Francisco Wendel Batista de Aquino

Dextranas em açúcares e em aguardentes de cana

Tese apresentada ao instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências (Química Analítica).

Orientador: Prof. Dr. Douglas Wagner Franco

São Carlos

2009

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao caráter do meu pai Heron, ao amor incondicional da minha mãe Ana Maria, e as minhas irmãs Elba por sua generosidade, e Lígia por sua alegria.

AGRADECIMENTOS

A Deus ...

Aos meus pais Heron e Ana, pelo amor, confiança, educação, e pelos exemplos de uma vida de paz e dignidade.

A Elba e Ligia pelo amor e por fazerem valer a palavra irmão.

As minhas queridas sobrinhas Thainá e Thais, pelo simples fato de vocês existirem.

Aos meus tios(as) e demais familiares, pelo carinho e incentivo. Aos meus avós Joaquim e Erice, Abílio e Josefa (*in memoriam*) por terem me dado muitos motivos para guardá-los no coração e ao meu tio José Eudes (*in memoriam*) que foi o meu primeiro professor de química.

Ao prof. Douglas Wagner Franco, pelas oportunidades e confiança.

Aos amigos(as) que fazem ou fizeram parte do LDQA, Carlos Galinaro, Alexandre Ataide, Daniel, Silmara, Ivonete, Felipe, André Barbie, Fernanda, Olívia, Eduardo, Roni, Regina, Natália, e Silvia.

A Veroneide, pela amizade e auxílio na realização deste trabalho.

Ao Pedro Bertarini por ser uma das pessoas mais humanas que tive o prazer de conhecer, ao Guilherme Lage por ter sido sempre um amigo tão atencioso e a Fernanda Bertarini pela agradável convivência nos últimos meses do doutorado.

Aos meus inestimáveis amigos de república Tauries, Ivan, Edgar, Eduardo, Fabio e a todos os agregados que por lá sempre estiveram nos inesquecíveis momentos de alegria.

Ao Elmo da Silva, do Centro de Tecnologia Canavieira (Piracicaba – SP), pelas amostras cedidas e pela grande colaboração na respostas de questionamentos técnicos não limitados somente a este trabalho.

Ao Roberto Machado de Moraes do Instituto de Tecnologia de Alimentos (Campinas – SP), pelas amostras cedidas.

Ao Julio e ao Paulo do Laboratório de saneamento do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos USP, pelo apoio nas análises turbidimétricas.

Ao professor Fernando Valadares Novaes, pela atenção, presteza com as quais sempre respondeu as minhas perguntas.

Aos amigos de todo Brasil que teve a alegria de fazer no IQSC.

Ao Jackson Carvalho, sempre um amigo e incentivador.

A todos os amigos(as) do Crato, sempre trago a lembrança de vocês comigo.

Aos funcionários do IQSC, e em especial a Silvia e Andreia do serviço de Pós-Graduação, e a Bernadete da biblioteca que contribuíram com para a realização deste trabalho.

A CAPES, pela bolsa concedida.

A todos as pessoas e instituições que de alguma maneira, contribuíram para a execução deste trabalho.

*"Se o conhecimento pode criar problemas, não é através da
ignorância que podemos solucioná-los."*

Isaac Asimov

RESUMO

O Brasil é atualmente o maior produtor e exportador mundial de açúcar e a aguardente de cana aqui produzida é a terceira bebida destilada mais consumida no mundo. Contudo, estes produtos ainda têm a sua qualidade afetada pela presença de Dextranas. Devido à sua origem (produto secundário do metabolismo bacteriano) e por conta das suas propriedades físico-químicas, as dextranas constituem um importante meio para a avaliação da qualidade do açúcar. No âmbito industrial, as dextranas podem causar diversos problemas ao setor alimentício que utiliza o açúcar como matéria-prima, além de estarem diretamente relacionadas à formação de precipitados na aguardente de cana adoçada. Este trabalho apresenta o primeiro perfil da distribuição de massa molar das dextranas presentes no açúcar brasileiro em função dos seus valores de M_n , M_w , M_z e polidispersividade, os quais exercem influência significativa sobre suas características físico-químicas. Estes parâmetros foram determinados via cromatografia líquida de exclusão por tamanho. O perfil de distribuição de massa molar traçado exibiu, majoritariamente, a presença de dois grupos de dextranas com valores de M_w médios de $5,0 \times 10^6$ e $4,8 \times 10^4$ Da, e, ocasionalmente, a presença de dextranas que foram classificadas num terceiro grupo com massas molares da ordem de 10^5 Da. Através deste perfil, foram avaliadas, em sistemas modelo aguardente-dextrana, as influências dos fatores temperatura, acidez, presença dos íons metálicos Cu^{II} , Fe^{III} , Ca^{II} e Mg^{II} e incidência de luz sobre a velocidade de formação dos depósitos de dextranas na aguardente de cana. Demonstrou-se que a acidez e a temperatura foram os fatores que mais influenciam na velocidade de precipitação das dextranas em aguardentes de cana adoçadas.

Palavras-chave: Açúcar, Aguardente de Cana, Dextranas, Precipitados.

ABSTRACT

Brazil is the largest producer and exporter of sugar in the world, and the cachaça is the third most produced distilled beverage in the world. However, these products have their quality affected by the presence of dextrans. Because of its origin (a secondary compound of bacterial metabolism) and due to its physical-chemical properties, the dextrans are an important indicator to assess the sugar quality. Dextrans can lead to problems in processed food production, and it has a strong relation with insoluble deposits in sugared sugar cane spirits. The dextran molecular mass distribution profile in terms of M_n , M_w , M_z and polydispersity in Brazilian sugars are reported for the first time. The analyses were accomplished by Size-exclusion chromatography, using a refraction index detector. In most of the sugar samples, it was possible to identify two major groups of dextrans with M_w averages of 5.0×10^6 e 4.8×10^4 Da. A third group of dextrans with M_w of 10^5 was occasionally observed. With this data, model systems were built to assess the influence of the temperature, acidity, presence metallic ions Cu^{II} , Fe^{III} , Ca^{II} , and Mg^{II} , light incidence in relation of dextran precipitation velocities. It is demonstrated that factors temperature and acidity are the most influential in the dextran precipitation velocity in sugar cane spirits.

Keywords: Sugar, Sugarcane Spirit, Dextran, Insoluble Deposits.

Lista de Figuras

Figura 1. Fluxograma geral do processo de produção da aguardente de cana ou da cachaça	21
Figura 2. Precipitados de dextranas em uma aguardente de cana	25
Figura 3. Estrutura química de um segmento de uma molécula de dextrana.....	28
Figura 4. Representação do mecanismo da ação catalítica da enzima dextrana-sacarase.....	29
Figura 5. Mecanismo da formação das ramificações α -(1 $\rightarrow$ 3) das dextranas.....	30
Figura 6. Padrão normal dos cristais de açúcar x Cristais de açúcar alongados por conta da presença de dextranas	32
Figura 7. Representação da relação entre o perfil de eluição e a curva de calibração na SEC.....	38
Figura 8. Curva cumulativa e curva de distribuição de massa de um polímero mostrando as suas principais distribuições de massas molares	39
Figura 9. Representação de um sistema de SEC típico	40
Figura 10. Curva de calibração utilizada para a análise de distribuição de massas das dextranas nos açúcares e nos precipitados das aguardentes adoçadas.....	48
Figura 11. Cromatograma por exclusão por tamanho de uma amostra de açúcar.....	58
Figura 12. Gráfico de scores e de pesos obtidos via PCA para todos os descritores analisados nas amostras de açúcar produzidas nas regiões nordeste e sudeste do Brasil	71

Figura 13. Gráfico de scores e de pesos obtidos via PCA de todos os descritores analisados nas amostras de açúcar originadas do nordeste, do sudeste e das usinas monitoradas.....	72
Figura 14. Gráfico de scores e de pesos obtidos via PCA para os principais descritores analisados nas amostras de açúcar originadas do nordeste, do sudeste e das usinas monitoradas.....	73
Figura 15. Micrografia de grânulos dos padrões de dextranas utilizados para compor os sistemas modelos monitorados	82
Figura 16. Turbidez dos sistemas aguardente-dextrana mantidos ao longo do tempo a 15 °C	83
Figura 17. Turbidez dos sistemas aguardente-dextrana mantidos ao longo do tempo a 25 °C	85
Figura 18. Turbidez dos sistemas aguardente-dextrana ao longo do mantidos tempo a 35 °C	86
Figura 19. Cromatogramas de uma mistura de dois padrões de dextranas, e de dextranas isoladas do resíduo de filtração de um xarope hidroalcoólico de açúcar utilizado para a adoçagem de uma aguardente de cana.....	92
Figura 20. Turbidez dos sistemas modelo aguardente-dextrana em concentrações de acidez total de 28,79 e 13,91 mg de ácido acético/100mL A.A. ao longo do tempo a uma temperatura de 25 °C, e de 28,79 mg de ácido acético/100mL A.A. mantidos ao longo do tempo a uma temperatura de 15 °C.....	94

Lista de Tabelas

Tabela 1. Limites estabelecidos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento para os congêneres e contaminantes da aguardente de cana	18
Tabela 2. Principais variáveis relativas aos processos de destilação que influenciam o desempenho e a qualidade da aguardente produzida	23
Tabela 3. Especificações físico-químicas dos principais tipos comerciais de açúcar produzidos na Brasil.....	33
Tabela 4. Avaliação da precisão e exatidão da metodologia cromatográfica utilizada nas análises de distribuição de massa molar das dextranas nas amostras de açúcar e de depósitos das aguardentes analisadas	49
Tabela 5 Condições analíticas utilizadas na análise dos elementos Ca, Mg, Cu e Fe via ICP-OES.....	51
Tabela 6. Valores dos parâmetros de caracterização da distribuição de massa molar em Da e de polidispersividade das dextranas presentes em açúcares da região nordeste do Brasil (safra 2006/2007)	53
Tabela 7. Valores dos parâmetros de caracterização da distribuição de massa molar em Da e de polidispersividade das dextranas presentes em açúcares da região sudeste do Brasil (safra 2006/2007)	55
Tabela 8. Valores dos parâmetros de caracterização da distribuição de massa molar em Da e de polidispersividade das dextranas presentes em açúcares originados de 10 usinas da região sudeste do Brasil, monitoradas durante 4 safras consecutivas (97/98 – 00/01)	61
Tabela 9. Percentuais relativos obtidos por meio das curvas cumulativas para as dextranas presentes nas amostras de açúcar via SEC.....	66

Tabela 10. Valores médios para os parâmetros de distribuição de massa das dextranas nas amostras de açúcares cedidas por 5 produtores de aguardentes	74
Tabela 11. Valores dos parâmetros de caracterização da distribuição de massa molar em Da e de polidispersividade das dextranas presentes nos depósitos formados em aguardentes de cana adoçadas	76
Tabela 12. Valores de acidez total titulável (mg CH ₃ COOH/100mL A.A.) determinados em aguardentes de cana não envelhecidas destiladas em colunas.....	79
Tabela 13. Dextranas em solução e precipitadas nas soluções modelo mantidas ao longo do tempo a 15 °C.....	87
Tabela 14. Dextranas em solução e precipitadas nas soluções modelo mantidas ao longo do tempo a 25 °C.....	88
Tabela 15. Dextranas em solução e precipitadas nas soluções modelo mantidas ao longo do tempo a 35 °C.....	89
Tabela 16. Razões entre as concentrações de dextranas inicialmente em solução e remanescentes decorridos 210 dias de permanência a 15, 25 e 35 °C	90
Tabela 17. Dextranas em solução e precipitadas nas soluções modelo com acidez total de 28,79 e 13,91 mg de ácido acético/100 mL de A.A.	95
Tabela 18. Concentrações em mg/L de Ca, Mg, Cu e Fe nas soluções modelo mantidas com acidez total de 14,04 mg de ácido acético/100 mL de A.A. ao longo do tempo a 25 °C	98
Tabela 19. Valores de Turbidez e de dextranas remanescente em solução para os sistemas aguardente-dextrana com e sem incidência de luz após 120 dias de incubação.....	101

