ativas mais bem representadas no eixo horizontal, correspondente à primeira dimensão fatorial (41,2% da variância

total) são lactato de etila, ácido acético, carbamato de etila (EC) e acidez do vinho, os quais são congêneres relacionados à indicadores de possível contaminação. As variáveis suplementares representadas pelo rendimento, teor alcoólico dos destilados e álcoois superiores também estão mais bem relacionadas à primeira dimensão da AFM. Assim, o gráfico (Figura 19) indica que a variabilidade relacionada aos congêneres indicadores de possível contaminação (Carbamato de etila, lactato de etila e ácido acético) está relacionada com o coeficiente de congêneres, bem como com o rendimento fermentativo o qual é o maior influenciador do teor alcoólico final dos destilados.

Por outro lado, o vetor “rendimento” encontra-se oposto aos vetores dos congêneres indicadores de possível contaminação, o que indica que, possivelmente, a contaminação do meio interferiu no rendimento. Com isso, as amostras mais contaminadas tiveram menor rendimento e consequentemente, teor alcoólico mais baixo. Essa afirmação é comprovada pelo gráfico (Figura 19), ao observar que os vetores do lactato de etila, carbamato de etila e ácido acético estão completamente opostos ao vetor “teor alcoólico”, pois o aumento do lactato de etila possivelmente significa, maior atividade de bactérias lácticas que interferem na produção de etanol.

Ao ser examinada a segunda dimensão (23,2% da variância total entre as amostras), representada pelo eixo vertical, observa-se que as variáveis ativas teor alcoólico do vinho e pH do vinho são bem representadas. A variável suplementar referente ao coeficiente de congêneres também é bem representada. Observa-se, portanto, que nesta dimensão a variabilidade relacionada aos parâmetros do vinho estava concentrada. Ao observar a variável referente ao pH do vinho, nota-se oposição aos vetores referentes ao ácido acético e acetato de etila, isso mostra que, com o aumento do pH, haveria diminuição do total de ésteres e da acidez. O teor alcoólico do vinho, muito bem representado nesta dimensão, mostra-se oposto aos congêneres de contaminação, demonstrando que quanto maior a quantidade destes congêneres, menor o teor alcoólico do vinho. Isto indica possível estresse da levedura com relação ao aumento das possíveis contaminações durante os ciclos.

No gráfico de contribuição das variáveis nas dimensões 1 e 2 (Figura 19), observou-se que quanto mais próxima a variável está da circunferência do círculo de correlação, mais significativa é sua contribuição e representação no Componente Principal. Com isso, os elementos que mais contribuíram para explicar a variância dos dados são lactato de etila, carbamato de etila, ácido acético, álcool isoamílico e acetato de etila.

Figura 19: Contribuição das variáveis quantitativas suplementares (em verde) e ativas (em preto) nas dimensões 1 e 2 da AFM.

Na Figura 20, estão representadas as amostras projetadas sobre as duas primeiras dimensões geradas pela AFM. É possível observar maior valor das variáveis referentes aos ciclos 10 e 12 da cepa DistilaMax RM (10RM e 12RM) em relação à dimensão 1. Essa distância pode ser interpretada pela maior concentração de compostos relacionados à possível contaminação por microorganismos, como ácido acético, lactato de etila e carbamato de etila. O coeficiente de congêneres foi maior na cachaça referente ao 12º ciclo da cepa DistilaMax RM (Tabela 5) o que justifica ser a amostra de maior distância referente ao eixo horizontal. As amostras 1RM e 3 RM referentes ao primeiro e terceiro ciclos da cepa DistilaMax RM também obtiveram distâncias maiores em relação às outras amostras, possivelmente pois obtiveram maiores valores em relação às variáveis ativas relacionada ao acetaldeído, isobutanol e isoamílico.

No eixo vertical, que representa a segunda dimensão, observa-se maior proximidade multivariada entre as amostras referentes à cepa CanaMax (CNX). Essa proximidade pode ser interpretada pela constância e semelhança das amostras ao longo dos ciclos na maioria das variáveis se comparadas às amostras referentes à cepa DistilaMax RM (RM). Característica importante para a realização dos reciclos, pois quanto mais constantes, melhor.

Figura 20: Representação das cachaaças produzidas a partir das cepas DistilaMax RM (RM), CanaMax (CNX) e seus respectivos ciclos (1°, 3°, 5°, 7°, 10°, 12°, 14°) nas duas primeiras dimensões geradas na AFM.

Com o objetivo de avaliar a terceira dimensão gerada pela AFM, também foi realizada a representação dos grupos de variáveis explorados na AFM e representação das amostras, além da contribuição de cada uma das variáveis na primeira e terceira dimensões (9,6% da variância total entre as amostras) (Figuras 21 e 22).

Neste novo plano gerado pela AFM, é possível observar que a dimensão 3 tem as características do mosto bem representadas (Figura 21). Sendo estas, ART, o pH do mosto e Brix do mosto, assim, as variações da dimensão 3 podem estar motivadas pelas variações do mosto que avaliam a qualidade da cana-de-açúcar usada e não estão associadas às leveduras. Neste sentido, é interessante que esta dimensão tenha a menor variação possível. Assim, essas variáveis possivelmente estão relacionadas com os ciclos, pois o ciclo está intrinsecamente relacionado ao mosto usado.

Na representação das amostras (Figura 22) sobre a primeira e terceira dimensões geradas pela AFM, observa-se maior proximidade entre os mesmos ciclos de diferentes cepas (c1, c3, c7, c12 e c14) indicando características do mosto semelhantes. Os ciclos c5 e c10 apresentam-se mais distantes indicando que os mostos usados apresentaram-se um pouco diferentes dos demais, visto que, Brix, pH e ART obtiveram valores um pouco mais baixos. Sendo que as amostras referentes à cepa CanaMax (CNX) sempre apresentaram valores menores do que as amostras referentes à cepa DistilaMax RM (RM) em relação à dimensão 1.

Figura 21: Contribuição das variáveis quantitativas suplementares (em verde) e ativas (em preto) nas dimensões 1 e 3 da AFM.

Figura 22: Representação das cachaças produzidas a partir das cepas DistilaMax RM (RM), CanaMax (CNX) e seus respectivos ciclos (1°, 3°, 5°, 7°, 10°, 12°, 14°) nas dimensões 1 e 3 geradas na AFM.

A Figura 23 representa o dendrograma hierárquico referente às 14 amostras analisadas quimicamente. É um gráfico tipicamente escalonado, de maneira que distâncias menores entre combinações indicam maior homogeneidade (HAIR et al., 2009). Neste sentido, observou-se que

as amostras referentes aos ciclos 10 e 12 da cepa DistilaMax RM apresentaram-se semelhantes, visto que, estão agrupadas entre si sob pequena distância, entretanto, apresentam pouca homogeneidade em relação às todas as outras amostras devido à discrepante distância apresentada no gráfico.

