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

**Composição química de aguardentes de cana-de-açúcar obtidas por
fermentação com diferentes cepas de levedura *Saccharomyces*
*cerevisiae***

Bruno Miguel dos Santos Monteiro

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

Piracicaba

2010

Bruno Miguel dos Santos Monteiro

Engenheiro Agrícola

Composição química de aguardentes de cana-de-açúcar obtidas por fermentação com diferentes cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Orientador:

Prof. Dr. **ANDRÉ RICARDO ALCARDE**

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

Piracicaba

2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Monteiro, Bruno Miguel dos Santos

Composição química de aguardentes de cana-de-açúcar obtidas por fermentação com diferentes cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* / Bruno Miguel dos Santos
Monteiro. - - Piracicaba, 2010.

73 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Aguardente 2. Cachaça 3. Cana-de-açúcar 4. Composição química 5. Destilação
6. Fermentação alcoólica 7. Leveduras I. Título

CDD 663.53
M774c

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

Dedico este meu trabalho e esforço às pessoas que acreditaram em mim, mesmo quando o que eu fazia e o tempo despendido tenha parecido imenso, e que tanto sofrimento e velhice foram causados pela ausência. É para ti mãe, pai, para a minha irmã Daniela, para o Ruby, e especialmente dedicada para a “Dona Aninhas!”

EPIGRAFE

“Deus quer, o Homem sonha e a obra nasce” Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

As palavras que tenho serão sempre poucas, para de alguma forma agradecer às inúmeras pessoas que de alguma forma me ajudaram não só a fazer este trabalho como a crescer como pessoa.

Um especial agradecimento á “Dona Aninhas” uma segunda mãe para mim e que por infortúnio já não se encontra entre nós. Educou-me, repassou-me muitos conhecimentos, conhecimentos esses que me acompanharam até á hora da morte muito obrigado...

Agradeço e congratulo os meus pais, Rosa Julieta Araújo dos Santos e Acácio Carneiro Monteiro, pois este trabalho é vosso, o investimento, o sofrimento causado foi enorme. Mãe e pai muitos parabéns conseguimos juntos, mais uma o que parecia inalcançável.

Daniela! Se no meio de toda esta aventura uma pessoa que foi sacrificada foste tu. Seria totalmente injusto se eu não tivesse feito uma especial alusão a ti, pois concerteza deve ter sido em ti que muitas vezes o ônus da saudade e da tristeza dos nossos pais decaiu.

Aos meus familiares que de alguma forma ajudaram os meus pais da melhor forma a superar esta minha ausência.

Á minha avó Urbana Augusta que tanto me ajuda a pensar que a frieza é importante para atingirmos os nossos objetivos.

Aos meus padrinhos Fernando e Maria José que sempre me apoiaram e sempre me deram conselhos para que eu pensasse bem e toma-se sempre o melhor caminho.

Ao Luis (Lés) por ser o amigo de longa data que sempre me fez acreditar que eu tinha capacidades para tudo e isto e para muito mais, agradecer ao Moïse, pois também ele me ajudou muito.

Ao senhor Professor Fernando Silva (Sr. Engenheiro) pelos sábios conselhos

Ao meu orientador e amigo André Ricardo Alcarde pela confiança e pelo carinho com que me ajudou durante esta peripécia que teve tantas oscilações, ajudando-me a escolher e a manter um rumo.

Ao amigo Doutor André Eduardo de Souza Belluco (Krdinho), por ter tornado este trabalho em algo de muito prazeroso, sempre com a responsabilidade e rigor que lhe são características.

Às amizades que construí no Brasil: André, Alevino, Beata, Cristiane, Dine, Lika, Werner, Zica, Zinabre.

Aos meus pais “adotivos” Luiza Helena e João Carlos pelo carinho e ajuda proporcionada.

Aos amigos criados na República Taverna, muito obrigados pela ajuda e ocupação de um lugar que de outra forma estaria a ocupado pela saudade.

A esta maravilhosa instituição ESALQ que me acolheu e que me deu a possibilidade de realização deste projeto.

Agradeço ao departamento de Agroindústria Alimentos e Nutrição setor de Açúcar e Alcool.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	16
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 História da Aguardente no Brasil	19
2.2 Matéria Prima	20
2.3 Mosto de cana	23
2.4 Leveduras	25
2.4.1 Fermentações espontâneas e fermentações inoculadas	27
2.5 Fermentação	28
2.6 Técnicas de Destilação	29
2.6.1 Destilação	30
2.6.2 Dupla destilação	31
2.6.3 Dupla destilação tipo <i>whisky</i>	31
2.7 Componentes secundários	32
2.8 Caracterização dos componentes da aguardente	34
2.8.1 Ésteres	35
2.8.2 Aldeídos	37
2.8.3 Acidez volátil	38
2.8.4 Cobre	39
2.8.5 Furfural	40

2.8.6 Alcoóis superiores.....	41
2.8.7 Metanol	42
2.8.8 Etanol.....	42
3 OBJETIVO	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Material	43
4.2 Métodos	43
4.2.1 Extração do caldo	43
4.2.2 Tratamento de purificação do caldo de cana-de-açúcar	43
4.2.3 Padronização do caldo de cana-de-açúcar.....	44
4.2.4 Fermentação do caldo de cana-de-açúcar	44
4.2.5 Destilação do Fermentado de Cana de Açúcar	44
4.2.6 Análises físico-químicas	47
4.2.6.1 Acidez volátil.....	47
4.2.6.2 Furfural	47
4.2.6.3 Graduação alcoólica	48
4.2.6.4 Aldeídos ésteres, metanol e álcoois superiores.....	48
4.3 Análise estatística	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
6 Conclusões	59
REFERÊNCIAS	61

RESUMO

Composição química de aguardentes de cana-de-açúcar obtidas por fermentação com diferentes cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae*

O objetivo deste trabalho foi estudar os componentes químicos de aguardentes de cana-de-açúcar, fermentadas por diferentes cepas comerciais da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e duplamente destiladas em alambique. Vinhos de mosto de caldo de cana-de-açúcar fermentados pelas leveduras CA-11, Y-904, BG-1, PE-2, SA-1 e CAT-1 foram destilados em alambique seguindo a metodologia utilizada para a produção de *whisky*. Os destilados, tanto da primeira como da segunda destilação, foram analisados quanto às concentrações de etanol, acidez volátil, aldeídos, ésteres, furfural, álcoois superiores e metanol. As aguardentes provenientes das fermentações com as diferentes cepas de levedura apresentaram diferentes composições químicas. As cepas CA-11 e a CAT-1 foram as que proporcionaram composição química mais adequada para aguardente duplamente destilada em alambique.

Palavras-chave: Levedura; Fermentação; Destilação; Cachaça

ABSTRACT

Chemical composition of sugar cane spirits fermented by different yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*

The objective of this was to study the chemical components from sugar cane spirits, fermented by different commercial yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* and double distilled in pot still. Sugar cane juices were fermented by the yeasts CA-11, Y-904, BG-1, PE-2, SA-1 and CAT-1 and distilled in simple still according to methodology used for *Whisky* production. Both distillates, from first and second distillation, was analyzed for concentrations of ethanol, volatile acidity, aldehydes, esters, furfural, higher alcohols and methanol. The sugar cane spirits came from the fermentations carried out by the different yeast strains presented different chemical compositions. The sugar cane spirits produced by the strains CA-11 and CAT-1 presented a more desirable chemical composition.

Keywords: Yeast; Fermentation; Distillation; Cachaça

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo da cultura da cana-de-açúcar.....	22
Figura 2 - Curvas de maturação da cana-de-açúcar. (a) em diferentes variedades (b) em função dos parâmetros tecnológicos (SILVA et al. 2003)	23
Figura 3 - Constituição esquemática de uma moenda (OLIVEIRA. 1978).....	24
Figura 4 - Etapas enzimáticas da fermentação alcoólica por leveduras (adaptada de Boulton et al. 1996)	25
Figura 5 - Esquema simplificado da fermentação alcoólica (adapatado de Campos, 2002)	28
Figura 6 - Caldo de cana na dorna de fermentação	44
Figura 7 - Esquema do alambique utilizado para as destilações dos vinhos provenientes das fermentações com as diferentes leveduras.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Limites estabelecidos pela legislação brasileira para alguns parâmetros fisco-químicos da aguardente de cana e cachaça.....	35
Tabela 2 - Composição química do destilado da primeira destilação (<i>low wines</i>) dos mostos fermentados com as diferentes leveduras.....	50
Tabela 3 - Composição química da fração “cabeça” do destilado final dos mostos fermentados com as diferentes leveduras	51
Tabela 4 - Composição química da aguardente (fração “coração”) do destilado final dos mostos fermentados com as diferentes leveduras.....	53
Tabela 5 - Composição química da fração “cauda” do destilado final dos mostos fermentados com as diferentes leveduras.	55
Tabela 6 - Composição química média do <i>low wines</i> e das frações “cabeça”, “coração” (aguardente) e “cauda” do destilado final dos mostos fermentados com as diferentes leveduras.....	56

1 INTRODUÇÃO

O mercado brasileiro de aguardentes tem passado por diversas transformações, devidas a vários fatores nomeadamente a uma elitização do consumo, obrigando a responder a uma maior demanda pela qualidade. Ao contrário do que era verificado no passado recente, a cachaça tem ganho uma mística especial podendo até dizer-se que está a ganhar um certo *glamour*, existente em bebidas como é o caso do vinho.

A aguardente de cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é a bebida obtida da destilação de fermentado de mosto de cana ou de destilado alcoólico simples de cana com um teor alcoólico compreendido entre 38 e 54% v v⁻¹ a 20°C e pode ser adicionado de açúcar até 6 gramas por litro (BRASIL, 2005). A cachaça, segundo a instrução Normativa 13, de 29/06/2005 (BRASIL, 2005), é a denominação típica atribuída a aguardente de cana de açúcar produzida no Brasil e que possui um teor alcoólico compreendido entre 38 e 48% v v⁻¹ a 20°C, obtida da destilação do mosto fermentado de cana, podendo ser adicionar de açúcares, expressos em sacarose, na quantidade de até 6 g L⁻¹.

Segundo a Associação Brasileira de Bebidas - ABRABE a produção anual brasileira de cachaça situa-se em torno de 1,5 bilhões de litros e gera cerca de 400 mil empregos diretos, além de um faturamento anual em torno de USD\$600 milhões (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS - SEBRAE, 2008,2001).

Dentro das bebidas destiladas, a cachaça ocupa o primeiro lugar no ranking como sendo a bebida destilada mais produzida, com uma fatia de 87% do total (FRANCO, 2002). Apesar deste volume notável o consumo é quase todo interno sendo assim, o Brasil ainda não explora adequadamente o valor potencial que tem este produto para exportação. Em 1996 o Brasil gerou com a exportação da cachaça o tímido valor de USD\$ 9,5 milhões, em 2005, passado uma década, o valor dessas exportações fixou-se em USD\$ 12,3 milhões. Porém, segundo Silva (2007), este aumento ocorreu principalmente devido ao aumento do preço do produto e não ao aumento das exportações.

Este “desinteresse” pelo mercado externo acontece pelo fácil escoamento do produto no mercado interno, devido a diversos fatores como o hábito amplamente

difundido pelas camadas de baixa renda, visto o produto possuir um preço relativamente baixo. Desta forma, uma melhoria na qualidade da cachaça não só atrairia os consumidores assim como os não consumidores (LIMA NETO; FRANCO, 1994) e o mesmo poderia aumentar consideravelmente as exportações por cumprimento de padrões de qualidade e segurança dos mercados internacionais. Porém o acréscimo de qualidade tarda, por diversos fatores. Apesar da tradição e da importância da cachaça produzida em alambique, que agrega naturalmente valor ao produto, a falta de padronização, as condições de falta de tecnologias adequadas têm levado à produção de aguardentes de baixa qualidade, sem padronização, não obedecendo sequer a legislação que vigora no Brasil e muito menos a legislação internacional, dificultando assim a exportação das mesmas (MIRANDA et al., 2007).

É necessário que exista um esforço para a produção de aguardentes de qualidade, e por consequência um esforço das autoridades competentes. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2005) colocou como padrões alguns dos que já eram utilizados em outros países, como o carbamato de etila, em que o Canadá foi o primeiro país a estabelecer uma legislação específica sobre o assunto, seguido posteriormente pelos Estados Unidos e pela União Européia (ANDRADE-SOBRINHO., 2002).

Esses limites existem como forma de proteção aos seus consumidores, pois essas substâncias podem provocar o aparecimento de doenças carcinogênicas, assim sendo, o enquadramento da cachaça nesses padrões de qualidade é para que se atinja níveis de segurança sanitária para o consumo. Porém uma cachaça que esteja dentro dos padrões de qualidade não será, necessariamente, uma cachaça sensorialmente superior às demais (MIRANDA et al., 2007).

Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivo fermentar caldo de cana com diferentes linhagens de leveduras e posteriormente realizar dupla destilação, segundo o método de produção de *whisky*, e analisar a sua influência na composição química da aguardente, principalmente quanto aos componentes secundários, que têm uma influência preponderante na qualidade do destilado de cana-de-açúcar. Estes, que normalmente aparecem em valores muito baixos, contribuem para o *bouquet* e sabor da bebida, sendo os indicadores de aceitação para o consumidor.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 História da Aguardente no Brasil

A história da cachaça remonta ao final do século XV e início do século XVI, com a vinda dos portugueses ao Brasil e com as primeiras plantações de cana-de-açúcar. Por essa época os nobres europeus ao terem contato com tal iguaria começaram a desejá-la e a valorizá-la, fazendo com que banqueiros e mercadores fossem buscá-la onde estivesse disponível e plantando-a onde pudessem. Com este cenário de alta valorização do açúcar na Europa, e tendo os portugueses um novo lugar para o cultivo, e de forma altamente produtiva, começa assim a história da cana-de-açúcar no Brasil (TRINDADE, 2006).

Martin Afonso de Sousa entre os anos de 1532 e 1548 introduziu a cana-de-açúcar no Brasil, e segundo reza a história, o vinho da cana foi descoberto por acaso, sendo denominado de “garapa azeda de cana” (VENTURINI, 2005).

Não existem registros de qual teria sido o primeiro engenho a produzir a aguardente, contudo é possível afirmar-se que esta foi produzida nas primeiras décadas do descobrimento do Brasil (VENTURINI, 2005). É provável que a primeira aguardente de cana-de-açúcar tenha sido produzida no engenho São Jorge dos Erasmos, em São Vicente-SP. Este engenho funcionou até o século XVIII e, desde 1958, suas ruínas estão sob a guarda da Universidade de São Paulo.

Existiam naquela época dois tipos de bebidas destiladas, uma obtida diretamente do caldo da cana e a outra obtida dos resíduos dos engenhos de açúcar, que era chamada de aguardente de mel ou cachaça. A cachaça era de tal forma apreciada que alguns engenhos deixaram a produção de açúcar para produzirem a cachaça levando assim a companhia do comércio a tomar uma posição bastante firme. Em 13 de setembro de 1649 a Carta Real proibiu a fabricação da bebida em toda colônia, porém, apesar de todos os esforços, a decisão foi infrutífera e continuou-se a produção desta bebida, mas de uma forma oculta. Este tipo de medida por parte da Coroa não só estimulou como promoveu a clandestinidade e o contrabando da bebida. As pressões aumentaram e no ano de 1661 o rei Dom Afonso VI suprimiu a proibição, porém criou impostos sobre a bebida. Os impostos advindos da bebida serviram para reconstruir a

cidade de Lisboa e subsidiavam o ensino nas universidades da Corte. A cachaça era de tal forma valorizada que servia como moeda de troca na compra de escravos e utilizada como alimento complementar para os escravos bem como para amenizar os esforços durante as longas travessias do “Atlântico” (VENTURINI, 2005; CASCUDO, 1983).

Segundo Lima (1983) a segunda grande guerra trouxe alterações ao setor. Antes da guerra os engenhos que produziam cachaça eram rudimentares e tecnicamente atrasados, sendo uma indústria essencialmente rural. A mão de obra familiar inerente ao proprietário ajudava na plantação, colheita e produção da cachaça. O pós-guerra trouxe um “boom” de crescimento a esta indústria não só pelo crescimento da população e o hábito de consumo, que levou a uma maior plantação de cana, bem como as próprias indústrias tiveram aumento em seu volume. Com este aumento de volume foi necessário aumentar os conhecimentos técnicos e científicos inerentes tanto à cultura da cana-de-açúcar como à produção da bebida. Assim sendo, os grandes alambiques ocuparam os lugares outrora ocupados pelos pequenos e numerosos alambiques e assim foram surgindo as grandes produtoras engarrafadoras de cachaça dispersas ao longo do país (LIMA, 1983).

2.2 Matéria Prima

A matéria prima para fazer a cachaça é a cana-de-açúcar (RIBEIRO, 2002; RIBEIRO, 1997), pertencente à classe das monocotiledôneas, família das Poaceae (Graminea) do gênero *Saccharum* e espécie *Saccharum* spp (ANDRADE, 2001). A cana de açúcar é uma planta do tipo C4. Este tipo de planta aproveita melhor a água, pois a perda de água pelos seus estômatos é muito menor do que a perda de uma planta do tipo C3 (LEHNINGER et al., 1995).

A cana-de-açúcar compõe-se essencialmente por duas partes: a aérea e a subterrânea. A parte subterrânea é composta por raízes e rizomas, a parte aérea é constituída por folhas e o colmo, onde estão os tecidos de reserva (TRIVELIN et al, 1994).

Para a produção de aguardente, a parte da planta que tem interesse é o colmo. Estes constituídos por duas fases: a sólida e a líquida. A fase sólida é um complexo formado por celulose, hemicelulose, lignina e pentosanas, sendo referida habitualmente

de fibra. A fase líquida é geralmente referida como sendo o caldo e é uma solução aquosa que contém uma variedade de substâncias orgânicas, sendo a sacarose a mais representativa, com quase 90% do total (NOGUEIRA; FILHO, 2005).

A cana-de-açúcar é plantada ao longo das regiões tropicais e subtropicais. Foi trazida para o Brasil pelos portugueses. A sua origem remete-se para o sudeste asiático. Os maiores produtores do mundo são: Brasil, Índia e Cuba. O Brasil possui uma área plantada de 7 milhões de hectares, sendo o maior produtor mundial com uma produção anual de 560 milhões de t/ano. O estado de São Paulo é o estado que mais contribui para essa produção com cerca de 60% do total. Minas Gerais apresenta-se como quarto maior estado produtor com 18 milhões de t/ano (ANDRADE, 2006). A produtividade ronda os 80,1 t ha⁻¹ (FNP Consultoria & Comércio, 2004).

Segundo FNP (2004) está prevista para a safra de 2013/2014 uma produção que rondará 1 bilhão de toneladas, continuando o cerne da produção na região centro-sul.

Existem diversos fatores que têm influência direta no rendimento do processo de produção da aguardente, tais como o conteúdo de sólidos solúveis, a concentração de açúcares, a variedade de cana, o planejamento agrícola, a produtividade, o controle de pragas e doenças, o estado de maturação, a colheita, o tipo de carregamento assim como transporte são fatores que têm influência direta na produtividade e na qualidade final do produto. A cana para produção de aguardente não deve ser queimada e deve processada no mesmo dia. Este é um critério a ter em conta, pois a cana quando é queimada sofre uma alteração não só na fisiologia do colmo como também existe uma perda de açúcares que pode até atingir 14,5%, devido à exsudação após a queima e a conseqüente inversão gradativa dos açúcares pelas enzimas hidrolíticas, o que favorece a contaminação microbiana pela multiplicação dos microorganismos no líquido exsudado (YOKOYA, 1995).

O planejamento da colheita tem por conceito básico que a cana tem um pico de concentração de açúcares no colmo durante o ano, em condições de maturação fisiológica completa ou bastante avançada. A maturação é um processo que começa com a síntese de açúcares nas folhas, e a sua translocação e reserva no colmo (PARAZZI, 1988).

Existem duas épocas de colheita no Brasil a “primeira”, por assim dizer, começa nas regiões do nordeste brasileiro onde a safra se inicia nos meses de Agosto/Setembro e dura até Março/Abril (Figuras 1 e 2). Já nos estados centro-sul brasileiros a safra inicia-se em maio e termina nos meses de novembro/dezembro. O período anual da produção de aguardente normalmente coincide com o período de maior maturação da cana (ANDRADE, 2001).

Figura 1 - Ciclo da cultura da cana-de-açúcar

A partir da curva de maturação de cada variedade podemos classificá-las como precoce, média ou tardia, como apresentado na (Figura 2).

Convém salientar também que a pol da cana tem uma relação direta com o teor de sólidos solúveis (brix) e inversa com os açúcares redutores. A cana de açúcar, ao contrário de outras culturas, não tem variedades específicas para a produção de aguardente. Esta conclusão deve-se ao fato de que pequenas diferenças na composição físico-químicas não têm influência na qualidade do produto final (NOVAES, 1995).

A época de colheita é ponderada tendo em conta alguns fatores, pois estes irão inferir no produto final (ANDRADE, 2006; FARIA, 2000; NOVAES, 1994):

- Quando as folhas apresentam um verde-amarelado, e que por vezes estão até totalmente secas e que até se desprendem do colmo, significa

que a cana está madura. Quando esta floresce, é um sinal evidente de que já se encontra madura demais.

- O rendimento em aguardente depende também da limpeza da cana. A presença de impurezas pode condicionar o processo fermentativo e por sua vez o rendimento em aguardente. Algumas dessas impurezas são: ponteiros de cana, restos de folhas, material vegetal de outros tipos, matérias minerais como terra e pedras.
- O estado sanitário do colmo é também importante, porque excesso de podridão vermelha pode reduzir substancialmente o teor de açúcar e introduzir outros agentes fermentativos, e por consequência afetar a fermentação.
- Os colmos devem ser moídos com um prazo não superior a 48 horas depois do corte.

Figura 2 - Curvas de maturação da cana-de-açúcar. (a) em diferentes variedades (b) em função dos parâmetros tecnológicos (SILVA et al. 2003)

2.3 Mosto de cana

O mosto de cana é o fator de maior importância no cálculo do rendimento de aguardente por tonelada de cana e está diretamente relacionado com a quantidade de unidades esmagadoras (NOGUEIRA; FILHO, 2005).

A eficiência da moenda é medida de duas formas. Uma é a sua capacidade, que é a quantidade de cana moída por unidade de tempo e a outra, é a extração, que é a porcentagem de açúcar efetivamente extraído da cana (NOGUEIRA; FILHO, 2005).

Uma moenda é constituída por três cilindros (Figura 3). Esses três cilindros encontram-se na posição de um triângulo escaleno e os seus centros encontram-se interligados. Cada um desses cilindros é ranhurado. Como acessórios principais têm os raspadores e a bagaceira cujo objetivo é manter as ranhuras do cilindro limpas e conduzir a cana parcialmente esmagada para um segundo terno de moenda (NOGUEIRA; FILHO, 2005).

Figura 3 - Constituição esquemática de uma moenda (OLIVEIRA, 1978)

A extração propriamente dita consiste em passar a cana numa primeira unidade de moenda para outra através de esteiras intermediárias que irão encaminhar o bagaço resultante para outra unidade de moenda a fim de ser submetida a novas compressões (NOGUEIRA; FILHO, 2005).

Em pequenas fábricas de aguardente é usual encontrar uma só moenda que recebe a cana diretamente. Já em indústrias de maior caudal produtivo é usual encontrar-se várias moendas e não utilizar cana diretamente e sim desfibrada, com

embebição do bagaço de cana entre as moendas para obter uma melhor extração (FARIA, 2000).

2.4 Leveduras

Louis Pasteur demonstrou o processo bioquímico da conversão do mosto da uva em vinho pela ação fermentativa de leveduras que transformavam os açúcares das uvas em etanol, CO_2 e outros metabólitos (Figura 4). Na realidade, o processo fermentativo é altamente sofisticado e complexo. A fermentação do mosto das uvas e a produção de vinhos de altíssima qualidade é um processo bioquímico e ecológico complexo, que envolve um desenvolvimento sequencial de espécies afetadas por ambiente específico. O processo inclui a interação de fungos, leveduras, bactéria do ácido láctico, assim como microvirus e bacteriófagos que afetam os organismos associados à uva (FLEET, 1993; FLEET, 1998).

Figura 4 - Etapas enzimáticas da fermentação alcoólica por leveduras (adaptada de Boulton et al. 1996)

As leveduras são definidas como fungos ascomicetos unicelulares ou basidiomicetos, cujo crescimento vegetativo é predominantemente por gemiparidade ou gemulação (KURTZMAN, 1998).

Nas fermentações de bebidas alcoólicas, tais como vinho, cerveja, *whisky*, *cognac* e rum, as influências das espécies ou linhagens de leveduras são preponderantes na formação dos compostos aromáticos (álcoois superiores, ésteres, aldeídos, ácidos graxos, entre outros) (NYKÄNEN; NYKÄNEN, 1977; SOLES et al., 1982; CABRERA et al., 1998 GIUDICI et al., 1990; MATEO et al., 1991; LONGO et al., 1992; LURTON et al., 1995).