Lista de Siglas e Abreviaturas

A.A. – Álcool Anidro

ACS – American Chemical Society

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

COPERSUCAR – Cooperativa de Produtores de Cana-de-açúcar, Açúcar, e Álcool do Estado de São Paulo

Da – Dalton (Unidade de medida de massa atômica)

EDX - Dispersão de Energia de Raio-X

IBRAC – Instituto Brasileiro da Cachaça

ICP-OES – (Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry)

Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente

ICUMSA – International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis

IQSC – Instituto de Química de São Carlos

ITAL – Instituto de Tecnologia de Alimentos

LDQA – Laboratório para o Desenvolvimento da Química da Aguardente

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

NIST – National Institute of Standards and Technology

NTU – (Nephelometric Turbidity Units) Unidade Nefelométrica de Turbidez

PCA – Análise de Componentes Principais

RPM – Rotações por minuto

SEC – Size Exclusion Chromatography

Lista de Apêndices

Apêndice A. Localização das usinas de onde foram coletadas as amostras de açúcar durante o período de 4 safras consecutivas e Imagens de sensoriamento remoto do mapeamento da área plantada com a cultura de cana-de-açúcar no Paraná, São Paulo e Minas Gerais	116
Apêndice B. Foto ilustrativa do precipitado oriundo de uma amostra de açúcar obtido após a ultracentrifugação de sua solução durante o procedimento de isolamentos das dextranas nos açúcares e aguardentes analisados.....	118
Apêndice C. Curvas de calibração obtidas pelo método do padrão externo utilizadas para a quantificação de dextranas solúveis nos sistemas modelo aguardente-dextrana	119
Apêndice D. Área de trabalho do software GPC for Class-Vp 1.02 (Shimadzu), utilizado nos cálculos dos percentuais relativos das dextranas presentes nas amostras de açúcar.....	121
Apêndice E. Espectro de dispersão de energia de raio-X (EDX) da dextrana $M_w 2,1 \times 10^6$ Da antes e após o período de contato com os metais Ca, Mg, Cu e Fe por 90 dias no sistema aguardente-dextrana-metal.	122

Lista de Anexos

Anexo 1. Artigo Científico – Molecular mass distribution of dextran of in Brazilian sugar and insoluble deposits of cachaça.....	123
---	-----

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Apêndices

Listas de Anexos

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Cachaça e aguardente de cana, suas definições e aspectos gerais do mercado	17
1.2 Processo produtivo	20
1.3 Formação de precipitados em aguardentes de cana adoçadas e problemas relacionados	24
1.4 Presença de precipitados em outras bebidas	26
1.5 Dextranas.....	27
1.5.1 Definição, mecanismo de formação e origem das dextranas no açúcar.....	27
1.5.2 Propriedades físico-químicas das dextranas e suas aplicações na indústria de alimentos e bebidas.....	31
1.5.3 Dextranas no açúcar brasileiro.....	33
1.6 Análise de dextrana em alimentos e bebidas por cromatografia por exclusão por tamanho	34
2. OBJETIVOS	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1 Amostras	42

3.2 Reagentes.....	43
3.3 Instrumentação	44
3.4 Procedimento experimental	45
3.4.1 Preparo das amostras de açúcares e dos depósitos formados nas aguardentes	45
3.4.2 Determinação cromatográfica da distribuição de massa das dextranas nos açúcares e nos depósitos formados em aguardentes adoçadas.....	47
3.4.3 Preparo e análise das soluções modelo (aguardente-dextrana).....	49
3.5 Métodos quimiométricos	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 Perfil da distribuição de massa molar das dextranas presentes no açúcar brasileiro.....	52
4.2 Distribuição de massa molar das dextranas precipitadas em aguardentes de cana adoçadas	75
4.3 Formação de precipitados de dextranas em soluções modelos	78
5. CONCLUSÃO	104
6. REFERÊNCIAS.....	106
7. APÊNDICES	116
8. ANEXOS	123

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cachaça e aguardente de cana, suas definições e aspectos gerais do mercado

Segundo a Legislação¹ brasileira, a cachaça é a bebida obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar produzida exclusivamente no Brasil, que apresenta uma concentração etanólica de 38% – 48% v/v a 20°C, enquanto que a aguardente de cana é definida como a bebida originada do destilado simples da cana-de-açúcar ou da destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar com concentração de etanol de 38% – 54% v/v a 20 °C^a.

Esta mesma legislação¹ define os mesmos congêneres e contaminantes para ambas as bebidas, tanto em termos qualitativos e como quantitativos (apresentados na Tabela 1). Entretanto, nenhuma diferenciação é mencionada com respeito aos seus componentes minoritários os quais são importantes em termos da caracterização química e sensorial de cada uma destas bebidas.

Também é permitido¹ que ambos os produtos possam conter no máximo 30 g/L de açúcares expressos em sacarose. Entretanto as cachaças e aguardentes de cana que contiverem teores de açúcares superiores a 6 g/L, são obrigadas a mencionarem a presença de açúcar nos seus rótulos¹, mas lamentavelmente sem a obrigatoriedade de informar a sua concentração.

^a Na prática, as cachaças e as aguardentes de cana comercializadas no Brasil apresentam um teor alcoólico entre 38 e 44 % v/v. Desta forma os termos cachaça e aguardente de cana serão usados como sinônimos ao longo do texto.

Tabela 1. Limites estabelecidos pelo Ministério da Agricultura pecuária e Abastecimento – MAPA para os congêneres e contaminantes da aguardente de cana¹.

COMPOSTO	UNIDADE	MÍNIMO	MÁXIMO
Cobre ^a	mg/L	-	5,00
Chumbo ^a	µg/L	-	200
Arsênio ^a	µg/L	-	100
Carbamato de etila ^a	µg/L	-	150
Acroleína ^a	mg/100mL A.A.	-	5,00
Álcool metílico ^a	mg/100mL A.A.	-	20,0
Álcool sec-butilico (2-butanol) ^a	mg/100mL A.A.	-	10,0
Álcool n-butilico (1-butanol) ^a	mg/100mL A.A.	-	3,00
Acidez volátil (em ácido acético) ^b	mg/100mL A.A.	-	150
Ésteres totais (em acetato de etila) ^b	mg/100mL A.A.	-	200
Aldeídos totais (em acetaldeído) ^b	mg/100mL A.A.	-	30,0
Soma de furfural e hidroximetilfurfural ^b	mg/100mL A.A.	-	5,00
Soma dos álcoois isobutílico (2-metil propanol), isoamílicos (2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol) e n-propílico (1-propanol) ^b	mg/100mL A.A.	-	360
Soma dos congêneres	mg/100mL A.A..	200	650

A.A.= Álcool anidro; a = Contaminante; b = Congênere.

Com uma produção oficial estimada em 1,3 bilhão de litros por ano, mas que pode aproximar-se de 2 bilhões de litros considerando a produção informal, a cachaça além de ser o terceiro produto mais importante da indústria sucroalcooleira

brasileira, é também a terceira bebida destilada mais consumida no mundo superada apenas pela vodca e pelo soju com 4,5 e 2,0 bilhões de litros respectivamente^{2,3}.

No Brasil são mais de 40 mil produtores e 4 mil marcas, responsáveis por aproximadamente 600 mil empregos diretos e indiretos, movimentando mais de 600 milhões de dólares por ano, e representando 87% da produção de bebidas destiladas do país^{3,4}.

Em se tratando de volume, os maiores produtores brasileiros são os estados de São Paulo com aproximadamente 45% da produção total do país, seguido do Pernambuco e do Ceará com produções individuais da ordem de 12%, Minas Gerais com 10%, Goiás 6%, Rio de Janeiro 5%, Bahia e Paraíba com 2% cada^{4,5}. Entretanto Minas Gerais destaca-se como o estado com o maior número de produtores de cachaça de alambique (mais de 8.400 pequenos produtores oficialmente registrados)^{5,6}.

Atualmente o Brasil exporta cachaça para mais de 60 países, mas de forma paradoxal o mercado da cachaça ainda é praticamente doméstico^b, devido as exportações nunca terem ultrapassado mais de 2,0% da produção anual, e que apenas 140 empresas, em sua maioria médias e grandes exportam regularmente os seus produtos^{3,4}, muitas vezes na forma “a granel”.

Segundo o Instituto Brasileiro da Cachaça – IBRAC, em 2007 foram exportados 9 milhões de litros de cachaça cujo principais destinos foram a Europa (Alemanha, Portugal, Espanha, França) e Estados Unidos⁴.

^b Tomando-se como base a produção oficial de 1,3 bilhão de litros, estima-se um consumo anual de 12 litros de cachaça por brasileiro acima de 18 anos⁵.

1.2 Processo produtivo

Sob o ponto de vista físico-químico, o processo produtivo da aguardente de cana ou da cachaça pode ser dividido em quatro etapas distintas na seguinte ordem: obtenção e preparo do mosto, fermentação, destilação do vinho e envelhecimento (etapa não obrigatória), as quais podem ser localizadas na Figura 1, que apresenta o fluxograma geral do seu processo de produção.

Figura 1. Fluxograma geral do processo de produção da aguardente de cana ou da cachaça. Fonte: adaptado de Espinoza, L. J. S., Tecnologia de Produção de Cachaça. Disponível em http://www.crg4.org.br/downloads/tec_cachaca.pdf acesso em 20 de junho de 2009.

Denomina-se de mosto o caldo de cana em condições aptas para ser fermentado. Para tanto são necessários procedimentos que envolvem a diluição do caldo para o ajuste do °Brix (14 – 16), correção do seu pH ($\cong$ 4,5) (opcional), a adição de nutrientes para as leveduras (opcional), e até aplicação de anticépticos^{7,8}. Durante a sua obtenção, um importante ponto que deve ser observado, é iniciar a moagem da cana no mais curto intervalo de tempo a partir da sua colheita, pois a cana cortada à espera da moagem sofre deteriorações que ocasionam perdas de rendimento e de qualidade do produto final^{7,8}.

A fermentação alcoólica é uma das principais etapas do processo de produção da cachaça. Neste momento a levedura metaboliza a glicose produzindo majoritariamente etanol e gás carbônico.

Uma boa fermentação deve ser realizada em condições adequadas de concentração de açúcares, temperatura (entre 26 e 32 °C), pH, e higiene, que são essenciais para assegurar os melhores rendimentos fermentativos e para a não proliferação de bactérias contaminantes.

Estas bactérias competem com as leveduras pelo substrato, elevando a partir seu metabolismo secundário, a concentração de compostos como o ácido acético, o ácido butírico, alcoóis e entre outros compostos que na maioria dos casos afetam negativamente as características sensoriais do produto final^{7,8}. A contaminação bacteriana do mosto pode ainda gerar compostos como as dextranas que provocam um aumento exagerado na sua viscosidade o que dificulta o desprendimento de gás carbônico entre outros inconvenientes^{7,8}.

Chama-se de vinho o produto resultante da fermentação alcoólica do mosto, que após ser destilado origina a cachaça ou a aguardente. O vinho é composto principalmente por água 89 – 94% v/v, etanol 5 – 10% v/v, e por uma fração minoritária com menos de 1% v/v formada por um grande número de substâncias.

Tais compostos são em sua maioria ácidos, ésteres, aldeídos, cetonas, e álcoois, que mesmo em concentrações da ordem de mg/L ou ppb contribuem efetivamente para as características sensoriais da aguardente^{7,8,9}.

A destilação do vinho pode ser conduzida de forma descontínua (destilação simples em bateladas) ou contínua, que são realizadas respectivamente em alambiques e colunas. Independentemente do aparato em que a destilação seja realizada, a qualidade dos produtos por eles obtidos, depende tanto de variáveis relativas ao projeto destes equipamentos, quanto das suas condições operacionais^{7,8,9}, dentre as quais destacam-se as apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Principais variáveis relativas aos processos de destilação que influenciam o desempenho e a qualidade da aguardente produzida^{7,8,9}.