As amostras 5RM (5º ciclo da cepa DistilaMax RM) e 3CNX (3º ciclo da cepa CanaMax) se mostraram como as mais similares, mesmo não sendo referentes à mesma cepa. Além disso, a Figura 20 também as apresenta bem próximas e no mesmo quadrante, demonstrando que as duas apresentam variáveis ativas e suplementares bastante semelhantes.

Figura 23: Dendrograma de análise hierárquica de agrupamento referente às 14 amostras analisadas quimicamente.

A Figura 24 representa o posicionamento das amostras quanto às suas similaridades e diferenças e demonstra todas as amostras avaliadas quimicamente. A análise fatorial múltipla tem 65,5% da variância explicada das 14 amostras e para a obtenção das elipses de confiança foi empregado o método de *bootstrap* descrito por Lê e Husson (2008) com nível de significância de 95%.

Observou-se que as amostras 12RM e 10RM foram alocadas próximas uma da outra porém sem sobreposição, bem como distante de todas as outras, o que indica que mesmo pertencendo à mesma cepa e à ciclos próximos, as características dos fatores externos que às

afetaram foram sobressalentes. A amostra 3RM, por mais que esteja próxima à 1RM, também não se sobrepuseram.

Houve sobreposição dos primeiros ciclos das duas cepas. Ciclos estes considerados menos ácidos em relação aos seguintes, com menos interferentes por pertencerem à ciclos iniciais. No primeiro ciclo de cada levedura houve semelhanças, indicando que o fator cepa não foi suficiente para distingui-las totalmente.

As amostras 7 CNX, 14 CNX e 7 RM encontraram-se sob a mesma elipse, o que pode indicar maior grau de semelhança. Esse ponto entre as amostras 7 CNX e 14 CNX demonstra resultados positivos, visto que, a cepa CanaMax atingiu constância ao longo dos ciclos, pois a última amostra permaneceu semelhante à referente à metade do processo. Ou seja, 7 ciclos depois, a levedura estava conduzindo o processo com alto grau de semelhança entre os destilados obtidos. Notou-se também que houve sobreposição em todas as amostras referentes à cepa CanaMax, demonstrando, mais uma vez, a capacidade da levedura conduzir o processo de forma semelhante ao longo dos reciclos.

Figura 24: Representação gráfica por AFM do posicionamento das amostras em relação à sua composição química.

4.6. Resultados das análises sensoriais

4.6.1. Teste RATA (*Rate All That Apply*)

As avaliações sensoriais foram realizadas para determinação das principais características de qualidade relacionadas ao perfil físico-químico e para verificação de possíveis diferenças sensoriais existentes entre cachaças brancas obtidas a partir da destilação de vinhos fermentados com diferentes leveduras e seus reciclos.

Observando o gráfico *scree plot* (Figura 26), determinou-se que as 3 primeiras dimensões seriam analisadas, representando um total de 78,21% do total da variância. A primeira dimensão representa 34,8% do total da variância, a segunda representa 25,01% e a terceira, 18,4%.

Figura 25: *Scree Plot* da variância obtida para cada dimensão gerada pela Análise de Componentes Principais (ACP).

A Figura 27 mostra a contribuição das variáveis obtidas no teste RATA, na Análise de Componentes Principais das duas primeiras dimensões. A primeira dimensão foi positivamente relacionada, com as variáveis “Corpo”, “Sensação adocicada”, “Herbáceo/vegetal”, “Floral”, “Frutado”, “Adstringente” e “Alcoólico” e foi negativamente relacionado com as variáveis “Ácido” e “Gosto doce”. Já a segunda dimensão foi bem representada pelas variáveis “Amargo”, “Salgado” “Cristalinidade”, “Picante”, “Cor e “Pungente”.

A Figura 28 mostra a contribuição das variáveis obtidas no teste RATA, na Análise de Componentes Principais da primeira e terceira dimensões. Neste gráfico, a terceira dimensão foi positivamente representada pelas variáveis “Gosto doce”, “Umami”, “Cristalinidade”, “Aroma adocicado” e “Cor”. Foi negativamente representada pelas variáveis “Picante” e “Apimentado”.

Figura 26: Análise de Componentes Principais (ACP) para as variáveis analisadas sensorialmente nas dimensões 1 e 2.

Figura 27: Análise de Componentes Principais (ACP) para as variáveis analisadas sensorialmente nas dimensões 1 e 3.

As Figuras 29 e 30 representa o posicionamento das amostras de acordo com as similaridades e diferenças nas dimensões 1 e 2. As amostras são referentes ao 1º, 7º e 14º ciclos das cepas CanaMax (CNX) e DistilaMax RM (RM). Verificou-se que a amostra 1RM (Figura 29) encontra-se bastante relacionada à dimensão 1 apontando aromas forte sensação de retrogosto adocicado, alto corpo e fortes aromas herbáceo, floral e frutado. Pela proximidade, a amostra 14RM (Figura 29) apresenta características semelhantes, o que mostra que o primeiro e o último ciclo da mesma cepa apresentaram características sensoriais semelhantes. Porém apresenta sensações adstringente e alcoólica mais fortes. Porém, a amostra 7RM (Figura 30) mostrou-se mais distante e bastante relacionada à terceira dimensão, revelando forte gosto doce, intenso aroma adocicado e leve sensação picante.

As amostras da cepa CanMax (CNX), encontraram-se sensorialmente distantes, concluindo que, por mais que esta cepa tenha comportamento químico constante ao longo dos ciclos, não se apresentou com comportamento sensorial semelhante ao longo dos ciclos. A amostra 1CNX relacionou-se à dimensão 3 e apresentou sensação picante e leve aroma adocicado (Figura 30). As amostras 7CNX e 14CNX relacionaram-se melhor com a dimensão 1, sendo a amostra 7CNX (Figura 29) caracterizada com forte gosto ácido e doce. A amostra 14CNX (Figura 30), por sua vez, apresentou gostos amargo, salgado e ácido.

Figura 28: Representação das amostras de cachaças brancas fermentadas por diferentes cepas em diferentes ciclos nas dimensões 1 e 2.

Figura 29: Representação das amostras de cachaças brancas fermentadas por diferentes cepas em diferentes ciclos nas dimensões 1 e 3.

A Figura 31 apresenta as elipses de confiança geradas por método *bootstrap* à nível de confiança de 95% (LÊ; HOUSSEON, 2008) e mostra que, para a cepa canamax, os ciclos 1CNX e 7CNX se sobrepuseram, mostrando-se semelhantes. O ciclo 14CNX não sobrepôs à nenhuma das outras duas de mesma cepa, mostrando-se diferente das outras amostras de mesma cepa. Isso representa constância sensorial até o sétimo ciclo da cepa CanaMax. A cepa DistilaMax RM, apresentou sobreposição entre todas as amostras de mesma cepa, apresentando-se sensorialmente semelhantes ao longo dos reciclos.