As leveduras são encontradas nas vinhas, assim como nos canaviais, e também nos locais de processamento da matéria prima. Algumas são autóctones essenciais e outras são alóctones membros transientes das comunidades encontradas nos dois ambientes. As leveduras ocupam os diversos *habitats* que reúnem as condições mínimas para a sua subsistência, enquanto que, as leveduras específicas aparecem em *habitats* únicos, característicos (WALKER, 1998).

As condições de fermentação influenciam preponderantemente o sabor das bebidas (SUOMALAINEN, 1971; SUOMALAINEN; LEHTONEN, 1979).

Suomalainen e Nykänen (1966) observaram que os mesmos compostos químicos aparecem nas diversas bebidas alcoólicas, mesmo provenientes de diferentes matérias primas, concluindo que as leveduras têm um papel importantíssimo na formação do sabor das bebidas alcoólicas. Os compostos formados durante a fermentação são influenciados pelas condições de fermentação, tais como temperatura, aeração, volume de inóculo, contaminantes e nutrientes no meio de fermentação (LEHTONEN; JOUNELA-ERIKSON 1983).

Suomalainen e Nykänen (1966) estudaram a capacidade de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* produzirem diversos compostos, sendo a sacarose a única fonte de carbono e sem adição de nitrogênio ao mosto. Verificaram que, apesar de aparecerem em concentrações diferentes, os compostos químicos eram semelhantes no destilado desta fermentação e nos dos *whiskys* escoceses. Assim sendo, os autores concluíram que as leveduras eram responsáveis pela maior parte da produção destes compostos.

As espécies, assim como as linhagens de diferentes leveduras, têm diferentes capacidades de sintetizar álcoois superiores (KORHOLA et al., 1989). Guidici et al. (1990) avaliaram a capacidade de produção de álcoois superiores em 100 linhagens de *S. cerevisiae* e constataram que as diferenças entre cada linhagem foram estatisticamente significativa. A *Saccharomyces pombe* produziu relativamente poucos álcoois superiores (PARFAIT; JOURET, 1975).

2.4.1 Fermentações espontâneas e fermentações inoculadas

Inicialmente as fermentações eram realizadas pela microflora natural, sendo fermentações espontâneas, ou seja, nenhuma inoculação deliberada era feita. Várias leveduras eram encontradas, entre as quais *Kloeckera*, *Hanseniaspora* e *Cândida*, que predominavam nas fases iniciais, seguidas de algumas espécies de *Metschnikowia* e *Pichia* em fase média da fermentação, estando a graduação alcoólica entre 3% e 4% (FLEET 1993; MORTIMER et al. 1994). Na fase final apareciam cepas de leveduras *S. cerevisiae* e outras, como *Brettanomyces*.

Em 1890 Hansen, da Cervejaria Carlsberg na Dinamarca, isolou uma célula de levedura e a cultivou para inocular posteriormente em outra fermentação. Desde então o conceito de aplicar uma cepa à fermentação espalhou-se pelos diversos ramos de bebidas fermentadas. Nas fermentações inoculadas o que acontece é que uma cultura *starter* é adicionada ao meio e essa cultura domina as outras espécies naturalmente presentes no mosto. Para este domínio acontecer são recomendadas a aplicação de 1 a 3 milhões de unidades formadoras de colônias (ufc.ml⁻¹) da cultura (PRETORIUS; VAN DER WESTHUIZEN, 1991; FUGELSANG, 1997).

A prática de fermentações espontâneas subsiste porque existe uma crença que dá características peculiares à bebida fermentada, como a dependência das leveduras indígenas e estas das condições ambientais que raramente são constantes, assim como das características do mosto e da forma de processamento. Estes fatores fazem com que seja muito complicado prever o resultado de uma fermentação, pois o controle ou a reprodução do processo é muito difícil. Já fermentações inoculadas com leveduras secas ativas permitem um melhor controle do processo fermentativo. Além disso, tem-

se ainda que as fermentações espontâneas normalmente demoram mais tempo do que as fermentações conduzidas por culturas *starter* (FUGELSANG, 1997).

2.5 Fermentação

A fermentação é, de forma simplificada, o processo de transformação do açúcar em álcool (Figura 5). Na fermentação as leveduras descarboxilam o ácido pirúvico a CO_2 + acetaldeído pela piruvato descarboxilase. Em seguida uma reação, que é catalisada pela álcool-desidrogenase, reduz o acetaldeído a etanol, enquanto o NADH é oxidado a NAD^+ (CAMPOS, 2002).

Figura 5 - Esquema simplificado da fermentação alcoólica (adaptado de Campos, 2002)

A fermentação é um processo bioquímico, que ocorre no citoplasma da levedura alcoólica, que desdobra o açúcar (sacarose) em etanol. Este processo bioquímico é

realizado por cerca de uma dezena de enzimas. No final da fermentação obtêm-se álcool etílico, anidrido carbônico, e outros produtos secundários.

A produção de etanol por esta via, a fermentativa, é acompanhada pela produção de outros compostos como glicerol ácido succínico e álcoois superiores, que, como referido anteriormente, são de elevado interesse no aroma final da bebida (RANKINE, 1967). A formação dos álcoois superiores durante a fermentação é devido à descarboxilação de cetoácidos intermediários da biossíntese de aminoácidos, seguida da redução de aldeídos pela desidrogenase alcoólica, conforme explicado por Webb e Ingraham (1963).

Na fermentação de mosto de caldo de cana é adicionado o inóculo de leveduras ao caldo presente na dorna, e posteriormente é completada a dorna com caldo de cana que é corrigido para 16º Brix (CANTÃO, 2006).

Normalmente essa fermentação conclui-se, em média, em 24 horas. No fim deste processo as leveduras depositam-se no fundo da dorna e é então retirado o sobrenadante. O processo repete-se adicionando-se novo mosto de caldo de cana sobre o “pé-de-cuba” (creme de levedura depositado no fundo da dorna) e controlando a temperatura por volta dos 30°C (SOUZA, 2009).

Existem no Brasil muitos produtores artesanais que conduzem as suas fermentações utilizando leveduras naturais. Estes são muitas vezes preparados de cana ou de outras matérias como, por exemplo, caldo de laranja azeda, farelo de arroz, fubá entre outros. Nestes processos artesanais, a conclusão da fermentação é verificada pelo término da produção de gás carbônico (SOUZA, 2009).

Quando se pretende obter cachaças de qualidade, são normalmente utilizadas leveduras secas selecionadas. Prepara-se o “pé-de-cuba” ativando as leveduras secas em água aquecida adicionada de açúcar para que as leveduras tenham nutrientes para poderem se multiplicar. Em seguida o “pé-de-cuba” é adicionado às dornas para fermentar o caldo de cana (OUGH et al. 1975).

2.6 Técnicas de Destilação

2.6.1 Destilação

A destilação separa, seleciona e concentra compostos que se encontram imiscuídos nas bebidas fermentadas. O processo de destilação utiliza os diversos pontos de ebulição de cada composto assim como a sua afinidade com álcool e com água e o teor alcoólico no vapor durante a destilação (LÉAUTÉ, 1990).

O comportamento da destilação é também altamente influenciado pela presença e concentração de impurezas (compostos secundários) e estes possuem comportamentos diferenciados devido às suas ligações ao etanol (NOVAES, 1994).

As destilações podem ser conduzidas conforme os aparelhos em duas formas distintas: simples e sistemática (YOKOYA, 1995). Existem vários equipamentos para a realização da destilação. Os mais utilizados são os alambiques e a coluna contínua (BOZA, 1996). Os alambiques operam de forma descontínua e as colunas de forma contínua. As destilações em alambiques estão relacionadas a produtores pequenos, enquanto que a destilação contínua está associada a destilarias de médio a grande porte.

O desempenho da destilação, e por consequência da qualidade do produto final, está diretamente relacionada a alguns fatores como o desenho do destilador, a eficiência na separação das diversas frações e também as vazões do vinho da cana e do vapor, grau alcoólico e pressão de trabalho (YOKOYA, 1995).

O cobre é o material utilizado para a construção dos alambiques por diversas razões: maleabilidade, boa condução térmica, resistência à corrosão e capacidade aromática (BOZA; HORII, 2000; LÉAUTÉ, 1990). A referência de capacidade aromática ao cobre se deve ao fato de que, na sua ausência, o produto final apresenta um aroma sulfurado (FARIA, 1982).

Normalmente os alambiques são aquecidos por fogo direto ou por vapor, já os destiladores de processos contínuos são aquecidos por vapor na parte inferior, com alimentação de vinho pela parte superior da coluna, saída do destilado também pela parte superior e saída do resíduo (vinhaça) pela base da coluna (FARIA, 2000).

2.6.2 Dupla destilação

É um processo onde são realizadas duas destilações, uma posterior a outra. O caldo de cana fermentado é destilado uma primeira vez e, em seguida, o destilado desta primeira destilação é novamente destilado, no mesmo equipamento ou em outro (ROTA; FARIA, 2009). Rota (2008) cita que a principal razão para a dupla destilação é obter um produto mais leve para posterior envelhecimento.

A dupla destilação para aguardente de cana foi sugerida pela primeira vez por Novaes (1994), baseada na prática já utilizada para outras bebidas, tais como *cognac*, *whisky* e até mesmo o rum. No processo de dupla destilação para cachaça, a primeira destilação é conduzida até haver uma recuperação de praticamente todo o etanol, obtendo um destilado com teor alcoólico de 25 a 27% de álcool em volume. Posteriormente, este destilado é submetido a uma segunda destilação, na qual se procede uma separação de frações: a fração da “cabeça”, que corresponde a 1 a 2% do volume útil da caldeira, retirados do destilado inicial da segunda destilação; a fração “coração”, com teor alcoólico de aproximadamente 60%; e a fração “cauda”, destilado final da segunda destilação..

A fração do “coração”, que é a fração mais importante para o produto, devido à dupla destilação, apresenta um teor alcoólico superior ao de uma aguardente monodestilada. Dessa forma, para ser consumida como aguardente, esta fração deve ser diluída, ou então segue diretamente para o envelhecimento, com diluição posterior (NOVAES, 1994).

A dupla destilação permite a obtenção de bebidas com menor acidez, bem como teores reduzidos de contaminantes orgânicos e inorgânicos, tais como cobre e carbamato de etila (ROTA; FARIA, 2009).

2.6.3 Dupla destilação tipo *whisky*

Aguardentes de caldo de cana dupla destiladas segundo o procedimento utilizado para a produção de *whisky* apresentaram aparência, sabor e atitude de compra superiores às aguardentes monodestiladas ou duplamente destiladas segundo a metodologia do *cognac*.

Na destilação para produção de *whisky*, a primeira destilação tem como principal função a recuperação de etanol do vinho, sem qualquer tipo de “corte” de frações, chamando-se ao líquido recolhido de “*low wines*”. Após três primeiras destilações obtém-se um volume suficiente de “*low wines*” para a segunda destilação. Durante esta segunda destilação, procedem-se os “cortes” que são: “cabeça”, “coração” e a “cauda”: a fração “cabeça” corresponde a 2% do volume útil da caldeira (recuperados de 78 a 75% de etanol), a fração “coração” ou *whisky* corresponde ao destilado recolhido de 75 a 60% de etanol e a fração “cauda” corresponde ao volume final do destilado, recolhido de 60% a 0% de etanol. As frações “cabeça” e “cauda” são reaproveitadas na primeira destilação do próximo ciclo de dupla destilação (PIGGOTT, 2003).

2.7 Componentes secundários

Além de água e etanol, a aguardente possuiu também componentes químicos secundários, que são compostos orgânicos voláteis que dão à bebida características sensoriais. Estes componentes propiciam uma personalidade própria à bebida, e esta personalidade é que vai determinar a aceitação por parte do mercado (YOKOYA, 1995).

Os componentes secundários também chamados “fração não álcool” são os compostos formados durante a fermentação alcoólica, exceto o álcool etílico e o gás carbônico. Os componentes secundários são sempre encontrados em baixas concentrações (YOKOYA, 1995).

A quantidade e natureza desses componentes dependem da matéria-prima, da fermentação, da destilação e do envelhecimento. Os componentes secundários formados durante a fermentação alcoólica pertencem majoritariamente às classes funcionais dos ácidos, ésteres, aldeídos e álcoois, e minoritariamente às cetonas, compostos fenólicos, aminas e mercaptanas (MAIA, 1994).

Entre todos os produtos secundários provenientes da fermentação alcoólica o ácido acético tem sido quantitativamente o componente principal das aguardentes. A acidez elevada em cachaça é relacionada com contaminação da cana-de-açúcar ou do mosto por bactérias acéticas, e as bactérias utilizam uma parte do substrato aumentando assim, a acidez e reduzindo a produção de etanol (CARDOSO, 2001). A aeração é outro fator que pode aumentar consideravelmente a conversão do açúcar em

ácido acético mesmo que não exista contaminação do mosto por essas bactérias (MAIA, 1994).