Processo descontínuo (Alambiques)		Processo contínuo (Colunas)	
Quanto ao projeto	Quanto à operação	Quanto ao projeto	Quanto à operação
Material de construção: Cobre, aço, ou mistos	Intensidade de calor aplicado	Tipo de coluna: Alto ou baixo grau	Vazões de vinho
Forma de aquecimento: Fogo direto, vapor	Teor alcoólico do vinho	Número de bandejas	Vazões de vapor
Arranjo: Alambiques simples, ou de três corpos	Capacidade x volume de vinho adicionado	Material de construção: Totalmente em aço ou com presença de partes de cobre	Teor alcoólico do vinho
Formato do capitel	Correta separação da cabeça, cauda e coração	condensadores: horizontais ou verticais	Pressão de trabalho

1.3 Formação de precipitados em aguardentes de cana adoçadas e problemas relacionados

A adição de açúcar (sacarose) na cachaça recém destilada é bastante comum, principalmente entre os produtores que obtêm a sua bebida por destilação em coluna, e pelos engarrafadores que elaboram a sua aguardente a partir da mistura de outras normalmente compradas de pequenos produtores.

Os principais objetivos desta prática são: suavizar o sabor seco e ardente e a agressividade característica dos produtos recém destilados, homogeneizar e padronizar os blends de cachaça resultantes da mistura de aguardentes oriundas de diferentes origens (prática bastante utilizada pelos standardizadores), e eventualmente mascarar sensorialmente a acidez elevada de cachaças que tenham sofrido problemas de contaminação bacteriana durante a fermentação alcoólica do mosto, ou erros durante a sua destilação^{10,11,12}.

Com exceção das questões sensoriais que guardam aspectos de preferências pessoais por parte dos consumidores, a formação de depósitos é o principal problema decorrente da adição de açúcar na cachaça.

Tais depósitos que no jargão dos produtores são denominados de flocos alcoólicos desvalorizam comercialmente a cachaça, pela associação que os consumidores fazem dos mesmos a falhas de higiene durante o seu processo produtivo ou a baixa qualidade da sua matéria-prima.

Em linhas gerais a literatura^{13,14} e os relatos de técnicos do setor, associam a gênese de precipitados como os que podem ser observados na Figura 2, à presença de dextranas contidas no açúcar usado na padronização da aguardente. Assim os depósitos formados por dextranas, que apesar de serem reconhecidamente atóxicas

e de não interferirem no aroma e no sabor de aguardente são um problema recorrente para muitos produtores¹⁵.

Foto: Wendel Aquino

Figura 2. Precipitados de dextranas em uma aguardente de cana.

Muitas vezes no momento do engarrafamento a aguardente ainda apresenta-se límpida^c, e não são raras as ocasiões em que a formação dos depósitos tem início somente após a sua venda e a expedição pelo fabricante. Neste caso este problema pode até acarretar a devolução da cachaça ao seu produtor.

A questão da formação de precipitados na aguardente adoçada não é de simples solução. Sob um ponto de vista minimalista, a resolução do problema estaria na proibição da prática da adoçagem da cachaça. Tal solução poderia ser admitida se o motivo desta prática fosse apenas mascarar os defeitos sensoriais de uma aguardente de qualidade inferior.

Entretanto além de permitida pela legislação brasileira¹, a adição da sacarose é realizada por conta de uma parcela considerável dos consumidores preferirem um produto mais suave¹⁰, ou mesmo adocicado. Outra razão para a adoçagem da

^c Este fato já foi comprovado no próprio LDQA, quando da aquisição de aguardentes límpidas que posteriormente apresentaram precipitados, ou pelo recebimento de amostras com este histórico enviadas pelos próprios produtores.

aguardente está no seu emprego para a formulação de bebidas prontas para consumo, como caipirinhas ou bebidas alcoólicas compostas com suco de frutas, destinadas inclusive para exportação.

1.4 Presença de precipitados em outras bebidas

O desenvolvimento de turvações e a formação de depósitos indesejados não são desafios que de forma alguma estão restritos a aguardente de cana brasileira. Diferentes bebidas não alcoólicas e alcoólicas apresentam este mesmo problema, por exemplo, refrigerantes^{16,17}, suco de frutas^{18,19}, cerveja²⁰, vinhos^{21,22,23}, e outras bebidas alcoólicas como os bitters²³ ou amargos (obtidos a partir da infusão de raízes, ervas aromáticas e folhas em destilados alcoólicos), que no Brasil tem como exemplo mais conhecido a bebida Campari®.

Em refrigerantes, pesquisadores como Edye (2004)¹⁷ e Oliveira et al (2007)¹⁶ relatam a formação de precipitados, conhecidos como flocos ácidos os quais são relacionados com a presença de resíduos de polissacarídeos da cana carreados para estes produtos pelo açúcar usado na sua produção.

Por outro lado, em diversos sucos de frutas processados o desenvolvimento de depósitos está mais frequentemente associado às interações entre aminoácidos, peptídeos e compostos fenólicos (normalmente polifenóis como por exemplos os taninos)^{18,19}. Estes mesmos compostos também são os maiores responsáveis pela precipitação de partículas em cervejas²⁰.

Nos vinhos^{21,22,23} além dos aminoácidos e polifenóis, alguns flavonóides como as procianidinas²³ são apontados como os componentes principais dos seus

precipitados. Já nos bitters associam-se a estes compostos carboidratos como, por exemplo, a glicose²³.

1.5 Dextranas

1.5.1 Definição, mecanismo de formação e origem das dextranas no açúcar

Homopolissacarídeos de glicose, as dextranas constituem uma classe de polímeros de fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$, cujos monômeros -D-glucopiranosil formam moléculas com massa molar da ordem de 10^3 a 10^7 Da, através de ligações glicosídicas do tipo $-(1 \rightarrow 6)$, pelo menos 50%, $-(1 \rightarrow 3)$, $-(1 \rightarrow 4)$ e $-(1 \rightarrow 2)$ ²⁴⁻²⁷.

Embora normalmente presentes no açúcar (sacarose), as dextranas não são componentes naturais da cana-de-açúcar ou da beterraba, suas maiores fontes comerciais. Elas são formadas pela ação da enzima dextrana-sacarase oriundas de bactérias contaminantes destas plantas. Estas bactérias pertencem em sua maioria ao gênero^d *Leuconostoc*, onde destaca-se como principal contaminante o *Leuconostoc mesenteroides* que é amplamente disseminado no solo das plantações²⁵.

Estruturalmente as dextranas encontradas no caldo da cana ou no açúcar dele derivado (representadas na Figura 3) são tipicamente lineares, apresentam em torno de 95% de ligações consecutivas $-(1 \rightarrow 6)$ formando uma cadeia principal, com cadeias laterais originadas de ligações $-(1 \rightarrow 3)$, ocasionalmente $-(1 \rightarrow 4)$, $-(1 \rightarrow 2)$ e apresentam uma distribuição de massa molar na faixa de $10^4 - 10^6$ Da²⁴⁻²⁷.

^d Outros gêneros bacterianos que produzem dextranas são os *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Acetobacter*^{26,27}.

Em consequência do seu alto peso molecular, as dextranas mesmo quando presentes em altas concentrações no vinho não são destiladas. Desta forma a origem das dextranas na cachaça fica restrita ao carregamento das mesmas através do açúcar adicionado pelos produtores.

Figura 3. Estrutura química de um segmento de uma molécula de dextrana. Fonte: adaptado de <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/carbohydrate-analysis/carbohydrate-analysis-ii.html> acesso em 20 de junho de 2009.

A reação geral para a síntese enzimática da dextrana é essencialmente irreversível e é dada pela seguinte equação²⁷:

Desde 1941 quando a enzima dextrana-sacarase (que é uma glicosiltransferase) foi descoberta, vários mecanismos foram propostos para explicar a biossíntese das dextranas²⁸. Entre eles destaca-se o da inserção sequencial do monômero entre a enzima e a cadeia em formação no seu terminal redutor, proposto por Stay (1943)²⁷, corroborado por Ebert e Schenk (1968)²⁹, demonstrado experimentalmente por Robyt, Kimble e Walseth (1974)^{28,30} e citados por Alsop (1983)³¹.

Neste mecanismo a dextrana cresce a partir da sua extremidade redutora³² como uma cadeia única, a partir da ação dos dois sítios ativos da dextrana-sacarase em duas etapas²⁸, conforme ilustrado na Figura 4.

Na primeira etapa os dois sítios ativos X_1 e X_2 realizam um ataque nucleofílico a moléculas de sacarose, formando dois grupos glicosil que permanecem ligados ao carbono 1 através de ligações covalentes. Na segunda etapa, a hidroxila do carbono 6 ($C_6 - OH$), de uma das unidades glicosídicas, faz um ataque nucleofílico ao glicosil ligado ao outro sítio catalítico, formando uma ligação $\alpha(1-6)$ e liberando um sítio que ataca outra molécula de sacarose, formando um novo grupo glicosil. Em seguida, a hidroxila do carbono 6 do novo grupo glicosil formado ataca o carbono 1 da espécie isomaltosil formada na etapa anterior^{28,30}.

Na presença de sacarose esta sequência de reações se repete continuamente entre os dois grupos catalíticos dos sítios X_1 e X_2 , formando alternadamente complexos covalentes com a glicose e a cadeia de dextrana em formação. A finalização da cadeia ocorre por deslocamento da dextrana, através da ação de aceptores como glicose ou frutose, quando estes atingem uma concentração suficiente para atuar no sítio ativo, de tal forma que uma das hidroxilas promove um ataque nucleofílico ao carbono 1 da dextrana^{28,30}.

Figura 4. Representação do mecanismo da ação catalítica da enzima dextrana-sacarase²⁸.

Sobre as ramificações das cadeias das dextranas majoritariamente constituídas de ligações $\alpha(1 \rightarrow 3)$, o trabalho experimental de Robyt e Taniguchi (1976) com espécies marcadas radioativamente, rejeitou a existência de uma enzima secundária envolvida na formação das ramificações³³. No mecanismo proposto pelos mesmos, um grupo hidroxil do C₃ de uma cadeia livre de dextrana realiza um ataque nucleofílico no C₁ de uma unidade glicosil ou dextranosil do complexo enzima-radical para formar uma ligação $\alpha(1 \rightarrow 3)$ liberando assim outra glicose ou dextrana da enzima²⁸, conforme ilustrado na Figura 5.

Figura 5. Mecanismo da formação das ramificações $\alpha(1 \rightarrow 3)$ das dextranas²⁸.

Como as dextranas são originadas a partir da contaminação bacteriana da cana, as suas concentrações no açúcar estão invariavelmente relacionadas a fatores ambientais e/ou falhas operacionais no manejo da cana ainda no campo ou durante o seu processamento nas usinas^{25,34,35}.

Em relação aos fatores ambientais destacam-se como pontos críticos as variações abruptas de temperatura nas plantações e a infestação da cana por

pragas que provocam rachaduras nos colmos da cana e o excesso de umidade causado por chuvas durante a sua colheita^{36,37,38}.

Dentre os fatores operacionais que contribuem para o aumento do teor de dextranas temos a colheita tardia da cana, a pratica de queimadas, o uso de ferramentas contaminadas e o empilhamento da cana durante o corte manual, o corte mecanizado feito muito rente ao solo e fraturas na cana devido ao ajuste incorreto das colheitadeiras, o tempo decorrido entre o corte e o processamento e as contaminações cruzadas que ocorrem na usina³⁶⁻³⁸.

1.5.2 Propriedades físico-químicas das dextranas e suas aplicações na indústria de alimentos e bebidas

De forma geral as dextranas produzidas pelas cepas do *Leuconostoc mesenteroides* são solúveis em água, metil sufóxido e etileno glicol³⁹ e insolúveis em metanol, etanol, isopropanol e acetona⁴⁰. Suas soluções aquosas são neutras e na faixa de 3 a 10% exibem atividade ótica positiva em torno de + 200°, são termicamente estáveis podendo ser autoclavadas ou congeladas, e apresentam uma viscosidade dinâmica que aumenta consideravelmente com a concentração^{27,28,39}.