Os ciclos 1RM e 1 CNX também obtiveram sobreposição e apresentaram-se semelhantes, mostrando que as duas cepas apresentaram características sensoriais semelhantes, independente dos reciclos e da velocidade de fermentação, visto que as fermentações referentes ao primeiro ciclo tem a menor quantidade de interferentes externos. Os ciclos 7RM e 7CNX também obtiveram sobreposição mostrando-se semelhantes e por fim, o ciclo 7RM apresentou sobreposição à todas as outras amostras, apresentando-se sensorialmente semelhante à todas as amostras.

Figura 30: Representação das amostras de cachaças brancas e de suas elipses de confiança (95%) nas dimensões 1 e 2 geradas pela Análise de Componentes Principais.

O mapa de preferência apresentado na Figura 32 auxilia na compreensão dos resultados já apresentados. Amostras correspondentes aos níveis de preferência mais altos, encontram-se nas zonas mais avermelhadas e as amostras posicionadas nas áreas em azul, correspondem aos níveis de preferência mais baixos. Nesse contexto, as amostras referentes aos ciclos 1 e 7 foram bem aceitas, sendo a amostra referente ao 7º ciclo da cepa DistilaMax RM, a preferida. Os últimos ciclos das duas cepas foram menos aceitos, indicando que, seguindo a mesma metodologia que foi descrita neste trabalho, a levedura foi capaz de desenvolver um bom perfil sensorial até o sétimo ciclo. Após isso, o produto final pode não ser bem aceito sensorialmente.

Figura 31: Mapa de preferência gerado a partir das amostras de cachaças brancas.

Os dois testes sensoriais (aceitação com escala hedônica e RATA) apresentaram-se, por fim, em concordância. Mostrando que, em ordem de preferência, a amostra 7RM foi a preferida, seguida das amostras 1RM, 1CNX, 7CNX, 14RM e 14CNX, nesta ordem.

Assim, características como gosto doce e aroma adocicado revelam produto com boa aceitabilidade sensorial dos consumidores. Entretanto, características como gosto amargo, salgado e ácido, bem como sensações adstringente e alcoólica não são bem aceitas sensorialmente. Resultados estes, que se encontram de acordo com Odello et al. (2009), o qual afirmaram que o gosto doce melhora a qualidade sensorial da bebida, bem como, as características como acidez, sabor de álcool e gosto amargo são consideradas negativas.

Comparando-se as análises físico-químicas com as análises de aceitação, foi possível observar resultados opostos. Os testes físico-químicos dos destilados apontaram que as cachaças obtidas através da cepa CanaMax tinham melhor qualidade, por outro lado, os testes de

aceitabilidade mostraram resultados surpreendentemente positivos para a cepa DistilaMax RM, ressaltando seu potencial sensorial.

O teste de aceitação visa determinar o grau de aceitabilidade global de um produto, identificar fatores sensoriais determinantes da preferência ou medir respostas específicas a atributos sensoriais particulares de um produto. Essa é a avaliação escolhida quando deseja-se determinar o “*status* afetivo” de um produto, ou seja, quão bem é apreciado pelos consumidores (DUTCOSKY, 2013; MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2016).

Segundo Lawless e Heymann (2010), os testes de aceitabilidade não requerem uma escolha de alternativas. Em comparação aos testes de preferência, os de aceitação fornecem a informação sobre “gostar” ou “não gostar” do produto de forma absoluta. A quantificação do teste de aceitabilidade é feita através de escalas, sendo a escala hedônica de 9 pontos, popularizada em 1940, a mais comum.

A escala hedônica avalia a resposta de um grupo de consumidores a uma série de perguntas que visam a determinar o grau de aceitabilidade global de um produto, identificar fatores sensoriais determinantes da preferência ou medir respostas específicas a atributos sensoriais particulares de um produto. A escala hedônica de 9 pontos é a mais utilizada para estudos de preferência com adultos e a análise estatística dos resultados é realizada por análise de variância (ANOVA) para saber se existe ou não diferença no nível de aceitabilidade entre amostras, ou rejeição (DUTCOSKY, 2013).

4.6.2. Teste de aceitação

Os dados de aceitação dos atributos aroma, sabor e avaliação global estão apresentados na Tabela 7. Os resultados mostraram que em relação ao “aroma” e “avaliação global”, houve diferença significativa ($p \leq 0,05$). A amostra 7RM foi a que apresentou maior aceitação em relação ao atributo aroma, seguida da amostra 1RM, e em terceiro lugar a amostra 7CNX. Em relação ao atributo sabor, a amostra 7RM também foi considerada a mais bem aceita, seguida pela amostra 1RM e, em terceiro lugar a amostra 1CNX. Com relação à avaliação global, as amostras 7RM e 1RM foram as mais bem aceitas, nesta ordem, seguido da amostra 1CNX.

Tabela 7: Médias de aceitação das amostras de cachaça obtidas em teste de aceitação

Amostra	Avaliação Global	Aroma	Sabor
1RM	4,87 ^a ± 2,588	5,07 ^a ± 2,052	4,53 ^a ± 2,326
7RM	4,73 ^{a b} ± 1,792	5,40 ^a ± 1,920	5,07 ^a ± 2,463
14RM	3,20 ^{a b} ± 2,366	3,80 ^{a b} ± 2,678	3,67 ^a ± 2,350
1CNX	4,13 ^{a b} ± 2,232	4,67 ^{a b} ± 2,193	4,00 ^a ± 2,104
7CNX	3,60 ^{a b} ± 2,028	4,80 ^{a b} ± 1,568	3,80 ^a ± 2,178
14CNX	2,33 ^b ± 1,676	2,67 ^b ± 1,568	2,73 ^a ± 1,870

Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Legenda: 1RM = amostra referente ao 1º ciclo da cepa DistilaMax RM; 7RM = amostra referente ao 7º ciclo da cepa DistilaMax RM; 14RM = amostra referente ao 14º ciclo da cepa DistilaMax RM; 1CNX = amostra referente ao 1º ciclo da cepa CanaMax; 7CNX = amostra referente ao 7º ciclo da cepa CanaMax; 14CNX = amostra referente ao 14º ciclo da cepa CanaMax.

Os resultados apresentados na Figura 25 mostram a porcentagem avaliada pelo painel sensorial entre “gostei moderadamente” e “gostei muitíssimo” para os atributos aroma, sabor e avaliação global das amostras. A amostra 1RM obteve frequência de 26,7% em relação ao aroma, enquanto a amostra 7RM obteve 33,4%. E em relação ao sabor, as duas primeiras amostras obtiveram frequências semelhantes. A amostra 14RM foi a mais negativamente avaliada dentre as amostras da cepa DistilaMax RM obtendo frequência de 20% para o aroma e 6,7% para o sabor.