O etanol formado pelas leveduras reage de forma natural com o ácido acético dentro das células das leveduras originando o acetato de etila (MAIA, 1994; YOKOYA, 1995; CARDOSO, 2001). Da mesma forma outros compostos reagem formando outros compostos, outros álcoois reagem com ácido acético, originando vários ésteres. As reações de esterificação não são exclusivas da fermentação. Reações de esterificação, numa velocidade muito inferior, ocorrem também durante o envelhecimento da cachaça. Os ésteres formados favorecem o aroma da bebida e cada éster tem um aroma peculiar. O acetato de etila tem um aroma frutado, mas em quantidade excessivas confere um aroma enjoativo e indesejável. Os aldeídos com oito carbonos têm aromas penetrantes e enjoativos, não apreciados nas bebidas destiladas. Os aldeídos com cadeias de dez carbonos apresentam um aroma agradável. Vários aldeídos podem ser originários de aminoácidos previamente existentes no caldo de cana. Também podem ser originados pelas leveduras em estágios preliminares da fermentação, principalmente o acetaldeído que tem tendência a desaparecer no final da fermentação pela oxidação a ácido acético (MAIA, 1994; CARDOSO, 2001). O aldeído mais produzido durante a fermentação é o acetaldeído (MAIA, 1994).

O furfural e hidroximetilfurfural não são formados durante a fermentação e sim durante a destilação, pela pirogênese de matéria-orgânica. Esses aldeídos podem também existir no próprio caldo da cana-de-açúcar quando a colheita é antecedida de queima da folhagem, ocorrendo assim, uma desidratação parcial de uma pequena fração de açúcares (pentoses e hexoses) livres no caldo ou presentes no bagaço (MAIA, 1994).

Álcoois superiores, com três a cinco átomos de carbono na cadeia, apresentam odores característicos (*bouquet*) muito associados a bebidas destiladas. Quando os álcoois possuem cadeia maior, tornam-se oleosos e alguns possuem um aroma fortemente floral. Os álcoois de 4 e 5 carbonos na cadeia são chamados também de óleo fusel e a formação deles é atribuída à degradação do açúcar que ocorre intracelularmente nas leveduras e em parte pela degradação dos aminoácidos (MAIA,

1994) e quando presente na cachaça em grandes quantidade desvaloriza a bebida (YOKOYA, 1995).

A quantidade de álcoois superiores depende da cepa de levedura utilizada, bem como dos microorganismos contaminantes. A formação desses álcoois é aumentada quando a fermentação é mais lenta devida à fraca atividade das leveduras (MAIA, 1994).

O álcool metílico é um componente indesejável em qualquer bebida. Forma-se a partir da pectina, um polissacarídeo existente na própria cana-de-açúcar, porém em pequenas quantidades (MAIA, 1994). A dose fatal de metanol varia conforme o organismo, situando-se entre 10 e 100 mL para humanos. Uma dose de 15 mL é suficiente para causar cegueira. (CARDOSO, 2001).

2.8 Caracterização dos componentes da aguardente

A cachaça e a aguardente estão submetidas as mesmas leis, que são da responsabilidade do MAPA. O decreto nº 6871, de 4 de junho de 2009, regulamenta a lei nº 8918, de 4 de junho de 1994, que aborda a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.

Os padrões e os respectivos limites podem ser verificados na Tabela 1. Estes padrões e limites legais têm por finalidade moderar a influência desses componentes na proteção da saúde pública. No entanto, uma cachaça ou aguardente que tenha os seus valores dentro dos legais pode não ser uma bebida de qualidade sensorial superior.

A Instrução Normativa nº 13 de 30 de junho de 2005, alterou o limite máximo de álcoois superiores, que era $300 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$, para $360 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ de álcool anidro (BRASIL, 2005), permitindo assim a adequação de algumas cachaças e aguardentes que sob a legislação anterior estariam fora dos padrões legais do MAPA.

Tabela 1- Limites estabelecidos pela legislação brasileira para alguns parâmetros fisco-químicos da aguardente de cana e cachaça

Componentes	Unidade	Limite	
		Mínimo	Máximo
Cobre	mg L ⁻¹	...	5
Carbamato de etila	µg L ⁻¹	...	150
Acidez volátil	mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro	...	150
Ésteres, em acetato de etila	mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro	...	200
Aldeídos, em aldeído acético	mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro	...	30
Álcoois superiores (álcool propílico, isobutílico e isoamílicos)	mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro	...	360
Furfural	mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro	...	5
Metanol	mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro	...	20
Acroleína	mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro	...	5
Sacarose (açúcar refinado, cristal, invertido ou glicose)*	g L ⁻¹	...	6
Partículas em Suspensão (resíduos sólidos)		Ausentes	Ausentes
Extrato seco	g L ⁻¹	...	6
Graduação alcoólica de aguardente	% álcool etílico a 20°C	38	54
Graduação alcoólica de cachaça	% álcool etílico a 20°C	38	48

Fonte : ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA

*que podem ser adicionados pós destilação. Se este limite for ultrapassado terá de ser designado de adoçado não podendo ultrapassar os 30 g.L⁻¹

Notas: sinal convencional utilizado:...Dado numérico não disponível

Além destes compostos, foram ainda regulamentados: álcool sec- butílico (10 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro) , álcool n-butílico (3 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro), chumbo (200 µg L⁻¹), arsênico (100 µg L⁻¹).

2.8.1 Ésteres

Normalmente e dentro dos parâmetros legais, os ésteres são compostos de elevada importância na cachaça, porque são compostos voláteis (CHANG, 1994). Ao lado dos alcoóis superiores, os ésteres e compostos carbonílicos são importantes para o aroma e para o sabor dos destilados, apesar de, em massa, representarem menos de um por cento de todos os componentes voláteis da bebida (LEHTONEN, 1983).

Os ésteres são compostos originados da reação dos alcoóis com ácidos carboxílicos, ocorrendo remoção do grupo -OH e substituição do -H por um grupo carboxílico (CHANG, 1994).

Os ésteres são compostos aromáticos e quanto menor o peso molecular do álcool envolvido na reação mais intensa é a sua presença sensorial. Cada éster tem um aroma e um sabor específico (CHANG, 1994).

Os ésteres que tem a sua origem nos ácidos carboxílicos de cadeia curta e dos alcoóis alifáticos possuem uma importância elevada no odor das bebidas destiladas.

O éster que se encontra em maior concentração em bebidas destiladas é o acetato de etila, seguido pelos ésteres etílicos, isobutílicos e 3-metilbutílicos, provenientes de ácidos graxos de baixo peso molecular. Também estão presentes ésteres provenientes de ácidos graxos de elevado peso molecular, tais como o ácido caprílico, o cáprico e, no caso do *whisky* escocês, o ácido palmítico (BELITZ;GROSCH; SCHIEBRLE, 2004).

Os ésteres encontrados nos vinhos são, juntamente com a água, o etanol e os álcoois superiores, compostos representativos, apresentando valores acima de 100 mg L^{-1} tornando-os assim qualitativamente e quantitativamente compostos importantes para o sabor e aroma de bebidas destiladas. Devido a presença do etanol, os ésteres etílicos derivados dos ácidos graxos são os ésteres de maior concentração, seguidos pelos acetatos. Os ésteres etílicos juntamente com os acetatos são os responsáveis pelos aromas frutados aos quais frequentemente os provadores de bebidas fazem referência. Sabe-se que o acetato de etila só contribui aromaticamente quando encontrado em concentrações acima de 75 mg L^{-1} , não obstante quando se encontra acima de 200 mg L^{-1} apresenta um efeito antagônico, ou seja, desagradável (ETIÉVANT,1991).

A maior fração de ésteres encontrados na aguardente é produzida durante a fermentação, apesar de que durante o processo de envelhecimento também ocorre aumento da concentração de ésteres na bebida, mas é um processo muito mais lento, levando meses a anos (MAIA, 1994). Este processo de formação de ésteres durante o envelhecimento é mais demorado porque ocorre via reação química direta entre os alcoóis e os ácidos, apesar de ser numa escala bem menor que a enzimática (NYKÄNEN; NYKÄNEN; 1991).

A principal origem desses ésteres, como referido anteriormente, ocorre durante a fermentação alcoólica no metabolismo secundário intracelular das leveduras, isto é, depende da abundância relativa dos alcoóis e acil-CoAs correspondentes produzidos pela levedura. A acetil-CoA e o etanol são o ácido e o álcool mais abundante durante a fermentação, e por consequência o acetato de etila é o éster encontrado em maior quantidade (PIGGOTT; PATTERSON; 1989). Estes ésteres são formados por duas reações enzimáticas: a ativação de ácidos monocarboxílicos e a descarboxilação oxidativa dos ácidos 2-oxo. Existe ainda um mecanismo muito provável de formação de ésteres a partir dos compostos intermediários da síntese dos ácidos carboxílicos de cadeia longa. A primeira fase da síntese dos ésteres consiste na formação de malonil-CoA. No complexo multienzimático o malonil-CoA se une ao acil-CoA, formado no ciclo anterior, e transfere dois carbonos ao ácido graxo. A fase seguinte da reação depende do meio, A presença de água no complexo multienzimático, depois da enzima desligada, faz com que se forme um ácido carboxílico. Então, quando o rompimento se dá na presença do álcool, forma-se um éster (NYKÄNEN; NYKÄNEN, 1991).

2.8.2 Aldeídos

Os aldeídos podem ser formados no início do processo fermentativo pelas leveduras, principalmente do acetaldeído, que ao final da fermentação tem tendência de ser oxidado a ácido acético. Por serem compostos de elevada volatilidade, se concentram na fração da “cabeça” do destilado (PIGGOTT; CONNER, 2003).

A concentração de aldeídos na bebida com o envelhecimento em tonéis de madeira. Ao final do período de 390 dias de envelhecimento, a concentração de aldeídos em aguardente de cana aumentou 125% (MIRANDA ET al., 2008). Uma das reações ocorridas durante o envelhecimento é a oxidação e formação do acetal. A oxidação do etanol contribui para a formação do acetaldeído e, posteriormente, a formação do ácido acético (REAZIN, 1981). A oxidação do dimetilsulfóxido resulta em dimetilsulfeto (PIGGOTT; CONNER, 2003). Durante o processo de envelhecimento ocorrem equilíbrios que são muito favoráveis à bebida. No caso dos aldeídos verifica-se que ocorre um equilíbrio entre o acetal e o acetaldeído. Este equilíbrio é favorável porque muitas vezes os aldeídos possuem um aroma desagradável, enquanto que os

acetais têm aromas agradáveis, sendo o equilíbrio entre eles uma forma de dar identidade específica à bebida, pois o acetaldeído tem características aromáticas de frescor (PIGGOTT;CONNER, 2003). Os aldeídos com oito carbonos na cadeia têm aromas fortes, penetrantes e geralmente enjoativos, portanto a sua presença torna-se indesejável. Ainda, o excesso de aldeídos no produto final pode provocar náuseas, vômitos, cefaléia, decréscimo da pressão cardíaca e taquicardia (LABIANCA, 1974).

Existem alguns fatores que podem influenciar a presença e quantidade destes compostos na bebida, tais como o pH, o tipo da madeira e as cepas de leveduras (PIGGOTT;CONNER, 2003).

2.8.3 Acidez volátil

A acidez volátil é um parâmetro de qualidade que, quando em níveis elevados, é prejudicial à qualidade do produto, sendo considerado o principal defeito sensorial de bebidas destiladas (RIBÉREAU-GAYON et al. 2006).

As bactérias acéticas estão presentes na natureza e desenvolvem-se particularmente bem em ambientes ricos em açúcar e álcool. Portanto, em bebidas alcoólicas estas bactérias podem acidificar o produto (RIBÉREAU-GAYON et al. 2006).

Existem vários pontos críticos durante o processo de produção de aguardente, assim como de outros produtos como o vinho, por exemplo, onde, se não houver controle, as contaminações por bactérias acéticas ocorrem facilmente. Este tipo de contaminação ocorre principalmente durante o processo fermentativo, quando os controles de tempo e da temperatura, assim como o tipo de levedura utilizada e a higiene na produção tem um papel fundamental para a não proliferação das bactérias (CARDOSO, 2001).

O aumento da acidez volátil ocorre quando as condições de fermentação não são adequadas (RIBÉREAU-GAYON et al. 2006; BOZA; HORII; 1998). As bactérias estão presentes de forma natural no meio ambiente. Os açúcares da cana encontra-se no interior das células parenquimatosas do colmo, protegido do meio externo. Mas quando essa proteção é corrompida pelo processo de extração, os açúcares são postos em contato com o ar e, com a proliferação das bactérias, há a produção de

ácido acético, com conseqüente acidificação do meio (CARDOSO, 2001; RIBÉREAU-GAYON et al. 2006).