Em soluções ácidas com pH < 2 as dextranas são hidrolisadas⁴¹. Em soluções alcalinas as dextranas apresentam a capacidade de formar complexos de composições definidas com metais como cálcio, cobre, ferro, manganês e zinco⁴², propriedade esta aparentemente relacionada com os grupos 3-hidroxil das ramificações $-(1 \rightarrow 3)-$ ^{28,42}.

As aplicações industriais das dextranas estão altamente atreladas a sua massa molar. Desta forma a ampla distribuição de massa das dextranas, propicia a

estes compostos diversas aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica, petroquímica e química²⁷.

Por outro lado nas usinas, as dextranas além de perdas na produção, promovem deformações dos cristais de açúcar, o entupimento de filtros, dificultam a remoção do material em suspensão durante a etapa de clarificação do açúcar²⁴.

Figura 6. Padrão normal dos cristais de açúcar (A) x Cristais de açúcar alongados por conta da presença de dextranas (B). Fonte: adaptado de <http://www.opticalactivity.com/dextran/The%20Dextran%20Story.htm> e http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sugar_2xmacro.jpg.

Isoladamente as dextranas de massa molar de $1,0 \times 10^4$ a $2,5 \times 10^7$ Da são amplamente utilizadas na formulação de alimentos nas funções de agente espessante, geleificante, inibidor de cristalização e emulsificante em produtos como: sucos, bebidas lácteas, sorvetes, xaropes^{27,28}. Contudo a sua presença quando introduzida como contaminante do açúcar na indústria alimentícia causa problemas como o entupimento de filtros e tubulações, alterações de viscosidade em xaropes, deformação de balas, formação de depósitos e turvação de bebidas alcoólicas^{15,38}.

1.5.3 Dextranas no açúcar brasileiro

É bem conhecida a relação entre a presença de dextranas no açúcar e a qualidade do seu processo de obtenção^{24,38,16,43,44,45}, e também com a formação de depósitos em bebidas alcoólicas pela presença das mesmas como contaminantes oriundos do açúcar^{34,38}. Apesar disso são escassos os relatos científicos sobre as concentrações de dextranas no açúcar brasileiro, e do nosso conhecimento, inexistentes no que diz respeito as suas características de distribuição de massa molar.

Em termos de especificações técnicas, a maioria das usinas adota os padrões definidos pela Cooperativa de produtores de cana-de-açúcar, açúcar e álcool do estado de São Paulo – COPERUCAR¹⁶, que são apresentados na Tabela 3. Todavia estes valores normalmente apresentam ligeiras variações em açúcares produzidos em usinas que não pertencem a este grupo.

Tabela 3. Especificações físico-químicas dos principais tipos comerciais de açúcar produzidos no Brasil¹⁶.

Parâmetro	Unidade	Limite	Tipo					Exportação
			1	2	2G	3	4	VVHP
Polarização	°Z	Mínimo	99,8	99,7	99,7	99,7	99,7	99,6
Cor INCUMSA	UI	Máximo	100	150	150	200	400	450
Sulfito	mg.Kg ⁻¹	Máximo	15	10	15	15	20	<1
Dextrana	mg.Kg ⁻¹	Máximo	-	100	100	150	-	100
Amido	mg.Kg ⁻¹	Máximo	-	180	180	180	-	100
Insolúveis	1 a 10	Máximo	5	5	4	9	-	-
Part. Magnetizáveis	mg.Kg ⁻¹	Máximo	2	1	1	5	-	-
Granulometria	AM (CV %)		<0,6 (<35)					

Onde: °Z = graus Zucker, AM = tamanho médio do cristal, CV = uniformidade do cristal

Dentre os açúcares apresentados na Tabela 3, por motivos econômicos o do tipo 4 é um dos mais utilizados pelos produtores de aguardente. Este claramente apresenta o inconveniente de não ter os teores de dextranas e amido controlados.

Recentemente reportamos¹⁵ dados sobre a quantificação de dextranas totais em açúcares brasileiros com características semelhantes aos usados pelos produtores de aguardente e em amostras de cachaças. As concentrações de dextranas totais variaram de 109,5 até 1840 mg/Kg de açúcar, com uma mediana de 820 mg/Kg. Sendo este valor mediano suficiente para desencadear a formação de depósitos em aguardentes que apresentassem uma concentração de sacarose da ordem de 6 g/L.

Apesar de o Brasil ser o maior produtor e exportador mundial de açúcar, permanecem inexistentes as informações sobre a distribuição de massa molar das dextranas no açúcar brasileiro, o que é imprescindível para o estudo da formação de precipitados em bebidas alcoólicas adoçadas, pelo fato da solubilidade das dextranas em soluções etanólicas decrescer com o aumento da sua massa molar^{40,45,46}.

1.6 Análises de dextrana em alimentos e bebidas por cromatografia por exclusão por tamanho

A massa molar de uma dextrana, ao lado do número de suas ramificações são duas propriedades chave que definem o comportamento destes compostos em soluções^{27,28}.

Em oposição ao que ocorre com as substâncias simples, a massa molecular de qualquer polímero não é bem definida, e depende do número de monômeros

presentes em cada uma das suas cadeias. Portanto as dextranas (ou qualquer polímero) são descritas em função da distribuição de sua massa molar, através de curvas de distribuição^{27,28}.

O termo genérico distribuição de massa molar engloba uma série de distribuições diferenciais, que tomam por base as características do polímero^{27,47}, onde as mais importantes são:

- Massa molar numérica média (M_n), definida como sendo a massa molar de todas as cadeias, dividida pelo número total de cadeias. Esta média enfatiza o número de cadeias do polímero, que é calculado matematicamente:

$$M_n = \frac{\sum N_i \cdot M_i}{\sum N_i} = \frac{\text{massa total do sistema}}{\text{número total de moléculas do sistema}} \quad (\text{eq. 4})$$

Onde: N_i representa o número de cadeias do polímero com massa

- Massa molar ponderal média (M_w), é o parâmetro onde a massa das cadeias poliméricas presentes em cada fração do polímero é priorizada em relação a massa total do polímero, matematicamente obtida pela seguinte equação.

$$M_w = \frac{\sum N_i \cdot M_i^2}{\sum N_i \cdot M_i} = \frac{\sum w_i \cdot M_i}{\sum w_i} \quad (\text{eq. 5})$$

Onde: w_i é a massa da fração i

- Massa molar Z-média (M_z), nesta forma de apresentação da distribuição, leva-se mais em conta a influência da massa molar de cada fração do polímero em relação à massa das cadeias individualmente.

$$M_z = \frac{\sum N_i \cdot M_i^3}{\sum N_i \cdot M_i^2} \quad (\text{eq. 6})$$

Outra informação importante que pode ser obtida por meio dos parâmetros de distribuição de massa é o índice de polidispersividade (IP), definido como sendo a

razão entre M_w e M_n . Quanto maior for o valor deste índice, mais ampla será a distribuição de tamanhos das cadeias no polímero⁴⁷.

$$IP = M_w/M_n \quad (\text{eq. 7})$$

Estes parâmetros podem ser determinados por varias metodologias como espectrometria de massas⁴⁸, osmometria⁴⁹, espalhamento de luz⁵⁰ e viscosimetria⁵¹.

Porém em matrizes complexas^{52,53} como alimentos⁵⁴, farmacos⁵⁵ e nos casos onde ocorre a presença simultânea de moléculas de um mesmo polímero com diferentes distribuições de massa^{52,56}, a cromatografia de exclusão por tamanho – SEC^e destaca-se pela eficiência do seu modo de separação, variada gama de detectores disponíveis, pequena quantidade de amostra requerida e ampla faixa analítica tanto de analitos quanto de distribuição de massas moleculares⁵⁷.

Os primeiros relatos sobre a separação cromatográfica de macromoléculas foram realizados por Lathe e Ruthven⁵⁸ (1956) que discutiram a influência das características das cadeias de amido na separação de proteínas, e por Porath e Flodin^{53,59} (1959), que usaram um gel semirrígido de polidextranas desprovido de grupos iônicos para separar vários polímeros solúveis em água.

Posteriormente estes mesmos tipos de géis foram largamente usados por outros pesquisadores, surgindo por este motivo a denominação cromatografia por permeabilidade (ou filtração) em gel, que por motivos históricos ainda são muito utilizados⁵³.

Atualmente este modo de separação cromatográfica é chamado de cromatografia de exclusão por tamanho, e os materiais mais utilizados na confecção das colunas, são sílicas derivatizadas e polímeros formados através de ligações

^e Do inglês Size Exclusion Chromatography.

cruzadas dos monômeros⁵⁸, como por exemplo, as fases estacionárias baseadas na copolimerização do etileno glicol e do metacrilato.

A cromatografia de exclusão por tamanho tem como princípio de separação o volume hidrodinâmico da molécula polimérica⁴⁷. Entende-se por volume hidrodinâmico, como sendo a forma enovelada a qual é a conformação mais estável que uma cadeia polimérica adquire em soluções diluídas⁴⁷. Isso posto, moléculas com tamanhos distintos apresentam diferentes tempos de retenção ao permearem a coluna cromatográfica.

Do ponto de vista matemático a cromatografia de separação por exclusão por tamanho pode ser descrita pela equação⁶⁰.

$$K_d = \frac{V_E - V_0}{V_T - V_0} \quad (\text{eq. 8})$$

Onde: K_d = coeficiente de distribuição do soluto;

V_E = volume de eluição da molécula;

V_0 = volume morto da coluna (correspondente ao volume de eluição de uma molécula com o menor tamanho suficiente para não penetrar em nenhum dos poros da fase estacionária);

V_T = volume total permeado da coluna (correspondente ao volume de eluição de uma molécula pequena o suficiente para penetrar em todos os poros da fase estacionária).

Estes parâmetros estão presentes na Figura 7, que representa uma curva de calibração típica da SEC. Tais curvas são construídas preferencialmente com padrões da mesma substância a ser analisada, embora em muitos casos seja possível a utilização de padrões secundários, porém esta prática não gera

resultados absolutos e sim estimativas⁵³. A função de calibração tipicamente usada na SEC é o polinômio apresentado na seguinte equação^{27,53,60}.

$$\log M = a_0 + a_1 \cdot V_e + a_2 \cdot V_e^2 + \dots + a_n \cdot V_e^n \quad (\text{eq. 9})$$

Onde: $a_0 - a_n$ = constantes específicas do sistema cromatográficos utilizado;

V_e = volume de eluição em mL;

M = massa molar dos padrões.

Figura 7. Representação da relação entre o perfil de eluição e a curva de calibração na SEC.

Já a Figura 8 mostra o perfil da distribuição de massa de um polímero obtido via cromatografia de exclusão por tamanho.

Figura 8. Curva cumulativa e curva de distribuição de massa de um polímero mostrando as suas principais distribuições de massas molares.

Ainda com relação à Figura 8, temos a curva de eluição cumulativa que informa as proporções dos analitos da amostra presentes na região de permeabilidade seletiva. Seu cálculo é realizado através do somatório das áreas dos picos presentes no cromatograma. Assim por meio desta informação, é possível determinar a fração percentual de cada polímero correspondente a uma dada massa molar média na amostra²⁷.

Dentre as vantagens anteriormente citadas da SEC, um dos pontos que mais merece destaque é a sua ampla faixa analítica em termos de massa molar. Essa característica pode ser obtida pelo uso de fases estacionárias com diferentes tamanhos de poros numa mesma coluna, e mais eficientemente pela associação em série de colunas que apresentam a mesma fase estacionária com partículas que apresentem diferentes tamanhos de poros⁵³. Neste caso as colunas devem ser conectadas de modo que o tamanho dos poros das partículas decresça na direção do fluxo da fase móvel.

Quanto aos detectores, os mais frequentemente usados são os detectores de índice de refração e o de espalhamento de luz, onde ambos são classificados como detectores sensíveis a concentração do analito⁵³.

Figura 9. Representação de um sistema de SEC típico.