Dentre as amostras referentes à cepa CanaMax, a amostra 1CNX foi a mais bem avaliada em relação ao aroma com frequência de 20%. Com relação à frequência em relação ao sabor foi mais bem avaliada na amostra 7CNX com 13,4%. A amostra 14CNX não obteve nenhuma frequência de avaliação positiva para nenhum dos atributos avaliados, tornando-se a amostra menos aceita sensorialmente. A avaliação global ao longo das amostras, apresentou perfil decrescente, mostrando que, de modo geral, ao longo dos ciclos, as amostras se tornam menos sensorialmente aceitas.

Figura 32: Representação gráfica dos resultados do teste de aceitação em relação aos atributos aroma, sabor e avaliação global demonstrando a frequência (%) entre gostei “moderadamente” e “muitíssimo”.

Legenda: 1RM = amostra referente ao 1º ciclo da cepa DistilaMax RM; 7RM = amostra referente ao 7º ciclo da cepa DistilaMax RM; 14RM = amostra referente ao 14º ciclo da cepa DistilaMax RM; 1CNX = amostra referente ao 1º ciclo da cepa CanaMax; 7CNX = amostra referente ao 7º ciclo da cepa CanaMax; 14CNX = amostra referente ao 14º ciclo da cepa CanaMax.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A prática de reciclo fermentativo na produção de cachaça feita sem tratamento ácido da biomassa e sem tratamento térmico do caldo pode gerar resultados inconstantes. Como observado nesta pesquisa, ao longo dos reciclos, o rendimento, bem como, os congêneres voláteis formados apresentaram variações. Essas mudanças possivelmente ocorreram devido à contaminação por microorganismos provenientes do meio fermentativo. A possível presença destes microorganismos provocou competição entre estes, e as leveduras inseridas para fermentação, bem como, a produção de compostos em quantidades diferentes das desejadas. A inserção do mosto e da biomassa sem o tratamento, tornou o meio menos estável, auxiliando a possível presença destes microorganismos não desejados. Práticas de tratamento de caldo demandam mais esforço, mas devem garantir mais qualidade ao produto final. Além disso, a inserção destes métodos pode garantir maior quantidade de reciclos fermentativos estáveis.

O tipo de fermento influencia na composição química dos destilados. Ao comparar-se somente o primeiro ciclo de cada cepa, a quantidade de congêneres formada diferenciou-se entre os tipos de leveduras. A cepa CanaMax foi capaz de produzir cachaças mais consistentes em quantidade de congêneres ao longo dos reciclos. Assim, a característica de “boa performance em condições adversas” citada pela fabricante foi comprovada.

A cepa DistilaMax RM, por sua vez, não promoveu cachaças tão consistentes ao longo de seus reciclos, quanto a cepa CanaMax, visto que a contaminação proveniente do caldo de cana, principalmente nos 10º e 12º ciclos, afetaram bastante sua produtividade. Porém, gerou características bem aceitas aos destilados, visto que a amostra preferida sensorialmente foi referente à esta cepa.

Como alternativa à futuros trabalhos, é interessante avaliar as características destas cepas em meios mais propícios à suas atividades, como, a utilização do tratamento térmico do caldo e o uso dos processos Melle-Boinot ou Melle-Boinot-Almeida (MUTTON; MUTTON, 2016) para tratamento da biomassa resultante das leveduras. Bem como, a inclusão de análises de viabilidade celular das leveduras, cariotipagem e avaliação da contaminação bacteriana nos meios fermentativos.

REFERÊNCIAS

- ALCARDE, A. R. **Cachaça: ciência, tecnologia e arte** [livro eletrônico]. 2 ed. São Paulo: Blucher. 2017. 96p.; PDF.
- ALCARDE, A. R.; MONTEIRO, B. M. S.; BELLUCO, A. E. S. Composição química de aguardentes de cana-de-açúcar fermentadas por diferentes cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 8, p. 1612-1618, Set. 2012.
- AMERINE, M. A.; PANGBORN, R. M.; ROESSLER, E. M. **A Principle of Sensory Evaluation of Foods**. 1 ed. New York: Academic Press, 1967. 612p.
- AMORIM, H. V. de; LEAO, R. M. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. 1 ed. Piracicaba: Fermentec. 2005. 434 p.
- AMORIM, J. C.; SCHWAN, R. F.; DUARTE, W. F. Sugar cane spirit (cachaça): Effects of mixed inoculum of yeasts on the sensory and chemical characteristics. **Food Research International**, v. 85, p. 76-83, Jul. 2016.
- ANDRADE-SOBRINHO, L. G. de et al. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa). **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6B, p. 1074-1077, Dez. 2002.
- ANDRADE SOBRINHO, L. G. de et al. Teores de carbamato de etila em aguardentes de cana e mandioca: parte II. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 116-119, Dez. 2009.
- AQUARONE, E. et al. **Biotecnologia industrial – volume 4: biotecnologia na produção de alimentos**. 1 ed. São Paulo: Blucher. 2001. 544p.
- AQUINO, F. W. B. de et al. Simultaneous determination of aging markers in sugar cane spirits. **Food Chemistry**, v. 98, p. 569-574, Jul. 2006.
- ARES, G. et al. Evaluation of a rating-based variant of check-all-that-apply questions: Rate-all-that-apply (RATA). **Food Quality and Preference**, v. 36, p. 87-95, Sep. 2014.
- BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS yeast research**, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, Nov. 2008.
- BERRY, D. R; SLAUGHTER, J. C. Alcoholic Beverage Fermentations. In: LEA, A. G. H; PIGGOTT, J. R. **Fermented beverage production**. 2 ed. New York: Springer Science & Business Media. 2003. 423p.
- BINDLER, F.; VOGES, E.; LAUGEL, P. The problem of methanol concentration admissible in distilled fruit spirits. **Food Additives & Contaminants**, v. 5, n. 3, p. 343-351, 1988.
- BOGUSZ JUNIOR, S. et al. Composição química da cachaça produzida na região noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 793-798, Dec. 2006.

BORTOLETTO, A. M. **Influência da madeira na qualidade química e sensorial da aguardente de cana envelhecida**. 230p. 2016. Tese (Doutorado em Ciência e tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

BORTOLETTO, A.M.; ALCARDE, A.R. Congeners in sugar cane spirits aged in casks different woods. **Food Chemistry**, v. 139, p. 695-701, Aug. 2013.

_____. Assessment of chemical quality of Brazilian sugar cane spirits and cachaças. **Food Control**, v. 54, p. 1-6, Aug. 2015.

_____. Produção de Cachaça. In: ALCARDE, A. R.; REGITANO-D'ARCE, M. A.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. 2 ed. São Paulo: Manole. 2020. 480p. BORTOLETTO, A. M.; SILVELLO, G. C.; ALCARDE, A. R. Good manufacturing practices, hazard analysis and critical control point plan proposal for distilleries of cachaça. **Scientia Agricola**, v. 75, n. 5, p. 432-443, Sep./Oct. 2018.