As bactérias acéticas são bastonetes Gram-negativos, cujas células podem estar em cadeia ou isoladas. Têm cílios ao redor da célula, que facilitam sua locomoção. Estas bactérias não esporulam e têm um metabolismo estritamente aeróbico. As oxidações dos açúcares, do etanol e de outros substratos é acompanhada pela oxidação da cadeia transportadora de elétrons. O oxigênio é o último receptor de elétrons e de prótons, vindos das reações de oxidação (TEIXEIRA et al, 1987).

2.8.4 Cobre

O cobre, assim como vários íons metálicos, são necessários ao corpo humano, pois possuem um papel de catalisador de algumas reações fisiológicas. A hemoglobina é rica em ferro, mas necessita do estímulo do íon cobre, que o sangue normalmente contém, para fixar o oxigênio (LEBRE, 2005 apud BARCELOUX, 1999).

Em 1928 foi reconhecida a importância do cobre no organismo de ratos. Este micronutriente juntamente com o ferro possui uma função importantíssima na prevenção da anemia (HART et al.,1928).

A importância do cobre nos animais e humanos está intimamente relacionada com a sua atividade funcional, estrutural e biológica. A sua importância deve-se às funções metabólicas de enzimas atuando como co-fator cupro-dependentes ou seja, as cuproenzimas, como por exemplo o citocromo C oxidase, superóxido dismutase citosólica, lisil oxidase, ceruloplasmina e dopamina β -hidroxilase. Estas catalisam reações fisiológicas oxidativas importantes como a fosforilação oxidativa, inativação de radicais livres, biossíntese de colágeno, entre muitas outras (DANKS, 1988). O cobre encontra-se majoritariamente no corpo humano nos seguintes órgãos: cérebro, fígado, baço e tecido esquelético. O baço e o fígado são dois órgãos de reserva deste micronutriente (MASON, 1979).

Quando o cobre se encontra em excesso no organismo verifica-se em casos extremos uma acumulação nos eritrócitos, desencadeando lesões oxidativas e hemólise intravascular. Sendo o fígado um órgão onde este micronutriente se acumula,

quando ocorre a necrose hepática excessivas quantidades de cobre são lançadas para o sangue (NELSON, 2002; LEBRE, 2005 apud BARCELOUX, 1999).

O cobre entra na cachaça por falta de higiene no alambique. Isto é, o alambique, que normalmente é de cobre, entra em contato com o ar úmido, o qual oxida o cobre e forma-se então uma camada esverdeada de nome “azinhavre”, composta por $[\text{CuCO}_3\text{Cu}(\text{OH})_2]$. Esta camada é dissolvida e arrastada para cachaça, durante a destilação pelos vapores alcoólicos ácidos (BOZA; HORII; 2000). Estes problemas seriam facilmente resolvidos com uma limpeza apropriada do alambique. Para tal bastaria destilar previamente a água ou então utilizar água com limão ou água com vinagre e os vapores produzidos iriam retirar e arrastar esse azinhavre das paredes do alambique. Existem ainda outras formas mais dispendiosas como utilização de resinas e carvão ativado (LIMA et al. 2006).

Há necessidade de superfícies de cobre na destilação do vinho, pois o cobre catalisa reações químicas durante a destilação, as quais eliminam alguns odores desagradáveis (sulfetos) da bebida (NASCIMENTO et.al, 1998; BOZA; HORII; 2000).

2.8.5 Furfural

O furfural e o 5-hidroximetil-furfural (HMF) são aldeídos. O furfural é um aldeído que deve ser controlado em bebidas devido à sua atividade carcinogênica. Seu valor estabelecido de IDLH (“Immediately Dangerous to Life or Health Air Concentration”) é de 100,00 ppm. Estes compostos são formados pelas reações não enzimáticas dos alimentos (LO COCO et al 1995 apud AZEVÊDO et al 2007). O furfural forma-se a partir da desidratação das pentoses do bagaço de cana e das hexoses do caldo de cana (MAIA E CAMPELO, 2005).

Na fabricação de tonéis, o processo de queima do interior da barrica reduz a celulose da madeira a HMF (GRANADOS et al. 1995).

O aumento da concentração do furfural está relacionado a mudanças aromáticas na bebida. Já o HMF afeta também a coloração do destilado. Estas mudanças ocorrem principalmente naqueles alimentos que sofrem reação de *Maillard* ou caramelização. Em baixas concentrações este aldeído compõem o aroma de alguns vinhos, *brandies* e *cognacs*. A presença do furfural na cachaça é um indicador de falta de qualidade,

devendo ser minimizada, pois na parte sensorial denota-se um aroma enjoativo. O corante caramelo utilizado para corrigir a cor do destilado final, apesar de ser de uso permitido, implica em aumento dos compostos furânicos na bebida (MAIA E CAMPELO, 2005). A relação F/HMF pode indicar a origem do HMF porque este composto pode ter a sua origem na termólise da celulose como pode ter a sua origem na adição do caramelo (GRANADOS et al. 1995).

2.8.6 Alcoóis superiores

Os álcoois superiores aparecem de forma natural durante o processo fermentativo de produção de bebidas, sendo compostos importantíssimos na definição do sabor e do aroma de bebidas destiladas (RANKINE, 1967; SUOMALAINEN, 1971).

A formação destes compostos segundo Webb e Ingraham (1963) ocorre por descarboxilação de cetoácidos intermediários da biossíntese de aminoácidos, seguida de redução de aldeídos pela desidrogenase alcoólica.

Diversos fatores influenciam a formação de álcoois superiores pelas leveduras, tais como a espécie e a linhagem da levedura (RANKINE, 1967; FAHRASMANN ET AL., 1985), a temperatura da fermentação (HOUGH; STEVENS, 1961) e a composição do meio (AYRAPAA, 1967 e 1971).

Os álcoois superiores ou óleo fúsel mais presentes nas bebidas destiladas são compostos que possuem na sua constituição entre 3 a 5 átomos de carbono. Estes álcoois possuem um aroma característico de flores ajudando assim no *bouquet* da bebida e, juntamente com os ésteres, são responsáveis pelo *flavour* da cachaça. Os principais álcoois secundários encontrados na cachaça são: álcool iso-amílico, iso-butílico e n-propílico (PIGGOTT et al. 1989). A sua presença numa bebida é favorável até certo limite, a partir do qual pode produzir um aroma desagradável, enjoativo e, portanto, indesejado (WINDLOH, 1976).

Os álcoois superiores possuem um ponto de ebulição superior ao etanol. O álcool iso-amílico, por exemplo, possui um ponto de ebulição de 132° C, mas, por ser muito solúvel no etanol a quente, o seu comportamento ao longo da destilação é bastante semelhante ao do etanol, destilando-se conjuntamente. Como são álcoois, têm

afinidade ao álcool etílico e, sob certas condições formam misturas azeotrópicas entre si.

Souza (2009) observou que a concentração dos álcoois superiores foi maior nas frações do destilado mais concentradas em etanol, isto é, acumulou-se prioritariamente nas frações “cabeça” e “coração” da aguardente.

2.8.7 Metanol

O metanol é um composto que se forma pela degradação da pectina, que é um polissacarídeo que se encontra na cana de açúcar. A molécula de pectina forma-se pela união de várias moléculas de ácido galacturônico, que possuem moléculas de metanol. Durante o processo fermentativo libertam-se estas moléculas de metanol (MAIA et al., 1994).

A sua presença em bebidas é altamente controlada porque o metanol ingerido, mesmo que em quantidades pequenas, pode provocar cegueira ao atacar os nervos ópticos e possivelmente a retina, e em casos graves pode causar a morte (WINDLOHZ, 1976). Este fato ocorre porque o metanol no organismo é oxidado a ácido fórmico e a CO_2 , causando uma acidose grave, ou seja, uma diminuição do pH sanguíneo, e podendo provocar coma ou até morte (MAIA et al., 1994).

O metanol possui um ponto de ebulição de $64,7^\circ$, inferior ao do etanol, e por isso se encontra com maior volume na fração “cabeça” do destilado (SOUZA, 2009).

2.8.8 Etanol

O etanol é segundo maior constituinte da cachaça, contribuindo para o corpo da bebida. Tem um aroma leve e o seu sabor é doce e abranda o ácido (AMERINE et al., 1972).

3 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi estudar os componentes químicos de aguardentes de cana-de-açúcar, cujo caldo foi fermentado por diferentes cepas comerciais da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (CA-11, Y-904, BG-1, PE-2, SA-1 e CAT-1) e o vinho duplamente destilado em alambique seguindo a metodologia utilizada para a destilação de *whisky*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

A cana-de-açúcar utilizada para o projeto foi a variedade SP 83-2847 no quinto ciclo de produção, cultivada em área do setor de Açúcar e Alcool do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, no Campus de Piracicaba – SP (ESALQ / USP).

4.2 Métodos

4.2.1 Extração do caldo

O caldo de açúcar foi extraído num terno de moenda com dimensões de “9X9” e posteriormente foi filtrado em algodão para remoção de resíduos da moagem (bagacilho).

4.2.2 Tratamento de purificação do caldo de cana-de-açúcar

O caldo de cana foi submetido a um tratamento de purificação, que consistiu no aquecimento do caldo até ebulição e remoção, por filtração em algodão, dos resíduos formados (borra), que se agregam devido à alta temperatura.

4.2.3 Padronização do caldo de cana-de-açúcar

Após a purificação o caldo de cana foi diluído com água destilada para a concentração de 18° Brix, determinado em refratômetro PR – 101 / ATAGO.

4.2.4 Fermentação do caldo de cana-de-açúcar

O caldo clarificado e padronizado foi fermentado, individualmente, por diferentes cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, Y-904 (AB Brasil, Pederneiras-SP, Brasil), CA-11, BG-1, PE-2, SA-1 e CAT-1 (LNF – Latino Americana, Bento Gonçalves-RS, Brasil). As fermentações foram realizadas em dornas de aço inoxidável de 15 L de capacidade útil. A temperatura das fermentações foi controlada entre 28 e 30°C através de sistema interno (camisa) de resfriamento e/ou aquecimento acoplado a um banho termostatzado (Figura 6) As fermentações, em sistema de batelada, foram inoculadas com 3 g L⁻¹ do fermento seco, previamente hidratado com água a 40°C para reativação.

4.2.5 Destilação do Fermentado de Cana de Açúcar

Após a fermentação e decantação do fermento, as destilações dos fermentados de caldo de cana foram realizadas em alambique simples (Figura 7) com caldeira,

Figura 6 - Caldo de cana na dorna de fermentação

capitel e alonga de cobre e condensador de aço inoxidável. O alambique é equipado com termômetro e com sistema de aquecimento a gás, o que proporciona um processo de destilação mais padronizado do ponto de vista de velocidade de aquecimento e de temperatura e pressão dos vapores formados. A caldeira do alambique possui capacidade útil de 37 L de vinho.

Vista em corte

Figura 7 - Esquema do alambique utilizado para as destilações dos vinhos provenientes das fermentações com as diferentes leveduras

A destilação foi conduzida num processo semelhante ao utilizado para destilação de *scotch malt whisky*.

Na primeira destilação, a do vinho, procedeu-se a extração de praticamente todo o álcool do vinho, isto é, até que o destilado na saída do condensador apresentasse 5% de etanol, medido em alcoômetro. A primeira destilação produziu um destilado que chamamos de *low wines*. Foram necessárias três bateladas de primeiras destilações para a produção de um volume suficiente de *low wines* para a segunda destilação.

Na segunda destilação, a do *low wines*, o destilado foi dividido em três frações: “cabeça”, destilado recolhido inicialmente, correspondendo a 2% do volume de *low wines*; “coração” ou aguardente, destilado recolhido após a fração cabeça e até a graduação alcoólica de 60% de etanol na saída do condensador; e “cauda”, que correspondeu ao destilado recolhido após a fração aguardente e até a graduação alcoólica de 5% de etanol na saída do condensador.

4.2.6 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas no *low wines* e em cada fração do destilado da segunda destilação (“cabeça”, “coração” e “cauda”). As análises físico-químicas de acidez volátil, furfural, graduação alcoólica, aldeídos, ésteres, metanol e álcoois superiores foram realizadas segundo os procedimentos oficiais estabelecidos pela legislação em vigor no Brasil (BRASIL, 2005).

4.2.6.1 Acidez volátil

A acidez volátil foi determinada no Redutec MA – 086/087 / Marconi, por titulação de neutralização, utilizando para a titulação hidróxido de sódio 0,05N, após separação dos compostos voláteis da amostra, por arraste de vapores.