Para fins quantitativos a literatura apresenta um variado número de técnicas³⁴, onde os métodos da Haze^{34,61} e o de Roberts^{34,62}, adotados respectivamente pela International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis – ICUMSA e pela Association of Official Analytical Chemists – AOAC são os mais difundidos e baseiam-se na insolubilidade das dextranas em etanol.

2. OBJETIVOS

Determinar o perfil de distribuição de massa molar das dextranas no açúcar brasileiro, utilizando-se a cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) acoplada a um detector de índice de refração.

Em função deste perfil, descrever a participação das dextranas no processo de formação de depósitos em aguardentes de cana adoçadas através de sistemas modelo aguardente-dextrana considerando a influência dos parâmetros temperatura, acidez, a presença dos íons metálicos Ca^{II} , Mg^{II} , Cu^{II} e Fe^{III} e da incidência de luz.

Determinar a distribuição de massa das dextranas em depósitos formados em aguardentes de cana adoçadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

Uma estimativa geral do perfil da distribuição de massa molar das dextranas foi obtida pela análise de 25 amostras de açúcar do estado de São Paulo (responsável por 70 % da produção nacional⁶³) e 12 amostras oriundas dos 4 maiores produtores da região nordeste (segundo maior produtor do Brasil⁶³).

Todas as amostras pertenciam à safra 2006/2007. As de São Paulo com características semelhantes às utilizadas pelos produtores de aguardente foram cedidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira – CTC Piracicaba – SP, e as do nordeste foram adquiridas no comércio daquela região.

As regiões ou cidades de origem das amostras bem como as suas quantidades são expressas a seguir: Catanduva – SP (6), Jaboticabal – SP (4), Sertãozinho – SP (2), Quatá – SP (2), Rincão – SP (2), Lençóis Paulista – SP (2), Ribeirão Preto – (2), São Carlos – SP (1), Araras – SP (1), Cerquilha – SP (1), Itapira – SP (1), Mococa – SP (1), Coruripe – AL (2), São Miguel dos Campos – AL (2), Ipojuca – PE (1), Rio Formoso – PE (1), Arês – RN (1), São Luiz do Quitunde – AL (1), Primavera – PE (1), Vitória da Conquista – BA (1), Alvorada – BA (1) e Itabuna – BA (1).

No intuito de avaliar possíveis variações e dotar de maior robustez o perfil das dextranas inicialmente traçado pelas análises das amostras supracitadas, foram analisadas amostras provenientes de 10 usinas da região sudeste coletadas durante quatro safras consecutivas (1997/1998, 1998/1999, 1999/2000, 2000/2001), perfazendo um total de mais 40 amostras.

Estas amostras classificadas como do tipo 3 e 4 segundo os padrões da Copersucar, foram cedidas pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL (Campinas – SP), que certificou as condições de estocagem e origem^f e das mesmas, as quais são listadas a seguir em ordem alfabética: Araporã – MG, Boituva – SP, Descalvado – SP, Jaboticabal – SP, Jacarezinho – PR, Leme – SP, Ourinhos – SP, Quatá – SP, Rafard – SP, e Serrana – SP.

Foram ainda analisadas 5 amostras de açúcares cedidas diretamente ao LDQA por produtores de aguardente (3 da região sudeste e 3 do nordeste do Brasil).

As amostras de aguardente contendo os depósitos analisados pertencem à coleção do LDQA, e possuem as seguintes origens: Tanapi – SP, Campina Grande – PB, Patus – PB, Candido Mota – SP, Fortaleza – CE, Colônia de Leopoldina – AL, São José dos Pinhais – PR, Jandaia do Sul – PR, São Paulo – SP, Tabatinga – SP, Vitória do Santo Antão – PE e Sorocaba – SP.

3.2 Reagentes

Os padrões de dextranas para SEC, com massa molar média M_w 11.600, 23.800, 48.300, 148.000, 410.000 e 1.100.000 Da foram comprados da Waters (Milford, MA, USA), e os de 2.100.000, 4.200.000, 5.900.000 e 7.400.000 Da foram adquiridos da American Polymer Standards (Mentor, OH, USA).

As soluções padrão de Cu, Fe, Ca, e Mg (1.000 mg/L) foram obtidas da Carlo Erba (Milão, Itália), e os padrões de dextrose e de amido foram comprados da Sigma-Aldrich.

^f Ver distribuição geográfica das usinas e a comparação das suas localizações com as principais áreas produtoras do Paraná e do sudeste brasileiro no Apêndice A.

Os reagentes: etanol anidro, sulfato de sódio anidro, ácido nítrico 65 %, iodeto de potássio, iodato de potássio, todos com grau ACS foram comprados da J. T. Baker (Xalostoc, México e Phillipsburg, MA, USA).

A água ultrapura utilizada em todas as etapas deste trabalho foi previamente destilada e, a seguir deionizada por um sistema Milli-Q da Millipore (Bedford, MA, USA) com resistividade maior que 18 M Ω cm.

3.3 Instrumentação

As análises cromatográficas (SEC) foram realizadas em um sistema para cromatografia líquida (Shimadzu), constituído por um módulo controlador SLS-10AVP, duas bombas modelo LC-10AD, um detector de índice de refração RID-10A e um injetor Rheodyne 7125i com um loop de 100 μ L. A aquisição e o tratamento dos dados cromatográficos foram realizadas utilizando respectivamente os softwares Shimadzu Class-VP 6.12 e GPC for Class-VP 1.02.

As colunas utilizadas foram conectadas em série na seguinte ordem: 1 pré-coluna Waters ultrahydrogel (6 μ m, 6,0 mm i.d. x 40 mm), 2 colunas Waters ultrahydrogel linear (10 μ m, 7,8 mm i.d. x 300 mm) empacotadas com um gel de metacrilato contendo uma mistura de partículas com poros de 250 a 2000 Å, e 1 coluna Tosoh Bioscience TSK-gel 3000PWxl (7 μ m, 7,8 mm i.d. x 300 mm) também empacotada com partículas com base de metacrilato apresentando um tamanho médio de poros de 200 Å.

Na etapa de isolamento das dextranas no açúcar e nos depósitos das aguardentes foi utilizada uma ultracentrífuga refrigerada Hitachi Himac CR20b2.

As medidas de turbidimetria foram realizadas em um turbidímetro Hach 2100P, sempre calibrado antes das leituras com padrões Stabcal de formazina (padrão primário para turbidez) 20, 100, 800 Nephelometric Turbidity Units - NTU.

Nas análises via microscopia eletrônica de varredura – MEV empregou-se um microscópio LEO modelo 440, acoplado a um detector OXFORD de dispersão de energia de raio X – EDX. Para a obtenção das fotomicrografias o MEV foi operado com um feixe de elétrons de 20 kV. As amostras foram previamente recobertas com 10nm de ouro em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 20 e mantidas em dessecador até o momento da análise.

As determinações de Cu, Fe, Ca e Mg nas aguardentes que compunham os modelos experimentais aguardente-dextrana foram executadas em um espectrômetro de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado – ICP OES Perkin Elmer modelo Optima 3000 dual view, com nebulizador do tipo pneumático concêntrico.

Para a manutenção das temperaturas nas quais foram realizados os ensaios com os modelos experimentais aguardente-dextranas foram utilizados banhos termostatizados Tecnal modelo TE-184.

3.4 Procedimento experimental

3.4.1 Preparo das amostras de açúcares e dos depósitos formados nas aguardentes

O preparo das amostras de açúcar para análise das dextranas via SEC seguiu o seguinte procedimento: 40,0 g da amostra foram dissolvidas com

aproximadamente 80 mL água em um balão volumétrico de 100 mL que posteriormente teve o seu volume completado. Após a homogeneização desta solução, 50 mL da mesma foi filtrada em um papel quantitativo Whatman 54 para a remoção de eventuais partículas insolúveis. Em uma alíquota de 40 mL do filtrado foram adicionados 160 mL de etanol anidro, esta solução foi homogeneizada, mantida em repouso por 24 horas e após este período foi centrifugada a 10.000 rpm a 4 °C por 1 hora. A porção sobrenadante do material centrifugado foi descartada, e ao precipitado foi adicionado 1,5 mL^g de Na₂SO₄ 0,025M (fase móvel) para a dissolução das dextranas. A solução obtida foi resfriada a aproximadamente 5 °C e filtrada em membrana de éster de celulose (Millipore, poros de 0,45 µm x 25 mm Ø).

A possibilidade da presença de amido nas amostras de açúcar foi considerada. Desta forma o procedimento de filtração adotado teve a função de garantir a sua ausência nas amostras injetadas. As condições de filtração previamente citadas tomaram como base a baixa solubilidade do amido em soluções aquosas, ainda mais ressaltada em temperaturas reduzidas^{64,65,66}, e no tamanho médio dos seus grânulos^{64,65,66} de 1 – 100 µm.

O amido além de poder causar entupimentos no sistema cromatográfico poderia resultar no caso de sua improvável eluição (em função das condições analíticas utilizadas) em interferência nas análises das dextranas. Portanto de maneira preventiva realizamos o teste para identificação de amido descrito pela farmacopéia européia⁶⁷, que se baseia no desenvolvimento da coloração azul típica do complexo amilose-iodo, em uma alíquota de cada amostra preparada. Os resultados foram sempre negativos.

^g Nos casos onde uma grande massa de precipitado foi obtida, utilizou-se até 5 mL de Na₂SO₄ no procedimento no procedimento de dissolução. Ver foto ilustrativa no Apêndice B.

Os precipitados formados nas aguardentes adoçadas pertencente à coleção do LDQA foram coletados sem que houvesse nenhuma adição de etanol para acelerar ou forçar a sua precipitação. Para tanto foi realizada a simples transferência da aguardente de sua garrafa para um funil de separação. Após a decantação dos mesmos, procedeu-se a sua transferência para tubos de centrifuga de 50 mL, tomando o cuidado de efetuar esta transferência com o menor volume de aguardente possível.

Este material foi centrifugado a 10.000 rpm a 4 °C por 1 hora. A solução sobrenadante foi descartada, e o precipitado foi dissolvido em volumes de 0,50 – 1,00 mL de Na₂SO₄ de acordo com as suas quantidades. Em seguida a solução resultante foi filtrada como anteriormente descrito no procedimento de preparo das amostras de açúcar.

3.4.2 Determinação cromatográfica da distribuição de massa das dextranas nos açúcares e nos depósitos formados em aguardentes adoçadas

As soluções estoque (4.000 mg/L) dos padrões de dextranas e dextrose foram separadamente preparadas pela dissolução de $20,0 \pm 0,1$ mg de cada padrão em balões volumétricos de 5,0 mL contendo 3,0 mL de água ultrapura os quais foram posteriormente aferidos com a mesma água.

Para construção da curva de calibração cada padrão foi diluído até uma concentração de 250 mg/L, em uma solução aquosa de Na₂SO₄ 0,025 M, que também foi usada como fase móvel.

Estes padrões foram injetados em duplicata no sistema cromatográfico operado a temperatura ambiente, em modo isocrático, com um fluxo de 0,5 mL/min de fase móvel na seguinte sequência: dextrose e dextrans em ordem crescente de M_w .

Diferentemente dos demais modos de separação cromatográficos, as curvas de calibração normalmente utilizadas nas análises de distribuição de massa de polímeros via SEC são do tipo polinomial (mais comumente de terceira ordem)⁹². A curva de calibração obtida $\text{Log } M_w = 0,00021109X^3 - 0,03370649X^2 + 1,62437664X + 16,85697653$ é apresentada na Figura 10.

Figura 10. Curva de calibração utilizada para a análise de distribuição de massas das dextrans nos açúcares e nos precipitados das aguardentes adoçadas.

Os valores de precisão e recuperação da metodologia cromatográfica utilizada foram avaliados pela realização de 10 injeções consecutivas de dois padrões de dextrans com M_w 273.000 (Waters) e 5.500.000 (American Polymer). Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4. Avaliação da precisão e da recuperação da metodologia utilizada nas análises de distribuição de massa molar das dextranas presentes nas amostras de açúcar e nos depósitos das aguardentes.