BOSCOLO, M. et al. Identification and dosage by HRGC of minor alcohols and esters in Brazilian sugar-cane spirit. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 1, p. 86-90, 2000.

BOZA, Y.; HORII, J. Influência da destilação sobre a composição e a qualidade sensorial da aguardente de cana-de-açúcar. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 391-396, Oct./Dec. 1998.

BRAGA, M. V. F.; KIYOTANI, I. B. A cachaça como patrimônio: turismo, cultura e sabor. **Revista de Turismo Contemporâneo - RTC**, Natal, v. 3, n. 2, p. 254-275, Jul./Dez. 2015.

BRASIL Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005, **Diário Oficial da União**, seção 1, p. 3-4, 30 jun. 2005a.

_____. Instrução Normativa nº 24 de 8 de setembro de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, 09 set. 2005b. Seção I, p.11.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **A Cachaça no Brasil: dados de registro de cachaças e aguardentes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. 2. ed. – Brasília: MAPA/AECS, 2020. 27 p.

BUGLASS, A. J. **Handbook of alcoholic beverages: technical, analytical and nutritional aspects**. 1 ed. Chichester: John Wiley & Sons. 2011. 1204 p.

BURDOCK, G. A. **Fenaroli's handbook of flavor ingredients**. 4 ed. Boca Raton: CRC Press, 2002. 1831 p.

CALDAS, C. **Novo manual para laboratórios sucroalcooleiros**. Piracicaba: Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil. 2012. 744 p.

- CAMPOS, C. R. et al. Features of *Saccharomyces cerevisiae* as a culture starter for the production of the distilled sugar cane beverage, cachaça in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 6, p. 1871-1879, May. 2010.
- CARDOSO, M. G. **Produção de Aguardente de Cana**. 2 ed. Lavras: Editora UFLA. 2006. 340 p.
- CARDOSO, M. das G. **Produção de Aguardente de Cana**. 3 ed. Lavras: Editora UFLA. 2013. 340 p.
- CATTANEO, S. et al. Heat damage and in vitro starch digestibility of puffed wheat kernels. **Food Chemistry**, v. 188, p. 286-293, Dec. 2015.
- CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 124 p. 2003. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- CIESAROVÁ, Z. et al. Effect of heat treatment and dough formulation on the formation of Maillard reaction products in fine bakery products – benefits and weak points. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 48, n. 1, p. 20-30, Mar. 2009.
- CLEGG, B. S.; FRANK, R. Detection and quantitation of trace levels of ethyl carbamate in alcoholic beverages by selected ion monitoring. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 36, n. 3, p. 502-505, May. 1988.
- COOMBS, C. H. **A Theory of Data**. 1 ed. New York: John Wiley & Sons. 1964. 585 p.
- CORNIANI, L. S.; BORTOLLETO, A. M. ; CORREIA, A. C. ; ALCARDE, A. R. . Influência das variedades de cana-de-açúcar e do tratamento do caldo na composição de congêneres voláteis e contaminantes em cachaça. In: XIX Encontro Nacional e V Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos, 2015, Natal. **Livro de resumo ENAAL 2015**. Natal: SBAAL, 2015. Disponível em: <
https://www.researchgate.net/publication/281377514_Influencia_das_variedades_de_cana-de-acucar_e_do_tratamento_do_caldo_na_composicao_de_congeneres_volateis_e_contaminantes_em_cachaca>. Acesso em 25 mar. 2021.
- CORRÊA, A. C. **Composição química e características sensoriais de cachaças monodestiladas produzidas com leveduras selecionadas e fermento natural**. 2020. 193 p. Tese (Doutorado em Ciência e tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020.
- DATO, M. C. F.; PIZAURRO JÚNIOR, J. M.; MUTTON, M. J. R. Analysis of the secondary compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* and wild yeast strains during the production of " cachaça". **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 70-74, Jan./Mar. 2005.

- DOOLEY, L.; LEE, Y.; MEULLENET, J. The application of check-all-that-apply (CATA) consumer profiling to preference mapping of vanilla ice cream and its comparison to classical external preference mapping. **Food quality and preference**, v. 21, n. 4, p. 394-401, Jun. 2010.
- DÓREA, H. S. et al. Análise de poluentes orgânicos tóxicos na cachaça. **Revista da Fapese**, v. 4, n. 2, p. 5-18, Jul./ Dez. 2008.
- DUARTE, W. Fe. et al. Effect of co-inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus fermentum* on the quality of the distilled sugar cane beverage cachaça. **Journal of food science**, v. 76, n. 9, p. C1307-C1318, Oct. 2011.
- DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. 4.ed. Curitiba: PUCPRes - Editora Universitária Champagnat. 2013. 540 p.
- EMBRAPA. Cachaça. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONT000fiog1ob502wyiv80z4s473agi63ul.html>>. Acesso em: 01 de junho de 2019.
- ERTEN, H.; TANGULER, H. Influence of *Williopsis saturnus* yeasts in combination with *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. **Letters in applied microbiology**, v. 50, n. 5, p. 474-479. Apr. 2010.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages. The EFSA Journal 551: 1-44. Disponível em: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2007.551>. Pdf, 2007. Acesso em 11 de fevereiro de 2021.
- FARIA, E. V.; YOTSUYANAGI, K. **Técnicas de Análise Sensorial**. Campinas: ITAL/LAFISE. 2002. 116 p.
- FARIA, J. B.; LOYOLA, E.; LÓPEZ, M. G.; DUFOUR, J. P. Cachaça, Pisco e Tequila. In: LEA, A. G. H.; PIGGOTT, J. R. **Fermented beverage production**. 2 ed. New York: Springer Science & Business Media. 2003. 423p.
- GIACALONE, D.; HEDELUND, P. I. Rate-all-that-apply (RATA) with semi-trained assessors: An investigation of the method reproducibility at assessor-, attribute-and panel-level. **Food Quality and Preference**, v. 51, p. 65-71, Jul. 2016.
- GIUDICI, P.; ZAMBONELLI, C.; KUNKEE, R.E. Increased production of n-propanol in wine by yeast strains having an impaired ability to form hydrogen sulfide. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 44, p. 17-21, Jan. 1993.
- GONÇALVES, R. C. F. et al. Compostos voláteis em cachaças de alambique produzidas por leveduras selecionadas e por fermentação espontânea. **MAGISTRA**, v. 28, n. 3/4, p. 285-293, Jul./Dez. 2017.