4.2.6.2 Furfural

A concentração de furfural foi determinada por método colorimétrico, em espectrofotômetro 700 S / Femto, mediante correlação de curvas padrões e concentração do composto.

4.2.6.3 Graduação alcoólica

A determinação da graduação alcoólica foi realizada em densímetro digital DMA 4500 / Anton Paar, após a destilação da amostra por arraste de vapor.

4.2.6.4 Aldeídos ésteres, metanol e álcoois superiores

Foi utilizado para a detecção e quantificação dos aldeídos (aldeído acético), ésteres (acetato de etila), metanol e álcoois superiores (isobutílico + isoamílicos + n-propílico), um cromatógrafo CG-037, equipado com uma coluna empacotada PAAC 3334-CG e um detector de ionização de chama (FID). Como gás de arraste utilizou-se H_2 , com uma vazão de 30 ml.min^{-1} . A temperatura do injetor foi programada para 170°C . A temperatura da coluna, isotérmica, foi programada para 94°C e a temperatura do detector foi programada para 225°C .

4.3 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada mediante aplicação do Teste F e do Teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, utilizando o programa estatístico SAS (1996), dentro de um delineamento experimental inteiramente casualizado (PIMENTEL-GOMES; GARCIA, 2002), com 3 repetições.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se influência da cepa de levedura na composição química dos destilados, tanto do *low wines* da primeira destilação (Tabela 2) quanto das frações “cabeça” (Tabela 3), “coração” ou aguardente (Tabela 4) e “cauda” (Tabela 5) do destilado da segunda destilação.

O teor alcoólico médio dos destilados finais das primeiras destilações (*low wines*) foi de 32% (v v⁻¹) (Tabela 2). Comparando-se as leveduras, o *low wines* proveniente da primeira destilação do mosto fermentado pela levedura CA-11 apresentou a maior concentração de aldeídos e as menores concentrações de ésteres, álcool iso-butílico, coeficiente de congêneres e metanol. O *low wines* proveniente da primeira destilação do mosto fermentado pela levedura Y-904 apresentou as mais elevadas concentrações de álcool iso-amílico e metanol. O *low wines* proveniente da primeira destilação do mosto fermentado pela levedura BG-1 apresentou a maior acidez volátil e as menores concentrações de aldeídos, ésteres, álcool n-propílico, álcool iso-amílico e álcoois superiores. O *low wines* proveniente da primeira destilação do mosto fermentado pela levedura PE-2 apresentou as mais elevadas concentrações de álcool n-propílico e álcool iso-butílico e baixa concentração relativa de ésteres. O *low wines* proveniente da primeira destilação do mosto fermentado pela levedura SA-1 apresentou as maiores concentrações de ésteres, álcoois superiores e coeficiente de congêneres e a menor acidez volátil. O *low wines* proveniente da primeira destilação do mosto fermentado pela levedura CAT-1 apresentou elevada concentração relativa de aldeídos e baixa concentração relativa de ésteres. As cepas de levedura Y-904, PE-2 e SA-1 originaram os *low wines* com as maiores concentrações de álcoois superiores e de coeficiente de congêneres.

Tabela 2 - Composição química do destilado da primeira destilação (*low wines*) dos mostos fermentados com as diferentes leveduras

	CA-11	Y-904	BG-1	PE-2	SA-1	CAT-1
Teor alcoólico (%v v ⁻¹ 20°C)	31,26 ^a	33,13 ^a	30,75 ^a	32,51 ^a	32,27 ^a	32,71 ^a
Acidez volátil*	183,98 ^b	147,61 ^c	241,94 ^a	157,89 ^c	124,16 ^d	197,01 ^b
Aldeídos*	22,01 ^a	17,56 ^b	9,49 ^c	18,51 ^b	18,22 ^b	21,46 ^a
Ésteres*	15,65 ^c	23,74 ^b	15,65 ^c	15,71 ^c	28,72 ^a	15,79 ^c
Furfural*	0,11 ^{bc}	0,19 ^a	0,15 ^{ab}	0,17 ^a	0,09 ^c	0,13 ^b
Álcool n-propílico*	19,89 ^c	21,54 ^c	18,29 ^c	39,07 ^a	30,63 ^b	33,07 ^b
Álcool iso-butílico*	27,81 ^e	132,79 ^{bc}	48,98 ^d	168,87 ^a	146,59 ^b	123,09 ^c
Álcool iso-amílico*	112,22 ^c	308,88 ^a	64,72 ^d	207,54 ^b	323,85 ^a	211,28 ^b
Álcoois Superiores*	159,91 ^d	463,22 ^a	131,99 ^d	415,48 ^b	501,07 ^a	367,44 ^c
Coeficiente de congêneres*	381,66 ^b	652,32 ^a	399,22 ^b	607,76 ^a	672,26 ^a	601,83 ^a
Metanol*	13,64 ^b	20,95 ^a	15,89 ^b	19,99 ^a	18,31 ^a	14,64 ^b

* mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro.

Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística significativa.

O teor alcoólico médio da fração “cabeça” da segunda destilação foi de 77% (v v⁻¹) (Tabela 3). Comparando-se as leveduras, a fração “cabeça” do destilado final proveniente do mosto fermentado pela levedura CA-11 apresentou a maior concentração de aldeídos e as menores concentrações de álcool n-propílico e álcool iso-butílico. A fração “cabeça” do destilado final proveniente do mosto fermentado pela levedura Y-904 apresentou as mais elevadas concentrações de álcool iso-amílico, álcoois superiores, coeficiente de congêneres e metanol e a menor acidez volátil. A fração “cabeça” do destilado final proveniente do mosto fermentado pela levedura BG-1 apresentou a maior acidez volátil e as menores concentrações de álcool iso-amílico, álcoois superiores e coeficiente de congêneres. A fração “cabeça” do destilado final proveniente do mosto fermentado pela levedura PE-2 apresentou as mais elevadas concentrações de álcool n-propílico e álcool iso-butílico e as menores concentrações de aldeídos e ésteres. A fração “cabeça” do destilado final proveniente do mosto fermentado pela levedura SA-1 apresentou a maior concentração de ésteres. A fração “cabeça” do destilado final proveniente do mosto fermentado pela levedura CAT-1

apresentou elevada concentração relativa de acidez volátil e baixa concentração relativa de metanol.

Tabela 3 - Composição química da fração “cabeça” do destilado final dos mostos fermentados com as diferentes leveduras

	CA-11	Y-904	BG-1	PE-2	SA-1	CAT-1
Teor alcoólico (%v v ⁻¹ 20°C)	76,91 ^a	77,92 ^a	75,51 ^a	77,53 ^a	76,98 ^a	77,09 ^a
Acidez volátil*	14,20 ^a	4,45 ^b	17,01 ^a	6,23 ^b	5,45 ^b	12,13 ^a
Aldeídos*	99,87 ^a	53,08 ^c	67,75 ^b	47,98 ^c	51,37 ^c	73,01 ^b
Ésteres*	54,34 ^c	64,86 ^b	51,33 ^c	49,18 ^c	83,29 ^a	59,02 ^b
Furfural*	0,03 ^a	0,02 ^a	0,04 ^a	0,04 ^a	0,01 ^a	0,03 ^a
Álcool n-propílico*	15,72 ^d	35,18 ^c	32,46 ^c	60,63 ^a	42,73 ^b	42,29 ^b
Álcool iso-butílico*	46,41 ^e	191,00 ^b	72,41 ^d	250,46 ^a	200,59 ^b	148,78 ^c
Álcool iso-amílico*	161,66 ^c	422,65 ^a	125,14 ^c	280,53 ^b	373,95 ^a	223,21 ^b
Álcoois Superiores*	223,79 ^c	648,82 ^a	198,17 ^c	591,63 ^a	617,27 ^a	414,28 ^b
Coefficiente de congêneres*	392,23 ^d	771,23 ^a	334,3 ^d	695,06 ^b	757,39 ^a	558,47 ^c
Metanol*	12,69 ^b	19,35 ^a	13,91 ^b	17,77 ^{ab}	16,76 ^{ab}	13,53 ^b

* mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro.

Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística significativa.

O teor alcoólico médio da fração “coração” da segunda destilação foi de 66% (v v⁻¹) (Tabela 4). Comparando-se as leveduras, a aguardente proveniente do mosto fermentado pela levedura CA-11 apresentou as menores concentrações de ésteres (não diferindo estatisticamente da levedura PE-2), álcool n-propílico (não diferindo estatisticamente da levedura BG-1) álcool iso-butílico e metanol (não diferindo estatisticamente da levedura CAT-1), e baixa concentração relativa de álcoois superiores e de congêneres. A aguardente proveniente do mosto fermentado pela levedura Y-904 apresentou as mais elevadas concentrações de álcool iso-butílico (não diferindo estatisticamente da levedura PE-2), álcool iso-amílico, álcoois superiores, coeficiente de congêneres (não diferindo estatisticamente da levedura SA-1) e metanol e a menor acidez volátil. A aguardente proveniente do mosto fermentado pela levedura BG-1 apresentou a maior acidez volátil e as menores concentrações de álcool iso-amílico, álcoois superiores (não diferindo estatisticamente da levedura CA-11) e

coeficiente de congêneres (não diferindo estatisticamente da levedura CA-11), e baixa concentração relativa de álcool n-propílico, A aguardente proveniente do mosto fermentado pela levedura PE-2 apresentou a mais elevada concentração de álcool n-propílico e elevada concentração relativa de álcool iso-butílico. A aguardente proveniente do mosto fermentado pela levedura SA-1 apresentou a maior concentração de ésteres e relativamente elevado coeficiente de congêneres.. A aguardente proveniente do mosto fermentado pela levedura CAT-1 apresentou baixa concentração relativa de metanol. A concentração de aldeídos das aguardentes foi semelhante, indicando que as diferentes cepas de levedura não influenciaram a concentração deste componente na bebida. No entanto, nota-se que o processo de dupla destilação contribuiu para a padronização da concentração de aldeídos entre as aguardentes, já que os *low wines* obtidos da primeira destilação dos mostos fermentados com as diferentes leveduras apresentaram diferença significativa na concentração de aldeídos. Quanto ao furfural, apesar de existirem diferenças estatísticas entre as aguardentes fermentadas pelas diferentes leveduras, as concentrações (média de 0,19 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro) estão bem abaixo do limite máximo estabelecido pela legislação (5,0 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro).

Tabela 4 – Composição química da aguardente (fração “coração”) do destilado final dos mostos fermentados com as diferentes leveduras

	CA-11	Y-904	BG-1	PE-2	SA-1	CAT-1
Teor alcoólico (% v v ⁻¹ 20°C)	65,81 ^a	67,15 ^a	64,89 ^a	66,67 ^a	66,12 ^a	66,17 ^a
Acidez volátil*	23,67 ^b	11,62 ^c	47,14 ^a	19,98 ^b	14,83 ^{bc}	22,81 ^b
Aldeídos*	18,52 ^a	14,32 ^a	16,10 ^a	15,31 ^a	15,78 ^a	16,89 ^a
Ésteres*	9,40 ^c	12,47 ^{bc}	15,49 ^b	10,71 ^c	23,72 ^a	15,74 ^b
Furfural*	0,20 ^a	0,16 ^b	0,18 ^b	0,21 ^{ab}	0,11 ^c	0,25 ^a
Álcool n-propílico*	14,94 ^c	25,65 ^b	18,33 ^c	38,54 ^a	31,15 ^{ab}	30,31 ^{ab}
Álcool iso-butílico*	35,47 ^e	174,59 ^a	52,45 ^d	170,24 ^a	148,66 ^b	118,26 ^c
Álcool iso-amílico*	145,31 ^d	415,78 ^a	75,95 ^e	222,38 ^c	362,50 ^b	210,41 ^c
Álcoois Superiores*	195,72 ^e	616,02 ^a	146,74 ^e	431,16 ^c	542,31 ^b	358,98 ^d
Coefficiente de congêneres*	247,51 ^c	654,59 ^a	225,65 ^c	477,37 ^b	596,75 ^a	414,67 ^b
Metanol*	6,66 ^c	12,34 ^a	7,14 ^{bc}	9,18 ^b	8,74 ^b	6,85 ^c

* mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro.

Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística significativa.

Em função da dupla destilação, onde a segunda destilação partiu de um *low wines* com aproximadamente 32% (v.v⁻¹) de etanol, a concentração alcoólica das aguardentes atingiu valores acima do estabelecido pela legislação. As aguardentes apresentaram concentração alcoólica média de 66% (v.v⁻¹) e o limite máximo estabelecido pela legislação é de 54% (v.v⁻¹). Entretanto, é procedimento usual em destilarias comerciais a diluição da aguardente com água potável até a concentração alcoólica desejada.