M_w do padrão utilizado	M_w determinada (n= 10)	Precisão (CV %) $CV = \left(\frac{S}{\bar{x}}\right) \times 100$	Recuperação (%) $E = \left[1 - \left(\frac{Vr - Vd}{Vr}\right)\right] \times 100$
273.000	256.212	5,4	93,85
5.500.000	5.374.682	3,3	97,72

Onde: n = média de 10 injeções; CV = Coeficiente de variação; S = desvio padrão; $\bar{x}$ = média aritmética; Vr = valor real; Vd = valor determinado.

3.4.3 Preparo e análise das soluções modelo (aguardente-dextrana)

Para a construção dos modelos aguardente-dextrana, foram utilizadas dextranas com os seguintes valores de M_w: 40.000 Da Carl Roth (Karlsruhe, Alemanha), 500.000 Da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA), 2.100.000 Da Pharmacosmos (Holbaek, Dinamarca), 5.500.000 Da American Polymer Standards. Estas dextranas foram escolhidas em função dos resultados obtidos para o perfil de distribuição de massa no açúcar brasileiro apresentado e discutido no capítulo resultados e discussão desta tese.

Cada uma das soluções modelo foi preparada com uma concentração de dextranas de 500 mg/L de acordo com o seguinte procedimento: Preparou-se soluções estoque individuais (20.000 mg/L) de cada padrão de dextranas em água tipo Milli-Q. Utilizando-se de uma bureta 38,5 mL de cada solução estoque foram adicionados a 1.500 mL da aguardente base, a qual teve o seu teor alcoólico

previamente reduzido pela adição de água para 41,0% v/v, assim a concentração alcoólica final de cada modelo foi de 40,0% v/v.

Os frascos de vidro contendo 125 mL destas soluções foram mantidos na ausência de luz em banhos termostatizados nas temperaturas de 15, 25 e 35 °C. A formação dos depósitos de dextranas foi acompanhada ao longo do tempo pelo monitoramento da turbidez destas soluções as quais foram comparadas como o valor de turbidez inicial das mesmas e pela quantificação via SEC da massa remanescente de dextranas solúveis (método do padrão externo, vide curvas de calibração no apêndice C).

Nos sistemas modelo destinados aos estudos da influência dos metais Ca, Mg, Cu e Fe na formação dos depósitos de dextranas, as soluções modelo aguardente-dextrana foram fortificadas pela adição de padrões 1.000 mg/L destes metais.

A avaliação da ocorrência da coprecipitação dos metais Ca, Mg, Cu e Fe com as dextranas e neste caso da sua influência na aceleração deste processo foi avaliada pela quantificação destes metais em solução e pela massa de dextranas precipitadas ao longo do tempo nos modelos fortificados e não fortificados.

A separação das dextranas precipitadas ocorreu por filtração em membranas de éster de celulose (Millipore – poros de 0,45 µm x 25 mm Ø). A eficiência deste procedimento é discutida nos resultados e discussão desta tese.

As análises dos metais remanescentes em solução ao longo do período de observação foram realizadas via ICP-OES através do procedimento desenvolvido pelo LDQA⁶⁸ observando as seguintes condições operacionais: detecção na configuração axial, potência de radiofrequência 1300W, fluxo de argônio no nebulizador 0,80 L/min, fluxo de argônio no plasma 15 L/min, fluxo de argônio de

resfriamento 0,50 L/min, fluxo da amostra 1,0 mL/min. As quantificações foram realizadas pelo método do padrão externo (Tabela 5).

Tabela 5. Condições analíticas utilizadas na análise dos elementos Ca, Mg, Cu e Fe via ICP-OES.

Elemento	λ (nm)	Faixa de concentração (mg/L)	Coefficiente de correlação mínimo admitido em cada calibração
Cálcio	317,933	1,0 – 25,0	0,9995
Magnésio	279,079	1,0 – 25,0	0,9995
Cobre	324,752	0,5 – 8,0	0,9995
Ferro	238,204	0,5 – 5,0	0,9995

3.5 Métodos quimiométricos

Os valores obtidos para os parâmetros de distribuição de massa (M_w , M_n e M_z), polidispersividade e percentuais relativos das dextranas determinadas nos açúcares constituíram o conjunto de dados multivariados que foram interpretados utilizando-se as técnicas de Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA).

Estas análises visaram testar a eficiência destes parâmetros como discriminantes dos açúcares produzidos nas regiões nordeste e sudeste do Brasil.

Os dados experimentais originais foram pré-processados através da normalização centrada na média, para a posterior construção das matrizes de dados. As análises quimiométricas foram processadas utilizando o programa Minitab Release 14 (*Minitab Inc.*) e o tipo de matriz selecionada para a análise foi o de correlação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Perfil da distribuição de massa molar das dextranas presentes no açúcar brasileiro

As Tabelas 6 e 7 listam os valores de distribuição de massa e de polidispersividade para as dextranas nas amostras de açúcar das regiões nordeste e sudeste do Brasil, safra 2006/2007.

Na elaboração destas tabelas as dextranas determinadas via SEC foram arbitrariamente classificadas em três grupos de acordo com seus valores de M_w : Grupo 1 = dextranas de alta massa molar com $M_w > 1,00 \times 10^6$ Da; Grupo 2 = dextranas de massas molares intermediárias com $1,00 \times 10^6 > M_w > 85,00 \times 10^4$ Da; Grupo 3 = dextranas de baixa massa molar ou clínicas $M_w < 85,00 \times 10^4$ Da.

A adição do termo dextranas clínicas ao grupo 3 ocorreu, pois dextranas com M_w de $40,00 \times 10^3$ e $70,00 \times 10^3$ Da são amplamente utilizadas na indústria farmacêutica sendo assim frequentemente denominadas na literatura⁶⁷.

Os valores de M_w foram escolhidos como base classificatória, devido o mesmo ser um dos parâmetros mais usados para a designação de polímeros não se restringindo-se apenas as dextranas, uma vez que este parâmetro representa a massa da maioria das cadeias do polímero^{27,47,51}.

Tabela 6. Valores dos parâmetros de caracterização da distribuição de massa molar em Da e de polidispersividade das dextranas presentes em açúcares da região nordeste do Brasil (safra 2006/2007).

Amostra	Grupo 1				Grupo 2				Grupo 3			
	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n
1	$2,47 \times 10^6$	$3,61 \times 10^6$	$4,44 \times 10^6$	1,46		nd			$1,80 \times 10^4$	$2,19 \times 10^4$	$2,93 \times 10^4$	1,21
2	$3,72 \times 10^6$	$4,45 \times 10^6$	$5,37 \times 10^6$	1,20		nd			$4,82 \times 10^4$	$5,32 \times 10^4$	$5,88 \times 10^4$	1,10
3	$5,35 \times 10^6$	$6,63 \times 10^6$	$7,68 \times 10^6$	1,24	$8,71 \times 10^4$	$1,02 \times 10^5$	$1,21 \times 10^5$	1,17			nd	
4	$3,60 \times 10^6$	$5,08 \times 10^6$	$6,21 \times 10^6$	1,41		nd			$3,69 \times 10^4$	$3,93 \times 10^4$	$4,18 \times 10^4$	1,06
5	$5,22 \times 10^6$	$6,61 \times 10^6$	$7,60 \times 10^6$	1,27	$8,25 \times 10^4$	$9,62 \times 10^4$	$1,13 \times 10^5$	1,17			nd	
6	$4,01 \times 10^6$	$5,92 \times 10^6$	$7,44 \times 10^6$	1,48	$1,01 \times 10^5$	$1,11 \times 10^5$	$1,52 \times 10^5$	1,09			nd	
7	$4,85 \times 10^6$	$6,34 \times 10^6$	$7,52 \times 10^6$	1,31		nd					nd	
8	$4,25 \times 10^6$	$6,00 \times 10^6$	$7,45 \times 10^6$	1,41		nd					nd	
9		nd				nd			$6,30 \times 10^4$	$7,28 \times 10^4$	$8,48 \times 10^4$	1,16
10	$2,89 \times 10^6$	$3,57 \times 10^6$	$4,30 \times 10^6$	1,23		nd			$4,09 \times 10^4$	$4,43 \times 10^4$	$4,84 \times 10^4$	1,08
11	$1,65 \times 10^6$	$2,23 \times 10^6$	$2,85 \times 10^6$	1,35		nd			$2,61 \times 10^4$	$2,78 \times 10^4$	$2,97 \times 10^4$	1,06

Tabela 6. Continuação

Grupo 1					Grupo 2				Grupo 3			
Amostra	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n
12	$3,45 \times 10^6$	$4,99 \times 10^6$	$6,31 \times 10^6$	1,45	nd				$6,80 \times 10^4$	$7,64 \times 10^4$	$8,60 \times 10^4$	1,12
Média	$3,77 \times 10^6$	$5,04 \times 10^6$	$6,11 \times 10^6$	1,34	$9,03 \times 10^4$	$1,03 \times 10^5$	$1,28 \times 10^5$	1,14	$4,30 \times 10^4$	$4,79 \times 10^4$	$5,41 \times 10^4$	1,11
Frequência	91,6 %				25,0 %				58,3 %			

Onde: M_w/M_n = polidispersividade; nd = não detectado; Limite de detecção = 25 mg/L; Frequência = relativa ao percentual em que as dextranas de cada grupo ocorrem para no conjunto de amostras analisado.

Tabela 7. Valores dos parâmetros de caracterização da distribuição de massa molar em Da e de polidispersividade das dextranas presentes em açúcares da região sudeste do Brasil (safra 2006/2007).

	Grupo 1				Grupo 2				Grupo 3			
Amostra	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n
1	$1,12 \times 10^6$	$3,25 \times 10^6$	$6,68 \times 10^6$	2,90		nd			$1,56 \times 10^4$	$2,44 \times 10^4$	$3,92 \times 10^4$	1,57
2	$4,44 \times 10^6$	$6,20 \times 10^6$	$8,55 \times 10^6$	1,40	$3,20 \times 10^5$	$3,49 \times 10^5$	$3,81 \times 10^5$	1,09	$5,20 \times 10^4$	$5,80 \times 10^4$	$6,46 \times 10^4$	1,11
3	$1,94 \times 10^6$	$4,40 \times 10^6$	$6,78 \times 10^6$	2,27		nd			$5,95 \times 10^4$	$6,33 \times 10^4$	$6,71 \times 10^4$	1,06
4	$4,60 \times 10^6$	$5,62 \times 10^6$	$6,80 \times 10^6$	1,22		nd			$2,04 \times 10^4$	$3,24 \times 10^4$	$5,37 \times 10^4$	1,59
5	$4,54 \times 10^6$	$5,60 \times 10^6$	$6,81 \times 10^6$	1,23		nd			$2,00 \times 10^4$	$3,02 \times 10^4$	$4,61 \times 10^4$	1,52
6	$4,13 \times 10^6$	$5,95 \times 10^6$	$8,50 \times 10^6$	1,44		nd			$1,93 \times 10^4$	$2,48 \times 10^4$	$4,25 \times 10^4$	1,29
7	$1,47 \times 10^6$	$3,63 \times 10^6$	$6,36 \times 10^6$	2,46		nd			$5,63 \times 10^4$	$6,18 \times 10^4$	$6,81 \times 10^4$	1,10
8	$5,24 \times 10^6$	$6,03 \times 10^6$	$6,91 \times 10^6$	1,15		nd			$5,29 \times 10^4$	$5,85 \times 10^4$	$6,46 \times 10^4$	1,11
9	$2,52 \times 10^6$	$4,73 \times 10^6$	$6,92 \times 10^6$	1,88		nd			$1,90 \times 10^4$	$3,20 \times 10^4$	$5,18 \times 10^4$	1,69
10	$5,22 \times 10^6$	$6,08 \times 10^6$	$7,05 \times 10^6$	1,16		nd			$5,07 \times 10^4$	$5,92 \times 10^4$	$7,05 \times 10^4$	1,17
11	$5,57 \times 10^6$	$6,08 \times 10^6$	$6,62 \times 10^6$	1,09	$4,81 \times 10^5$	$6,39 \times 10^5$	$8,93 \times 10^5$	1,33	$5,21 \times 10^4$	$5,79 \times 10^4$	$6,41 \times 10^4$	1,11
12	$3,40 \times 10^6$	$6,08 \times 10^6$	$1,00 \times 10^7$	1,79		nd			$5,73 \times 10^4$	$6,16 \times 10^4$	$6,60 \times 10^4$	1,07