- GUERRA, J. B. et al. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. **Letters in applied microbiology**, v. 33, n. 2, p. 106-111, Dec. 2001.
- HAIR, J. F. et al. **Análise multivariada de dados**. 6 ed. Porto Alegre: Bookman companhia editora. 2009. 688 p.
- IBRAC – INSTITUTO BRASILEIRO DA CACHAÇA (2019a). Mercado Interno da Cachaça, disponível em: <http://www.ibrac.net/index.php/servicos/estatisticas/mercado-interno>, acesso em 17 de junho de 2019 às 14h09min.
- IBRAC – INSTITUTO BRASILEIRO DA CACHAÇA (2019b). Mercado Externo da Cachaça, disponível em: <http://www.ibrac.net/index.php/servicos/estatisticas/mercado-externo>, acesso em 17 de junho de 2019 às 14h10min.
- ISIQUE, W. D.; LIMA-NETO, B. S.; FRANCO, D. W. A qualidade da cachaça, uma opinião para discussão. **O Engarrafador Moderno**, p.32-36, julho. 2002.
- ISO 3591:1977. Sensory analysis – Apparatus – Wine tasting glass.
- JAEGER, S. R.; ARES, G. RATA questions are not likely to bias hedonic scores. **Food Quality and Preference**, v. 44, p. 157-161, Sep. 2015.
- JAEGER, S. R. et al. What does it mean to check-all-that-apply? Four case studies with beverages. **Food Quality and Preference**, v. 80, p. 103794, Mar. 2020.
- JANZANTTI, N. S. **Compostos de volateis e qualidade de sabor da cachaça**. 179p. 2004. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- LACHENMEIER, D. W.; SOHNIUS, E. The role of acetaldehyde outside ethanol metabolism in the carcinogenicity of alcoholic beverages: evidence from a large chemical survey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2903-2911, Aug. 2008.
- LALLEMAND BIOFUELS & DISTILLED SPIRITS. CanaMax, 2021a. Disponível em: <https://lallemandcraftdistilling.com/wp-content/uploads/2018/11/TDS-CanaMax-1.pdf>>. Acesso em 15 de março de 2021.
- LALLEMAND BIOFUELS & DISTILLED SPIRITS, DistilaMax RM, 2021b. Disponível em: <https://www.lallemandbds.com/wp-content/uploads/2012/12/DistilaMax-RM_MKE_2015-LOW-RES.pdf>. Acesso em: 15 de março de 2021.
- LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos: Métodos Cromatográficos de Análise**. 1 ed. São Carlos: Ed. Rima. 2004. 62p.
- LAWLESS, H. T.; HEYMANN, H. **Sensory evaluation of food: principles and practices**. 2 ed. Berlin: Springer Science & Business Media, 2010. 596 p.

- LÊ, S.; JOSSE, J.; HUSSON, F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. **Journal of Statistical Software**. v. 25, Mar 2008.
- LIMA, A. J. B. et al. Emprego do carvão ativado para remoção de cobre em cachaça. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 247-250, Mar/Apr. 2006.
- LIMA, A. J. B. et al. Efeito de substâncias empregadas para remoção de cobre sobre o teor de compostos secundários da cachaça. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 845-848, Fev. 2009.
- LIMA, U. A. **Aguardente: fabricação em pequenas destilarias**. 1 ed. Piracicaba: Fealq, 1999. 187 p.
- LIMA U.A.; BASSO L.C.; AMORIM H.V. Produção de etanol. In: AQUARONE U. A.; BORZANI E.; SCHMIDELL W. **Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. 1 ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher. 2001. 616 p.
- LIMA, W. J. N. **Produção de proteínas recombinantes utilizando Escherichia coli em cultivos em alta densidade celular**. 158 p. 2004. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2004.
- LOPES, M. L. et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 47, p. 64-76, Dec. 2016.
- MAIA, A. B.; MARINHO, L. S.; NELSON, D. L. Advance in the characterization of alambic cachaça: ethyl lactate. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, p. 1-13, Aug. 2020.
- MASSON, J. et al. Parâmetros físico-químicos e cromatográficos em aguardentes de cana queimada e não queimada. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1805-1810, Nov./ Dec. 2007.
- MEILGAARD, M. C.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 5 ed. Boca Raton: CRC press. 2016. 600 p.
- MESÍAS-GARCÍA, M.; GUERRA-HERNÁNDEZ, E.; GARCÍA-VILLANOVA, B. Determination of furan precursors and some thermal damage markers in baby foods: ascorbic acid, dehydroascorbic acid, hydroxymethylfurfural and furfural. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 6027-6032, Apr. 2010.
- MILANI, M. I. **Sistemas de screening para detecção de furfural e hidroximetilfurfural e amostras de cachaça por espectroscopia de reflectância difusa**. 91p. 2016. Dissertação (Mestrado em Química) - Escola Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2016.
- MIRANDA, M. B. **Avaliação físico-química de cachaças comerciais e estudo da influência da irradiação sobre a qualidade da bebida em tonéis de carvalho**. 70 p. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

- MIRANDA, M. B, HORII, J.; ALCARDE, A. R. Estudo do efeito da irradiação gamma (60CO) na qualidade da cachaça e no tonel de envelhecimento. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 4, p. 772-778, Oct. / Dec. 2006.
- MIRANDA, M. B. et al. Qualidade química de cachaças e de aguardentes brasileiras. **Food Science and Technology**, v. 27, n. 4, p. 897-901, Oct./Dec. 2007.
- MIYAKE, T.; SHIBAMOTO, T. Quantitative analysis of acetaldehyde in foods and beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1968-1970, Nov. 1993.
- MOREIRA, R. F. A.; NETTO, C. C.; DE MARIA, C. A. B. A fração volátil das aguardentes de cana produzidas no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 9, p. 1819-1826, Ago. 2012.
- MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. Aguardente de Cana. In: VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia (Volume 1)**. 2 ed. São Paulo: Editora blucher, 2016. 575 p.
- NARENDRANATH, N.V. Bacterial contamination and control in ethanol production. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. **The alcohol textbook**. 4 ed. Nottingham: Nottingham University Press. 2003. 446 p.
- 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 of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 14, p. 5488-5493, Jun. 2008.
- _____. Comparação de técnicas de determinação de ésteres em cachaça. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2323-2327, Nov. 2009.
- NG, M.; CHAYA, C.; HORT, J. Beyond liking: Comparing the measurement of emotional response using EsSense Profile and consumer defined check-all-that-apply methodologies. **Food Quality and Preference**, v. 28, n. 1, p. 193-205, Apr. 2013.
- NOGUEIRA, A.M.P.; VENTURINI FILHO, W.G. **Aguardente de cana**. 1 ed. Botucatu: UNESP, Faculdade de Ciências Agronômicas. 2005. 71 p.
- NOVAES, F.V. Destilando com qualidade. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE AGUARDENTE DE QUALIDADE. 1. Copacsp. 2009.
- ODELLO, L. et al. Avaliação sensorial de cachaça. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 7, p. 1839-1844, Aug. 2009.
- OLIVEIRA, A. M. L. **O processo de Produção da Cachaça Artesanal e sua Importância Comercial**. 2010. 44 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

OLIVEIRA, E. S. **Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais.** 91p. 2001. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Campinas, Campinas, 2001.