As aguardentes provenientes das fermentações com as leveduras Y-904, PE-2 e SA-1 apresentaram concentração de álcoois superiores e coeficiente de congêneres acima do limite máximo estabelecido pela legislação (360 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro). As aguardentes provenientes das fermentações com as leveduras CA-11, BG-1 e CAT-1 apresentaram composição química dentro dos limites estabelecidos pela legislação. Vale ressaltar que, dentre as cepas de levedura estudadas, a aguardente produzida pela fermentação com a cepa BG-1 apresentou a maior acidez volátil, que é o parâmetro associado ao principal defeito sensorial em bebidas destiladas.

Investigando o desempenho fermentativo das cepas PE-2, CAT-1, VR-1 e BG-1 da levedura *Saccharomyces cerevisiae* inoculadas em mostos para a produção de *whisky*, observou-se que a cepa CAT-1 obteve performance fermentativa semelhante à de uma levedura tradicionalmente utilizada na Escócia para a fermentação dos mostos de cereais, a *M Type*. Ainda, o destilado obtido pela destilação do mosto fermentado pela levedura CAT-1 apresentou perfis de aroma e sabor semelhantes aos do destilado obtido pela destilação do mosto fermentado pela levedura *M Type* (AMORIM NETO et al 2009).

O teor alcoólico médio da fração “cauda” da segunda destilação foi de 28% (v v⁻¹) (Tabela 5). Comparando-se as leveduras, a fração “cauda” do destilado final proveniente do mosto fermentado pela levedura CA-11 apresentou a maior concentração de álcool n-propílico. A fração “cauda” do destilado final proveniente do mosto fermentado pela levedura BG-1 apresentou a maior acidez volátil e o maior coeficiente de congêneres, porém apresentou as menores concentrações de álcool iso-butílico, álcool iso-amílico e álcoois superiores. A fração “cauda” do destilado final proveniente do mosto fermentado pela levedura PE-2 apresentou a mais elevada concentração de álcool iso-butílico. A fração “cauda” do destilado final proveniente do mosto fermentado pela levedura SA-1 apresentou a maior concentração de álcool iso-amílico e álcoois superiores, no entanto, apresentou a mais baixa acidez e o menor coeficiente de congêneres.

Tabela 5 - Composição química da fração “cauda” do destilado final dos mostos fermentados com as diferentes leveduras

	CA-11	Y-904	BG-1	PE-2	SA-1	CAT-1
Teor alcoólico (% v v ⁻¹ 20°C)	28,20 ^a	28,25 ^a	26,14 ^a	27,80 ^a	28,54 ^a	28,98 ^a
Acidez volátil*	124,51 ^c	130,45 ^c	183,07 ^a	137,75 ^c	100,56 ^d	162,62 ^b
Aldeídos*	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ésteres*	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Furfural*	0,36 ^c	0,88 ^a	0,61 ^b	0,71 ^b	0,30 ^c	0,45 ^c
Álcool n-propílico*	14,03 ^a	0,29 ^b	2,31 ^b	3,36 ^b	2,08 ^b	1,03 ^b
Álcool iso-butílico*	9,23 ^b	11,12 ^b	8,55 ^b	18,17 ^a	16,50 ^a	8,29 ^b
Álcool iso-amílico*	34,64 ^b	37,85 ^b	20,26 ^c	33,48 ^b	48,08 ^a	24,38 ^c
Álcoois Superiores*	57,90 ^a	49,26 ^{ab}	31,13 ^b	57,01 ^a	66,66 ^a	33,71 ^b
Coeficiente de congêneres*	182,77 ^a	180,59 ^a	214,81 ^a	195,47 ^a	167,52 ^a	196,78 ^a
Metanol*	1,62 ^a	3,54 ^a	2,02 ^a	3,33 ^a	2,81 ^a	1,37 ^a

* mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro.

nd = não detectado

Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística significativa.

Os aldeídos, os ésteres e o metanol apresentaram comportamento característico de componentes de “cabeça”, pois volatilizaram-se majoritariamente nas primeiras frações do destilado da segunda destilação. Os álcoois superiores (n-propanol, iso-butanol e iso-amílico) volatilizaram-se principalmente nas frações “cabeça” e “coração” do destilado da segunda destilação. A acidez volátil e o furfural apresentaram comportamento típico de componentes de “cauda”, pois volatilizaram-se principalmente nas frações finais do destilado da segunda destilação (Tabela 6).

Tabela 6 - Composição química média do *low wines* e das frações “cabeça”, “coração” (aguardente) e “cauda” do destilado final dos mostos fermentados com as diferentes leveduras

	<i>Low wines</i>	Fração “cabeça”	Fração “coração” (Aguardente)	Fração “cauda”
Teor alcoólico (% v v ⁻¹ 20°C)	32,11 ^c	76,99 ^a	66,14 ^b	27,99 ^c
Acidez volátil*	175,43 ^a	9,91 ^c	23,34 ^b	139,83 ^a
Aldeídos*	17,88 ^b	65,51 ^a	16,15 ^b	nd
Ésteres*	19,21 ^b	60,34 ^a	14,59 ^b	nd
Furfural*	0,14 ^b	0,03 ^c	0,19 ^b	0,55 ^a
Álcool n-propílico*	27,08 ^a	38,17 ^a	26,49 ^a	3,85 ^b
Álcool iso-butílico*	108,02 ^a	151,61 ^a	116,61 ^a	11,98 ^b
Álcool iso-amílico*	204,75 ^a	264,52 ^a	238,72 ^a	33,12 ^b
Álcoois Superiores*	339,85 ^a	448,99 ^a	381,82 ^a	49,28 ^b
Coeficiente de congêneres*	552,51 ^a	584,78 ^a	436,09 ^a	189,66 ^b
Metanol*	17,24 ^a	15,67 ^a	8,49 ^b	2,45 ^c

* mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro.

nd = não detectado

Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística significativa.

Estes resultados estão de acordo com os citados por Leauté (1990) sobre a cinética de volatilização de componentes secundários durante o processo de destilação para produção de *cognac*. O autor cita o acetaldeído, o metanol e o acetato de etila como componentes que, por terem ponto de ebulição relativamente baixo e serem solúveis em etanol, volatilizam-se prioritariamente no início do processo de destilação, sendo suas concentrações relativamente maiores nas primeiras frações que saem do condensador, isto é, na fração “cabeça” do destilado. Os álcoois superiores propanol, iso-butanol e iso-amílico são classificados pelo autor como componentes que, por serem solúveis em álcool e completa ou parcialmente solúveis em água, se concentram nas frações “cabeça” e “coração” do destilado. O ácido acético e o furfural, por terem ponto de ebulição maior que o da água e serem muito solúveis nela, volatilizam-se preferencialmente ao final do processo de destilação, acumulando-se na fração “cauda” do destilado (LÉAUTÉ, 1990).

Comparativamente aos *low wines*, a dupla destilação proporcionou diminuição da acidez volátil e da concentração de metanol do destilado final. Bizelli et al (2000) também observou que a dupla destilação influenciou positivamente as características físico-químicas da aguardente de cana-de-açúcar, pois reduziu a acidez volátil e as concentrações de cobre e metanol da bebida. Os autores citaram que os componentes que conferem acidez ao destilado apresentam baixa volatilidade em vinhos com alto teor alcoólico, volatilizando-se apenas nas frações finais da destilação, isto é, na fração “cauda”. Boza e Horii (1998) também verificaram que a dupla destilação reduziu o teor de acidez da cachaça, sendo favorável à melhoria do *flavor* do produto e à aceitação pelo consumidor.

Segundo Franco (2008) a dupla destilação permite uma concentração maior de etanol no destilado, eliminando parte da água e de algumas substâncias consideradas contaminantes, como aldeídos, metanol, ácido acético, cobre e carbamato de etila, melhorando a qualidade sensorial da bebida.

6 CONCLUSÕES

As aguardentes provenientes das fermentações com as diferentes cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram diferentes composições químicas. As cepas CA-11 e CAT-1 foram as que proporcionaram composição química mais adequada para aguardente duplamente destilada em alambique.

REFERÊNCIAS

AMERINE, M.A.; BERG, H.W.; CRUESS, W.V. Brandy production. In:_____.**The technology of wine making**. 3rd ed. Wesport: The Avi publishing, 1972. p.600-644.

AMORIM NETO, B.; YOHANNAN, H.; BRINGHURST, B.K.; BROSAN, T.A.; PEARSON, J.M.; WALKER, S.Y.; WALKER, J.W. **Journal of the Institute of Brewing**, Berlim, v.115, p. 207, 2009.

ANDRADE, L.A.B. Cultura da cana-de-açúcar. In:_____.**Análises físico-químicas e avaliação da presença do cobre em aguardentes de cana por aluminossilicatos**. Lavras: UFL, 2006. 1v.

_____. Cultura da cana-de-açúcar. In: Cardoso, M. Das G. **Produção de aguardente**. Lavras: Ed. UFLA, 2001. Cap. 1, p. 19-50.

ANDRADE-SOBRINHO, L.G.; BOSCOLO, M.; LIMA-NETO, B.S.; FRANCO, D.W.. Carbamato de etila em bebidas alcóolicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa). **Química Nova**, São Paulo, v.25, n.6b, p. 1074-1077, nov./dez. 2002.

AYRAPAA, T. Biosynthetic formation of higher alcohols by yeast: dependence on the nitrogenous nutrient level of medium. **Journal of the institute of Brewing**, London, v.77, p.266-276, 1971.

_____. Formation of higher alcohols from ¹⁴C-labelled valine and leucine **Journal of the institute of Brewing**, London, v.73, p.17-30, 1967.

AZEVEDO, L.C.; REIS, M.M.; SILVA, L.A.; ANDRADE, J.B. Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade dos vinhos. **Química Nova**, São Paulo, v.30, n.8, p.1968-1975, 2007.

BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.; SCHIEBRLE, P. **Food chemistry**. Berlin: Springer, 2004. chap. 20, p. 892-938.

BIZELLI, L. C.; RIBEIRO, C. A.; F.; NOVAES, F. V. Dupla destilação da aguardente de cana: teores de acidez total e de cobre. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.57, n.4, p.623-627 dez 2000.

BOSCOLO, M. **Caramelo e carbamato de etila em aguardente de cana: ocorrência e quantificação**. 2001. 100 p. Tese (Doutorado em Ciências em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

BOULTON B., SINGLETON V. L., BISSON L.F., KUNKEE R.E. (Ed.) Yeast and biochemistry of ethanol fermentation. In : _____. **Principles and practices of winemaking**. New York: Chapman Hall, 1996. p. 139-172.

BOZA, Y.E.A.G. **Influência da condução da destilação sobre a composição e a qualidade sensorial da aguardente de cana**. 1996. 143 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 1996.

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

_____. Influência do grau alcoólico e da acidez do destilado sobre o teor de cobre na aguardente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas. V.20, n.3, p.279-284, 2000.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Instrução normativa nº 13 de 29 de Junho de 2005. **Diário Oficial**. Brasília, 30 de junho de 2005.

_____. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº13, 29 de jun de 2005. **Diário Oficial**, Brasília, 30 de jun de 2005. Seção 1, p. 3-4.

_____. Ministério da Saúde. Legislação em vigilância sanitária decreto nº4851, de 2 de Outubro de 2003. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial**, Brasília, 2 de Outubro de 2003.

CABRERA, M.J.; MORENO, J.; ORTEGA, J.M.; MEDINA, M. Formation of ethanol, higher alcohols, esters, and terpenes by Five yeast strains in musts from Pedro Ximénez

grapes in various degrees of ripeness. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.39, n.4, p.283-287, 1998.

CAMPOS, L.S. **Entender a bioquímica**. 3 ed. Lisboa: Escolar Editora, 2002.

CANTÃO, F.O. **Análises físico-químicas e avaliação da presença do cobre em aguardentes de cana por aluminossilicatos**. 2006. 1v. 62p. Dissertação (M.S. em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

CARDOSO, M.G. Análises físico-químicas de aguardente. In:_____. **Produção de aguardente de cana de açúcar**. Lavras: UFLA, 2001.

CASCUDO, L.C. **História da alimentação no Brasil**. Belo Horizonte: Itatiaia/EDUSP, 1983. 1v.

CHANG, R. **Química** 5. ed. Lisboa: McGraw-Hill 1994.

DANKS, D.M. Copper deficiency in Humans. *Annual Nutrition Reviews*, Palo Alto, v.8, p.235-237, 1988.

ETIÉVANT, P. X. Wine. In: MAARSE, H. (Ed.). **Volatile compounds in foods and beverages**. New york: Marcel Dekker, 1991. chap. 14, p. 483-546.