Tabela 7. Continuação

Amostra	Grupo 1				Grupo 2				Grupo 3			
	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n
13	$2,49 \times 10^6$	$4,24 \times 10^6$	$5,89 \times 10^6$	1,70		nd			$7,64 \times 10^4$	$8,10 \times 10^4$	$9,62 \times 10^4$	1,06
14	$4,94 \times 10^6$	$6,07 \times 10^6$	$7,44 \times 10^6$	1,23		nd			$5,20 \times 10^4$	$5,86 \times 10^4$	$6,58 \times 10^4$	1,13
15	$1,16 \times 10^6$	$3,23 \times 10^6$	$6,12 \times 10^6$	2,78		nd			$1,18 \times 10^4$	$1,94 \times 10^4$	$2,75 \times 10^4$	1,65
16	$2,67 \times 10^6$	$3,91 \times 10^6$	$5,37 \times 10^6$	1,46		nd			$5,35 \times 10^4$	$6,13 \times 10^4$	$7,06 \times 10^4$	1,15
17	$4,87 \times 10^6$	$5,76 \times 10^6$	$6,77 \times 10^6$	1,18	$3,55 \times 10^5$	$4,23 \times 10^5$	$5,01 \times 10^5$	1,19	$2,95 \times 10^4$	$3,83 \times 10^4$	$4,06 \times 10^4$	1,30
18	$4,75 \times 10^6$	$6,08 \times 10^6$	$7,71 \times 10^6$	1,28		nd			$5,35 \times 10^4$	$6,12 \times 10^4$	$6,56 \times 10^4$	1,14
19	$2,04 \times 10^6$	$5,22 \times 10^6$	$1,19 \times 10^7$	2,56	$1,12 \times 10^5$	$1,22 \times 10^5$	$1,98 \times 10^5$	1,09		nd		
20	$4,67 \times 10^6$	$5,75 \times 10^6$	$7,03 \times 10^6$	1,23		nd				nd		
21	$1,58 \times 10^6$	$3,90 \times 10^6$	$6,75 \times 10^6$	2,47		dd			$5,60 \times 10^4$	$6,09 \times 10^4$	$6,62 \times 10^4$	1,09
22	$1,43 \times 10^6$	$3,70 \times 10^6$	$6,65 \times 10^6$	2,59		nd			$1,62 \times 10^4$	$2,45 \times 10^4$	$3,82 \times 10^4$	1,51
23	$2,89 \times 10^6$	$4,24 \times 10^6$	$5,96 \times 10^6$	1,47	$8,93 \times 10^4$	$9,58 \times 10^4$	$1,03 \times 10^5$	1,07		nd		
24	$3,49 \times 10^6$	$5,10 \times 10^6$	$7,06 \times 10^6$	1,46		nd			$3,77 \times 10^4$	$4,86 \times 10^4$	$6,01 \times 10^4$	1,29

Tabela 7. Continuação

	Grupo 1				Grupo 2				Grupo 3			
Amostra	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n
25	$3,64 \times 10^6$	$5,01 \times 10^6$	$6,52 \times 10^6$	1,38	nd				$5,65 \times 10^4$	$6,19 \times 10^4$	$6,80 \times 10^4$	1,10
Média	$3,39 \times 10^6$	$5,03 \times 10^6$	$7,17 \times 10^6$	1,48	$2,72 \times 10^5$	$3,26 \times 10^5$	$4,15 \times 10^5$	1,19	$4,17 \times 10^4$	$4,91 \times 10^4$	$5,90 \times 10^4$	1,17
Frequência	100,0 %				20,0 %				88,0 %			

Onde: M_w/M_n = polidispersividade; nd = não detectado; Limite de detecção = 25 mg/L; Frequência = relativa ao percentual em que as dextranas de cada grupo ocorrem para no conjunto de amostras analisado.

De acordo os dados das Tabelas 6 e 7, observa-se uma presença predominantemente bimodal em termos de distribuição de massa molar para as dextranas constituintes tanto dos açúcares do nordeste quanto do sudeste brasileiro.

Este padrão corresponde a 83,3% das amostras oriundas do nordeste e a 84,0 % das amostras do sudeste, o que é ilustrado pela figura 11 que apresenta um cromatograma obtido via SEC para uma amostra de açúcar, onde dois picos de dextranas distintos podem ser observados.

Figura 11. Cromatograma por exclusão por tamanho de uma amostra de açúcar. Os picos 1 e 2 correspondem a dextranas com M_w de $4,23 \times 10^6$ e $8,10 \times 10^4$ Da respectivamente. O pico 3 corresponde sacarose residual e correspondendo ao volume permeado total na corrida cromatográfica.

A presença de uma única dextrana foi somente observada em duas amostras do nordeste (amostra 8 - tipo 1 e amostra 9 - tipo 3), e em apenas uma da região sudeste (amostra 20 - tipo 1). Já a presença de dextranas com três distintas distribuições de massa molar só foi claramente observada em três amostras do sudeste (2, 11, 17).

De acordo com a literatura, diversas bactérias podem produzir dextranas com diferentes distribuições de massa molar²⁴. No entanto as dextranas do grupo 1 e 3 são tipicamente formadas pela ação da bactéria *Leuconostoc mesenteroides*^{69,70} que é largamente disseminada nas plantações de cana-de-açúcar^{36,37}. Brawn e Inkerman (1992)⁶⁹ relataram valores M_w da ordem de 5×10^6 Da para dextranas isoladas de caldos de cana e de açúcares não refinados.

Também neste sentido Saska e Oubrahim (1987)⁷¹ descreveram através de separações via SEC um padrão de duas frações de dextranas em melaços e açúcares de cana produzidos na região da Louisiana (USA). A primeira destas frações composta por dextranas de $M_w > 1 \times 10^6$ Da e a segunda constituída por uma mistura de dextranas com M_w inferiores a 1×10^5 Da e por outros componentes não dextranicos.

Sobre a composição mista da fração de baixa M_w reportada por Saska e Oubrahim, uma provável causa para obtenção deste resultado, foi o emprego de apenas uma única coluna de SEC. Diferentemente do trabalho aqui apresentado que utilizou um arranjo de três colunas de SEC conectadas em série, sendo a coluna terminal deste arranjo específica para análises de polímeros com M_w até 5×10^4 Da.

Uma explicação para a menor frequência de observação das dextranas que compõem o grupo 2 (21,6 % das 37 amostras analisadas da safra 2006/2007), pode estar relacionada com as características do mecanismo de formação das dextranas com M_w maiores que 10^6 Da (grupo 1).

Segundo a literatura estas dextranas são na realidade agregados de grande estabilidade^h constituídos de outras dextranas com M_w entre 10^4 e 5×10^5 Da. Tais agregados são rapidamente formados através da ação da enzima dextrana-sacarase

^h Segundo a literatura esta estabilidade é conferida devido à conformação de uma fita helicoidal assumida pelas moléculas de dextranas⁷³.

do *Leuconostoc mesenteroides*^{72,73}. Assim, as dextranas do grupo 2 seriam partes não agrupadas que comporiam moléculas maiores, onde o número de moléculas não agrupadas é influenciado pela concentração da enzima presente no meio e também pelas características físico-químicas do mesmo como temperatura, pH, concentração de sacarose^{27,70,74,75}.

Outra razão para a menor frequência das dextranas do grupo 2, reside no fato destas poderem ter sido produzidas por diferentes espécies de *Leuconostoc* e por outras bactérias como *Lactobacillus* que embora menos disseminadas também pode estar presentes nas plantações e cana^{38,76}. Desta forma o mais provável é que estes dois fatores em conjunto sejam a razão da baixa frequência, e da ampla distribuição de massa das dextranas classificadas no grupo 2.

O comportamento decrescente dos valores médios de polidispersividade determinados para as dextranas do grupo 1 até o grupo 3 (mesma sequência para as amostras do nordeste e sudeste) é coerente. Segundo a literatura é tendência geral que o número de ramificações das dextranas tende a diminuir simultaneamente com a redução da massa molar das dextranas^{52,77}.

Contudo dextranas com M_w da mesma ordem de grandeza podem ter seu número de ramificações elevado, com o aumento da temperatura no meio em que a mesma esteja sendo sintetizada⁷⁸. Desta maneira diferenças nos valores do índice de polidispersividade encontrados, como por exemplo, para dextranas do grupo 1 das amostras 17 e 19 da Tabela 6 são admissíveis.

Na Tabela 8 encontram-se listados os valores de distribuição de massa e de polidispersividade para dextranas em açúcares produzidos em 10 usinas das principais regiões produtoras do sudeste brasileiro durante 4 safras consecutivas.

Tabela 8. Valores dos parâmetros de caracterização da distribuição de massa molar em Da e de polidispersividade das dextranas presentes em açúcares originados de 10 usinas da região sudeste do Brasil, monitoradas durante 4 safras consecutivas (97/98 – 00/01).

	Grupo 1				Grupo 2				Grupo 3			
Amostra (safra)	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n
1 (97/98)	$2,51 \times 10^6$	$4,45 \times 10^6$	$6,73 \times 10^6$	1.78		nd			$7,25 \times 10^4$	$7,74 \times 10^4$	$9,36 \times 10^4$	1.07
2 (98/99)	$2,29 \times 10^6$	$4,09 \times 10^6$	$6,20 \times 10^6$	1.79		nd			$5,83 \times 10^4$	$6,48 \times 10^4$	$7,20 \times 10^4$	1.11
3 (99/00)	$1,75 \times 10^6$	$3,57 \times 10^6$	$5,49 \times 10^6$	2.04		nd			$6,25 \times 10^4$	$6,92 \times 10^4$	$7,68 \times 10^4$	1.11
4 (00/01)	$2,87 \times 10^6$	$3,58 \times 10^6$	$4,27 \times 10^6$	1.25		nd			$3,78 \times 10^4$	$4,11 \times 10^4$	$4,47 \times 10^4$	1.09
5 (97/98)	$3,56 \times 10^6$	$5,64 \times 10^6$	$7,05 \times 10^6$	1.58		nd				nd		
6 (98/99)	$2,48 \times 10^6$	$3,84 \times 10^6$	$6,67 \times 10^6$	1.55		nd			$7,61 \times 10^4$	$8,29 \times 10^4$	$9,03 \times 10^4$	1.09
7 (99/00)	$1,90 \times 10^6$	$3,48 \times 10^6$	$5,35 \times 10^6$	1.83		nd			$7,56 \times 10^4$	$8,14 \times 10^4$	$8,78 \times 10^4$	1.08
8 (00/01)	$1,64 \times 10^6$	$3,07 \times 10^6$	$4,83 \times 10^6$	1.88		nd			$6,35 \times 10^4$	$6,79 \times 10^4$	$7,28 \times 10^4$	1.07
9 (97/98)	$2,04 \times 10^6$	$4,18 \times 10^6$	$6,71 \times 10^6$	2.04		nd			$7,52 \times 10^4$	$8,33 \times 10^4$	$9,23 \times 10^4$	1.11
10 (98/99)	$5,71 \times 10^6$	$6,04 \times 10^6$	$6,80 \times 10^6$	1.06		nd			$7,48 \times 10^4$	$8,01 \times 10^4$	$8,60 \times 10^4$	1.07
11 (99/00)		nd				nd				nd		