OLIVEIRA, E. S. et al. The production of volatile compounds by yeasts isolated from small Brazilian cachaça distilleries. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 8-9, p. 1569-1576, Dec. 2005a.

OLIVEIRA, E. S. et al. The influence of different yeasts on the fermentation, composition and sensory quality of cachaça. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 707-715, Jul. 2005b.

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

OLIVEIRA, V. A. et al. Biochemical and molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains obtained from sugar-cane juice fermentations and their impact in cachaça production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 693-701, Dec. 2008.

OPPERMANN, A. K. L. et al. Comparison of Rate-All-That-Apply (RATA) and Descriptive sensory Analysis (DA) of model double emulsions with subtle perceptual differences. **Food Quality and Preference**, v. 56, p. 55-68, Sep. 2016.

PENTEADO, J. C. P.; MASINI, J. C. Heterogeneidade de álcoois secundários em aguardentes brasileiras de diversas origens e processos de fabricação. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 1212-1215, Mai. 2009.

PEREIRA, A. F. et al. Adição de fontes de nitrogênio e de duas linhagens de levedura na fermentação alcoólica para produção de cachaça. **Revista de Engenharia Química e Química – REQ²**, v. 01, n. 01, p. 45-59, Jul. 2015.

PEREIRA, N. E. et al. Compostos secundários em cachaças produzidas no Estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 5, p. 1068-1075, Oct. 2003.

PIGGOTT, J. R.; SHARP, R.; DUNCAN, R. E. B. **The science and technology of whiskies.** 1 ed. New York: Longman, 1989. 424 p.

PIGGOTT, J. **Alcoholic beverages: sensory evaluation and consumer research.** 1 ed. Cambridge: Woodhead Publishing - Elsevier, 2012. 795 p.

PORTUGAL, C. B. et al. How native yeasts may influence the chemical profile of the Brazilian spirit, cachaça? **Food Research International**, v. 91, p. 18-25, Jan. 2017.

- RAJCHL, A. et. al. Evaluation of shelf life and heat treatment of tomato products. **Czech Journal of Food Science**, v. 27, p. 130-133, Jan. 2009.
- RIACHI, L. G. et al. A review of ethyl carbamate and polycyclic aromatic hydrocarbon contamination risk in cachaça and other Brazilian sugarcane spirits. **Food chemistry**, v. 149, p. 159-169, Apr. 2014.
- RIBEIRO, C. A. F.; BLUMER, S. A. G.; HORII, J. **Fundamentos de tecnologia sucroalcooleira**. 1 ed. Piracicaba: USP, 1999. 33 p.
- ROSA, C. A.; SOARES JÚNIOR, A. M.; FARIA, J. B. Cachaça de Alambique. In: VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia (Volume 1)**. 2 ed. São Paulo: Editora Blucher, 2016. 575 p.
- SANDRE, S. **Cachaça: patrimônio brasileiro**. 164 p. 2004. Monografia (Especialização em Gastronomia e Segurança Alimentar). Universidade de Brasília, Brasília, 2004.
- SENSORY ANALYSIS: **General guidance for the design of test rooms**, ISO 8589:2007, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland.
- SERAFIM, F. A. T. **Contribuição para a tipificação da aguardente de cana de açúcar utilizando análise química**. 155 p. 2015. Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica). Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015
- SILVA, A. P. de et al. Composição química de aguardente de cana obtida por diferentes métodos de destilação. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 23, Feb. 2020.
- SILVA, J. M. **Cachaça: história, gastronomia e turismo**. 1 ed. São Paulo: Editora Senac São Paulo, 2018. 322 p.
- SOARES, T. L.; SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F. Acompanhamento do processo de fermentação para produção de cachaça através de métodos microbiológicos e físico-químicos com diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 31, n. 1, p. 184-187, Jan./ Mar. 2011.
- SOUZA, L. M. et al. Teores de compostos orgânicos em cachaças produzidas na Região Norte Fluminense-Rio de Janeiro. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2304-2309, Nov. 2009.
- SOUZA, L. M. et al. **Produção de cachaça de qualidade**. 1 ed. Piracicaba: ESALQ, 2013. 72 p.
- SOUZA, M. D. C. A. et al. Characterization of cachaça and rum aroma. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 2, p. 485-488, Dec. 2006.
- STUPIELLO, J.P. Destilação do vinho. In: MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. **Aguardente de cana: produção e qualidade**. 1 ed. Jaboticabal: Funep, Unesp, 1992. p. 67-78.
- TAVARES, A. G.; DA PAZ DANTAS, J.; DE MENDONÇA NÓBREGA, W. R. A cachaça como patrimônio cultural e turístico. **Revista Hospitalidade**, n. 1, p. 387-410, Dec. 2015.

VALENTIN, D. et al. Quick and dirty but still pretty good: A review of new descriptive methods in food science. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 8, p. 1563-1578, May. 2012.

VIANA, A. R. **Cachaça de alambique**. 1 ed. Niterói: PESAGRO-RIO, 2008. 20 p.

VIDAL, L. et al. Comparison of rate-all-that-apply (RATA) and check-all-that-apply (CATA) questions across seven consumer studies. **Food Quality and Preference**, v. 67, p. 49-58, Jul. 2018.

VILELA, F. J. et al. Determinação das composições físico-químicas de cachaças do sul de Minas Gerais e de suas misturas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1089-1094, Jul./ Ago. 2007.

WHEALS A. E., BASSO L. C, ALVES D. M. G; AMORIM H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, v. 17, p. 482–487, Dec. 1999.

WILLIAMS, E. J. Experimental designs for the estimation of residual effects of treatments. **Australian Journal of Scientific Research Series A: Physical Science**, v. 2, p. 149-168. Dec. 1948.

ZIMMERLI, B.; SCHLATTER, J. Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 259, n. 3-4, p. 325-350, Mar./ Apr. 1991.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido apresentado aos provadores anteriormente à aplicação das análises sensoriais.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O TCLE é o documento básico e fundamental do protocolo e da pesquisa com ética. É a fonte de esclarecimento que permite ao sujeito da pesquisa tomar sua decisão, de participar do projeto como voluntário, de forma justa e sem constrangimentos. É a proteção legal e moral do pesquisador, posto que é a manifestação clara de concordância com a participação na pesquisa. Uma via do TCLE assinado pelo participante deverá ser arquivada pelo pesquisador e uma via do TCLE assinado pelo pesquisador será entregue ao participante.

Título da pesquisa: Qualidade química e sensorial de cachaças produzidas a partir do reciclo de células de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) comerciais.