FAHRASMANE, C. JOURET, C.; PARFAIT, A.; GALSY,D. Production of higher alcohols and short-chain fatty acids by different yeast used in rum fermentations. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, n.5, p.1427-1430, Sept./Oct.1985.

FARIA, J.B. **A redução dos teores de contaminante das aguardentes de cana (*saccharum officinarum* L.) brasileiras**. 1982. 52p. Tese de (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

_____. **Determinação dos compostos responsáveis pelo defeito sensorial das aguardentes de cana (*Saccharum spp*) destiladas na ausência de cobre**. 2000. 99p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2000.

FLEET, G. H.; The microbiology of alcoholic beverages. In: WOOD, B.J.B. (Ed.) **Microbiology and of fermented foods**. Glasgow: Blackie Academic and Professional, 1998. v.1, p.217-215.

_____ - The microorganisms of the winemaking- isolation, identification. In: FLEET, G. H. (Ed.) **Wine microbiology and biotechnology**. Reading: Harwood Academic, 1993. p. 1-25.

FLEET, G.H. HEARD, G.M. Yeast-growth during fermentation. In: FLEET, G.H. (Ed.) **Wine microbiology and biotechnology**. Reading: Harwood Academic, 1993. p. 27-54.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. A potência do álcool nos próximos dez anos. In: _____. **Agrianual 2004**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2004. p. 213-215.

FRANCO, A.C. **Redestilação da cachaça**. 2008. 52 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2008.

FRANCO, C. **De gole em gole, a cachaça ganha mercado**. O estado de São Paulo, 24 fevereiro.2002, Economia, p.b-12.

FUGELSAN, K.C. **Wine microbiology**. New York: Chapman and Hall, 1997.

GIUDICI, P.; ROMANO, P.; ZAMONELLI, C. A biometric study of higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 36, n.1, p. 61-64, 1990.

HART, E.B.; STENBOCK, H.; WADELL, J.; ELVEHJEM, C.A. Iron in nutrition. VII. Copper as a supplement to iron for hemoglobin building in rat. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.77, p.797-812, 1928.

HOUGH, J.S.; STEVENS, R. Beer flavour. IV. Factors affecting the production of fusel oil. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v.67, p.488-494, 1961.

KORHOLA, M.; HARJU, K.; LEHTONEN, M. Fermentation. In: PIGGOTT, J.R.; SHARP, R.; DUNCAN, R. E. B. (Ed.). **The science and technology of whiskies**. London: Longman Scientific Technical, 1989. chap. 4, p. 89-117.

KURTZMAN C. P., FELL J.W. Definition , classification and nomenclature of the yeast. In: _____. **The yeast: a taxonomic study**. 4th ed. Amesterdam: Elsevier Science, 1998. p. 3-5.

LABIANCA, D.A. Acetaldehyde Syndrome and Alcoholism. **Analyst**, London v.47, p.21, 1974.

LÉAUTÉ, R. Distillation in alembic. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis v.41, n.1, p.90-103, 1990.

LEBRE, R.; RUIZ, V.; LEITÃO, S.; SANTOS, R.; PORTO, A. Intoxicação aguda por sulfato de cobre: caso clínico.**Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna**, Coimbra, v.12, n. 41, p.220-224,out./dez. 2005.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.;COX, M.M. Biossíntese de carboidrato. In SIMÕES,A.A.; LODI, WRN. **Principios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. cap.19, p.444-476.

LEHTONEN, M.;JOUNELA-ERICKSSON, P. Volatile and non-volatile compounds in the flavour of alcoholic beverages. In: PIGGOTT, J.R. (Ed) **Flavour of distilled beverages: origin and development**. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1983. cap.4, p.64-78.

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

LIMA NETO,B.S.; FRANCO,D.W. Aguardente e o controle quimico da sua qualidade.**Engarrafador moderno**, São Paulo, v.4, n.33, p.5-8, 1994.

LIMA, U. de A. Aguardentes. In: AQUARONE, E.; LIMA, U. de A.; BORZANI, W **Alimentos e bebidas obtidos por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher, 1983. p.79-103. (Biotecnologia, 5).

LONGO, E.; VELÁZQUEZ, J.B.; SIEIRO, C.; CANSADO, J.; CALO, P.; VILLA, T.G. Production of higher alcohols, ethyl acetate, acetaldehyde and other compounds by 14 *Saccharomyces cerevisiae* wine strains isolated from the same region (Salnés, N.W. Spain). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.8, n. 5, p. 539-541, Sept 1992.

LURTON, L.; SNAKKERS, G.; ROULLAND, C.; GALY, B. Influence of the fermentations yeast strain on the composition of wine spirits. **Journal of the Science and Food and Agriculture**, London, v. 67, p.485-491, 1995.

MAIA, A.B.R. Componentes secundários da aguardente. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.12, n.6, p29-34, 1994

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

MASON, K.E. A conspectus of research on copper metabolism and requirements of man. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.109, n.11, p. 1979-2066, 1979.

MATEO, J.J., JIMENEZ, M.; HUERTA, T.; PASTOR, A. Contribution of different yeast isolated from musts of monastrell grapes to the aroma of wine. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 14, n. 2, p. 153-160, June. 1991.

MIRANDA, M.B; MARTINS, N.G.S.; BELLUCO, A.E.S.; HORII, J.; ALCARDE, A.R. Perfil físico-químico de aguardente durante o envelhecimento em tonéis de carvalho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, 2008.

_____. Qualidade química de cachaças e de aguardentes brasileiras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.4, p.897-901, 2007.

MORTIMER, R. K.; ROMANO P.; SUZZI G.; POLSINELLI M. 1994; Genome renewal: a new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. **The Yeast**, New York v.10, p. 1543-1552, 1994.

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

NELSON, L.S. **Toxicologic emergencies**. 7 ed th. New York: Mc Graw-Hill 2002: p. 1262-1271.

NOGUEIRA, A. M. P., FILHO, W. G. V. **Aguardente de cana**. Botucatu: Faculdade de Ciências Agronômicas, 2005.

NOVAES, F. V. **Carbamato de etila em aguardente de cana.- Tópicos**. Piracicaba: ESALQ/Departamento de Ciência e Tecnologia e Agroindustria de Alimentos.1996. 7p.

_____. **Noções básicas sobre a teoria da destilação**. Piracicaba: ESALQ/Departamento de Ciência e Tecnologia e Agroindustria de Alimentos, 1994. 22p.

_____. **Produção e qualidade da aguardente de cana**. Piracicaba: ESALQ/Departamento de Ciência e Tecnologia e Agroindustria de Alimentos 1995. 27p.

NYKÄNEN, L; NYKÄNEN, I. Distilled beverages. In :MAARSE, H. (Ed.). **Volatile Compounds in foods and beverages**. New York: Marcel Dekker, 1991. chap. 15, p. 547-580.

_____. Production of esters by different strains in sugar fermentations. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 83, p. 30-31, Jan./Feb. 1977.

OLIVEIRA, E.R. (Coord.). **Tecnologia dos produtos agropecários I: tecnologia do açúcar e das fermentações industriais**. Piracicaba: 1978. 209p.

OUGH C.S.; BRUM M.A.; DAUDT C.E. Controle das altas temperaturas de fermentação na fabricação de vinhos brancos. **Revista Centro Ciências Rurais**, Santa Maria, v. 5, n.2 p.71-78 1975.

PARAZZI, C. **Influência do desponte do colmo na qualidade tecnológica da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 1988. 131 p. Dissertação (mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.

PARFAIT, A.; JOURET, C. Formation of higher alcohols in rum. **Annales de Technologie Agricole**, Paris, v.24, p.421-436, 1975.

PIGGOTT, J.R.; CONNER, J. M. whiskies. In: LEA, A. G. H.; PIGGOTT, J.R.; (Ed.). **Fermented beverage production**. 2 ed. New York: Klumer Academic/plenum Publishers, 2003. cap.11, p. 239-262.

PIGGOTT, J.R.; PATERSON, A. The contributions of the process to flavour in Scotch malt whisky. In: PIGGOTT, J.R.; PATERSON, A. (Ed.). **Distilled beverage flavour: recent developments**. New York: VCH, 1989. 352p.

PIGGOTT, J.R.; SHARP, R.; DUNCAN, R.E.B. **The science and technology of whiskies**. New York: Longman, 1989. 410p.

PIMENTEL-GOMES, F.; GARCIA, C.H. **Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais**: exposição com exemplos e orientações para uso de aplicativos. Piracicaba: FEALQ, 2002. 309p.

PRETORIUS, I.S.; VAN DER WESTHUIZEN, T.J. The impact of yeast genetics and recombinant DNA technology on the wine industry- a review, **South Africa Journal Enology Viticulture**, Adelaide, v.12, p. 3-31.1991

RANKINE, B.C. Formation of higher alcohols by wine yeasts relationship to taste thresholds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.18, p.583-589, 1967.

REAZIN, G. H. Chemical mechanisms In whiskey maturation. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.32, n.4, p.283-289, 1981

RIBEIRO, C.A.F. **Potencialidades de diferentes linhagens de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* tecnologia de aguardente de cana**. Piracicaba, 1997. 107p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

RIBEIRO, J.C.G.M. Matéria Prima. In:_____. **Fabricação artesanal da cachaça mineira**. Belo Horizonte: Ed. O lutador, 2002. cap.3, p. 9-29a.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A.; **Handbook of enology: the microbiology of wine and vinifications.**, 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2006: v.1

ROTA, M.B. **Efeito do processo de bidestilação na qualidade sensorial da cachaça**. 2008. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2008

ROTA, M.B.; FARIA, J.B. Efeito do processo de bidestilação na qualidade sensorial da cachaça. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.20, n.1, p.121-127, 2009.

SCHLATTER, J.; LUTZ, W. K. The carcinogenic potential of ethyl carbamate (urethane): risk assessment at human dietary exposure levels.**Food Chemistry Toxicology**, Oxford, v. 28., n. 3, p. 205-211. 1990.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS- SEBRAE. **Diagnóstico da cachaça de Minas Gerais**. Belo Horizonte, 2001. Disponível em: <http://www.sebraemg.com.br/arquivos/programaseprojetos/agronegocios/Cachaça/Cach%3%a7a%20MG.pdf> acessado em 12 de dezembro de 2009

_____.**Estudos de mercado Sebrae/espm**.2008

SILVA, F. C.; CESAR, M. A. A.; SILVA, C.A.B. **Pequenas indústrias rurais de cana-de-açúcar: melado, rapadura e açúcar mascavo**. Brasil: EMBRAPA, 2003. 155p.

SILVA , R. L. C. **Exportações brasileiras de cachaça**. São Paulo: Instituto de Economia Agrícola, 2007.

SOLES, R.M.; OUGH, C.S.; KUNKEE, R.E. Ester concentration differences in wine fermented by various species and strains of yeast. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 33, n. 2, p. 94-98, 1982.

SOUZA, A. P. **Produção de aguardentes de cana-de-açúcar por dupla destilação em alambique retificador**. 2009. 97p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

SUOMALAINEN, H. Yeast and its effect on the flavour of alcoholic beverages. **Journal of the institute of Brewing**, London, v.69, p.473-478, 1971.

SUOMALAINEN, H.; LEHTONEN, M. The production of aroma compounds by yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 85, p. 149-156, 1979.

SUOMALAINEN, H.; NYKÄNEN, L. The aroma components produced by yeast in nitro-free sugar solution. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v.72, p. 469-474, 1966.

TEIXEIRA, K.R.S.; STEPHAN, M.P.; DÖBEREINER, J. Physiological studies of *Saccharobacter nitrocarptansa* new acid tolerant N₂ fixing bacterium. *In*: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION WITH NON-LEGUMES,4. 1987, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro:EMBRAPA, 1987. 149 p.

TRINDADE, A.G. **Cachaça: um amor brasileiro**. São Paulo: Melhoramentos, 2006. 160 p.

TRIVELIN, P.C.O.; LARA CABEZAS, W.A.R.; VICTORIA, R.L.; REICHARDT, K. Evalation of estimating plant recovery of fertilizar of nitrogen applied to suga cane. **Scientia Agricola**, Piraciaba, v.51, p.226-234,1994

VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de bebidas**. São Paulo: Edgard Blucher, 2005. 500p.

WALKER, G.M. **Yeast physiology and biotechnology**. New York:John Wiley,& Sons, 1998'

WEBB, A.D.; INGRAHAM, J. L. Fusel oil. **Advances in Applied Microbiology**, Washington, v.5, p.317-353, 1963.

WINDLOHZ, M. (Ed.). **The merk index**. Rahway: Merk, 1976.

YOKOYA, F. **Fabricação da cachaça de cana**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", 1995. 92p.