Objetivo da pesquisa: Avaliar a viabilidade de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (DistilaMax RM e Canamax – Lallemand Biofuels & Distilled Spirits) na produção de cachaça através do reciclo da cepa fermentativa.

Procedimentos que serão utilizados: Foram produzidas 06 cachaças monodestiladas utilizando 02 cepas de leveduras comerciais. Após a produção, as amostras passaram por análises químicas. Nesta etapa da pesquisa, será realizada a análise sensorial incluído o teste de aceitação e o RATA (*Rate All That Apply*) nos quais serão oferecidas 06 amostras contendo 30 mililitros de cada cachaça, a 40% v/v de teor alcoólico. O painel deverá avaliar as amostras de acordo com sua preferência seguindo as especificações descritas no papel. Será realizada uma sessão por pessoa.

1. **Riscos possíveis e benefícios esperados:** nesta pesquisa, os riscos relacionados ao consumo de bebidas alcoólicas existem e serão minimizados, pois os participantes serão aconselhados a não consumir, ou seja, não deglutir o produto durante a sessão de análise sensorial, visto que nenhuma quantidade de etanol no sangue é permitida pela legislação nacional para a condução de veículos. O benefício da pesquisa será a obtenção de resultados práticos e realistas que contribuam para o desenvolvimento de cachaças monodestiladas que apresentem qualidade sensorial superior. A pesquisa será acompanhada integralmente pelo seu responsável, o qual garante total assistência ao sujeito durante a realização da pesquisa.
- Fica garantido o direito de esclarecimento de qualquer dúvida ou curiosidade do voluntário, quer seja antes, durante ou após a realização da pesquisa.
- Fica garantido aos sujeitos da pesquisa o direito de recusar a participar em qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer penalidade.
- Fica garantido o sigilo de dados confidenciais ou que, de algum modo, possam provocar constrangimentos ou prejuízos ao voluntário. Os dados serão publicados e apresentados em reuniões científicas sem identificação dos voluntários.
- Conforme já citado há riscos, porém se não houver a deglutição do produto, esses serão minimizados.
- Uma via do TCLE será entregue ao voluntário.
- Ciente do compromisso assumido, subscrevo-me a seguir:
- Nome _____ (completo)
- Assinatura _____

Piracicaba, _____ de _____ de 2020

Luisa Costa de Carvalho - Pesquisadora responsável

Mestranda na Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” -

Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição - Setor de Açúcar e Alcool

Av. Pádua Dias, 11 – CP 9 – 13418-900 – Piracicaba-SP Fone: (19) 3429-4198

E-mail: luisaccarvalho@usp.br

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos na USALQ/USP (CEP)

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

Av. Pádua Dias, 11 – CP 9 – 13418-900 – Piracicaba-SP Fone: (19) 3429-4400 – Fax: (19) 3429-4225

E-mail: cep.esalq@usp.br

APÊNDICE B. Ficha de avaliação sensorial

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
 ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”
 DEPARTAMENTO DE AGROINDÚSTRIA, ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
 CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TESTE DE ACEITAÇÃO

Consumidor: _____

AMOSTRA: **ADV**

Você está recebendo uma amostra de **Cachaça Branca**. Por favor, prove-a e marque o quanto você gostou na escala abaixo. Em seguida, pontue a amostra na tabela de atributos.

9. Gostei muitíssimo
 8. Gostei muito
 7. Gostei moderadamente
 6. Gostei ligeiramente
 5. Nem gostei/Nem desgostei
 4. Desgostei ligeiramente
 3. Desgostei moderadamente
 2. Desgostei muito
 1. Desgostei muitíssimo

ATRIBUTOS	AMOSTRA (Código)
	ADV
Aroma	
Sabor	
Avaliação global	

TESTE RATA (*Rate All That Apply*)

Avalie e marque um X em todos os aspectos que você considera adequados para descrever essa cachaça:

- 1- Corpo (0: Baixo corpo; 5: Alto corpo)

0	1	2	3	4	5

- 2- Cor (0: Transparente; 5: Marrom)

0	1	2	3	4	5

- 3- Cristalinidade (0: Cristalina; 5: Turva)

0	1	2	3	4	5

- 4- Aromas (0: Aroma fraco; 5: Aroma forte)

	0	1	2	3	4	5
Frutado						
Floral						
Adocicado						

Herbáceo/vegetal						
------------------	--	--	--	--	--	--

5- Gostos (0: Gosto fraco; 5:Gosto forte)

	0	1	2	3	4	5
Amargo						
Salgado						
Ácido						
Doce						
Umami						

6- Sensações (0: Sensação fraca; 5: Sensação forte)

	0	1	2	3	4	5
Picante						
Pungente						
Adstringente						
Alcoólico						
Apimentado						
Adocicado						

ANEXOS

ANEXO A. Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos de aprovação das análises sensoriais realizadas neste projeto

USP - ESCOLA SUPERIOR DE
AGRICULTURA "LUIZ DE
QUEIROZ" DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - ESALQ

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PERFIL QUÍMICO E SENSORIAL DE CACHAÇAS FERMENTADAS POR DIFERENTES CEPAS DE LEVEDURAS COMERCIAIS

Pesquisador: LUISA COSTA DE CARVALHO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 21491119.0.0000.5395

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.603.243

Apresentação do Projeto:

Esse estudo visa a melhoria do processo de fermentação e consequentemente, uma cachaça de alta qualidade, para isso será estudada a presença de diferentes cepas de leveduras comerciais durante a fermentação do caldo-de-cana visando verificar a contribuição dos fermentos na formação de compostos que melhoram a qualidade sensorial e química da aguardente. Sensorialmente serão realizados teste de aceitação e RATA (Rate All That Apply), com 80 provadores. Espera-se relacionar o perfil sensorial com a composição química obtida por diferentes cepas de levedura visando verificar se alguma aguardente apresenta característica de destaque que possa estar relacionada ao tipo de fermento usado.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo desse trabalho é: 1. estudar a influência de diferentes cepas de leveduras utilizadas para fermentar o caldo de cana-de-açúcar e fabricar bebidas destiladas. 2. quantificar em cromatografia gasosa os compostos primários e secundários provenientes da fermentação. 3. avaliar a aceitação dessas cachaças mediante os testes de preferência e aceitação pelos participantes. 4. Comparar os resultados das análises cromatográficas e sensoriais visando ressaltar uma ou mais cepas. Com isso, o produtor tem capacidade de decidir qual cepa se adapta melhor ao perfil do seu produto.

USP - ESCOLA SUPERIOR DE
AGRICULTURA "LUIZ DE
QUEIROZ" DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - ESALQ

Continuação do Parecer: 3.603.243

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PIRACICABA, 26 de Setembro de 2019

Assinado por:
Sandra Helena da Cruz
(Coordenador(a))

ANEXO B. Roda Sensorial da Cachaça e Aguardente de Cana

Fonte: Bortoletto (2016).