Tabela 8. Continuação

Amostra (safra)	Grupo 1				Grupo 2				Grupo 3			
	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n
12 (00/01)	$2,99 \times 10^6$	$5,01 \times 10^6$	$7,24 \times 10^6$	1.67	$1,46 \times 10^5$	$1,55 \times 10^5$	$1,65 \times 10^5$	1.06		nd		
13 (97/98)	$2,47 \times 10^6$	$4,38 \times 10^6$	$6,59 \times 10^6$	1.77	$7,82 \times 10^4$	$8,58 \times 10^4$	$1,06 \times 10^5$	1.10		nd		
14 (98/99)	$2,49 \times 10^6$	$4,49 \times 10^6$	$6,85 \times 10^6$	1.80		nd			$2,35 \times 10^4$	$3,48 \times 10^4$	$5,62 \times 10^4$	1.48
15 (99/00)		nd				nd				nd		
16 (00/01)	$2,95 \times 10^6$	$4,96 \times 10^6$	$7,18 \times 10^6$	1.68	$9,11 \times 10^4$	$9,70 \times 10^4$	$1,03 \times 10^5$	1.06		nd		
17 (97/98)	$2,75 \times 10^6$	$4,75 \times 10^6$	$7,03 \times 10^6$	1.73		nd			$4,62 \times 10^4$	$4,95 \times 10^4$	$5,55 \times 10^4$	1.07
18 (98/99)	$2,75 \times 10^6$	$4,80 \times 10^6$	$7,18 \times 10^6$	1.75	$4,41 \times 10^5$	$4,85 \times 10^5$	$5,35 \times 10^5$	1.10		nd		
19 (99/00)	$3,62 \times 10^6$	$4,03 \times 10^6$	$6,83 \times 10^6$	1.11		nd			$7,47 \times 10^4$	$8,21 \times 10^4$	$9,11 \times 10^4$	1.10
20 (00/01)		nd				nd			$6,74 \times 10^4$	$7,44 \times 10^4$	$8,52 \times 10^4$	1.10
21 (97/98)	$4,77 \times 10^6$	$5,04 \times 10^6$	$4,48 \times 10^6$	1.06	$8,90 \times 10^4$	$1,06 \times 10^5$	$1,27 \times 10^5$	1.19		nd		
22 (98/99)	$2,61 \times 10^6$	$4,62 \times 10^6$	$6,96 \times 10^6$	1.77	$1,05 \times 10^5$	$1,14 \times 10^5$	$1,22 \times 10^5$	1.08		nd		
23 (99/00)	$5,58 \times 10^6$	$6,50 \times 10^6$	$1,57 \times 10^6$	1.17		nd				nd		

Tabela 8. Continuação

Amostra (safra)	Grupo 1				Grupo 2				Grupo 3			
	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n
24 (00/01)	$1,85 \times 10^6$	$3,73 \times 10^6$	$6,06 \times 10^6$	2.02		nd			$2,35 \times 10^4$	$3,67 \times 10^4$	$6,29 \times 10^4$	1.56
25 (97/98)	$2,65 \times 10^6$	$4,66 \times 10^6$	$6,97 \times 10^6$	1.76	$7,78 \times 10^4$	$1,00 \times 10^5$	$1,36 \times 10^5$	1.29		nd		
26 (98/99)	$2,36 \times 10^6$	$4,40 \times 10^6$	$6,81 \times 10^6$	1.87		nd			$7,46 \times 10^4$	$8,23 \times 10^4$	$9,13 \times 10^4$	1.10
27 (99/00)	$2,85 \times 10^6$	$4,66 \times 10^6$	$6,56 \times 10^6$	1.63		nd			$5,04 \times 10^4$	$6,10 \times 10^4$	$7,79 \times 10^4$	1.21
28 (00/01)	$3,01 \times 10^6$	$5,03 \times 10^6$	$7,28 \times 10^6$	1.67		nd			$3,58 \times 10^4$	$4,50 \times 10^4$	$5,57 \times 10^4$	1.26
29 (97/98)	$3,32 \times 10^6$	$3,78 \times 10^6$	$4,26 \times 10^6$	1.14		nd			$5,67 \times 10^4$	$6,14 \times 10^4$	$6,63 \times 10^4$	1.08
30 (98/99)	$3,42 \times 10^6$	$5,50 \times 10^6$	$7,69 \times 10^6$	1.61	$5,21 \times 10^5$	$6,29 \times 10^5$	$7,46 \times 10^5$	1.21	$2,61 \times 10^4$	$2,96 \times 10^4$	$3,35 \times 10^4$	1.13
31 (99/00)		nd				nd				nd		
32 (00/01)	$2,37 \times 10^6$	$4,18 \times 10^6$	$6,28 \times 10^6$	1.76		nd			$7,08 \times 10^4$	$7,80 \times 10^4$	$8,58 \times 10^4$	1.10
33 (97/98)	$4,38 \times 10^6$	$5,81 \times 10^6$	$4,82 \times 10^6$	1.33		nd			$5,37 \times 10^4$	$5,95 \times 10^4$	$6,59 \times 10^4$	1.11
34 (98/99)	$2,62 \times 10^6$	$4,48 \times 10^6$	$6,59 \times 10^6$	1.71		nd			$6,88 \times 10^4$	$7,34 \times 10^4$	$7,82 \times 10^4$	1.07
35 (99/00)	$2,52 \times 10^6$	$4,39 \times 10^6$	$6,57 \times 10^6$	1.75		nd			$5,03 \times 10^4$	$5,65 \times 10^4$	$6,56 \times 10^4$	1.12

Tabela 8. Continuação

	Grupo 1				Grupo 2				Grupo 3			
Amostra (safra)	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n
36 (00/01)	$1,75 \times 10^6$	$4,06 \times 10^6$	$7,01 \times 10^6$	2.32	$9,75 \times 10^4$	$1,06 \times 10^5$	$1,15 \times 10^5$	1.09				nd
37 (97/98)	$3,67 \times 10^6$	$5,88 \times 10^6$	$6,51 \times 10^6$	1.60		nd			$7,08 \times 10^4$	$8,39 \times 10^4$	$9,92 \times 10^4$	1.18
38 (98/99)	$4,96 \times 10^6$	$6,03 \times 10^6$	$6,56 \times 10^6$	1.22		nd			$7,02 \times 10^4$	$7,85 \times 10^4$	$8,76 \times 10^4$	1.12
39 (99/00)	$1,76 \times 10^6$	$3,75 \times 10^6$	$6,27 \times 10^6$	2.12		nd			$5,63 \times 10^4$	$6,42 \times 10^4$	$7,29 \times 10^4$	1.14
40 (00/01)	$2,72 \times 10^6$	$4,77 \times 10^6$	$7,16 \times 10^6$	1.75		nd			$7,12 \times 10^4$	$7,96 \times 10^4$	$8,89 \times 10^4$	1.12
Média	$2,94 \times 10^6$	$4,60 \times 10^6$	$6,26 \times 10^6$	1,56	$1,83 \times 10^5$	$2,09 \times 10^5$	$2,39 \times 10^5$	1,14	$5,88 \times 10^4$	$6,59 \times 10^4$	$7,54 \times 10^4$	1,12
Frequência		90,0 %				22,5 %				67,5 %		

Onde: Amostras 1 – 4 correspondem à usina 1; 5 – 8 usina 2; 9 – 12 usina 3; 13 – 16 usina 4; 17 – 20 usina 5; 21 – 24 usina 6; 25 – 28 usina 7; 29 – 32 usina 8; 33 – 36 usina 9; 37 – 40 usina 10. M_w/M_n = polidispersividade; nd = não detectado; Limite de detecção = 25 mg/L.

Com base nos dados da Tabela 8, o padrão de duas dextranas com distribuições de massa molares distintas (83,3 % e 84,4% respectivamente para das amostras das regiões nordeste e sudeste) observado nos açúcares da safra 2006/2007 foi mantido. De forma geral ao longo das 4 safras em 82,5 % dos açúcares (33 amostras) foram observadas duas dextranas distintas. Em termos anuais esse padrão bimodal foi de: 90% para as safras 97/98, 98/99, 00/01 e de 60 % para a safra 99/00.

Em 7,5 % das amostras (11, 15, 31) não foi detectada a presença de dextranas, contudo estas amostras não pertenciam à mesma usina, o que nos impede de realizarmos qualquer inferência sobre um possível procedimento sistemático como o uso de dextranases para o seu controle.

Apenas em uma amostra (30) foi possível observar claramente 3 distribuições de massa molar distintas para as dextranas. Em outros 7,5% das amostras (5, 20 e 23) apenas uma dextrana foi detectada.

Com relação às proporções relativas das dextranas presentes nas amostras apresentados na Tabela 8, estes valores foram determinados pela de curva cumulativa das dextranas obtidas via SEC para as amostras de açúcar por intermédio do software GPC for Class-Vp 1.02 (Apêndice D).

Tabela 9. Percentuais relativos obtidos por meio das curvas cumulativas para as dextranas presentes nas amostras de açúcar via SEC.

Dextrana Amostra	Região Nordeste			Região Sudeste			Usinas monitoradas		
	Proporções relativas (%)			Proporções relativas (%)			Proporções relativas (%)		
	Safra 2006/2007			Safra 2006/2007			Safra 97/98 – 00/01		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
1	88,6	-	11,5	54,6	-	45,4	45,9	-	54,1
2	35,4	-	64,6	54,3	32,4	13,4	75,3	-	24,7
3	81,8	18,2	-	92,6	-	7,4	85,5	-	14,4
4	98,4	-	1,6	19,5	-	80,5	85,1	-	14,9
5	96,9	3,1	-	33,5	-	66,5	100,0	-	
6	89,5	10,5	-	16,4	-	83,6	94,0	-	6,0
7	100,0	-	-	65,3	-	34,8	70,4	-	29,6
8	100,0	-	-	41,0	-	59,0	70,0	-	30,0
9	-	-	100,0	82,8	-	17,2	88,2	-	11,8
10	65,4	-	34,6	26,8	-	73,2	94,2	-	5,8
11	66,7	-	33,3	31,5	25,3	43,3	-	-	-

Tabela 9. Continuação

Dextrana Amostra	Região Nordeste			Região Sudeste			Usinas monitoradas		
	Proporções relativas (%)			Proporções relativas (%)			Proporções relativas (%)		
	Safrá 2006/2007			Safrá 2006/2007			Safrá 97/98 – 00/01		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
12	46,0	-	54,0	100,0	-	-	29,0	71,0	-
13				83,9	-	16,1	82,1	17,9	-
14				35,0	-	65,0	45,8	-	54,2
15				15,5	-	84,5	-	-	-
16				45,3	-	54,7	17,3	82,8	-
17				43,1	21,4	35,7	51,0	-	49,0
18				19,2	-	80,8	59,5	40,5	-
19				62,7	37,3	-	95,8	-	4,2
20				100,0	-	-	-	-	100,0
21				70,7	-	29,3	36,5	63,5	-
22				62,1	-	37,9	53,6	46,4	-

Tabela 9. Continuação

	Região Nordeste			Região Sudeste			Usinas monitoradas		
	Proporções relativas (%)			Proporções relativas (%)			Proporções relativas (%)		
	Safra 2006/2007			Safra 2006/2007			Safra 97/98 – 00/01		
Dextrana	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Amostra									
24				42,7	-	57,3	70,2	-	29,8
25				52,7	-	47,3	75,4	24,6	-
26							89,8	-	10,2
27							35,4	-	64,7
28							28,7	-	71,3
29							31,0	-	69,0
30							4,1	13,2	82,7
31							-	-	-
32							62,1	-	37,9
33							62,2	-	37,8

Tabela 9. Continuação

	Região Nordeste			Região Sudeste			Usinas monitoradas		
	Proporções relativas (%)			Proporções relativas (%)			Proporções relativas (%)		
	Safra 2006/2007			Safra 2006/2007			Safra 97/98 – 00/01		
Dextrana	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Amostra									
34							77,4	-	22,7
35							70,5	-	29,5
36							70,1	29,8	-
37							90,1	-	9,9
38							94,0	-	6,0
39							71,5	-	28,5
40							50,6	-	49,4

Pela observação dos dados contidos na Tabela 9, as dextranas do grupo 1 correspondem à maior parte das dextranas em 58,4 % dos 77 açúcares analisados (ou seja, mais da metade do conteúdo de dextranas totais pertencendo ao grupo 1).

Em níveis regionais estes valores são de 66,6 % para as amostras da região nordeste e 48,0 % para o sudeste na safra 2006/2007, já nas amostras das usinas monitoradas durante as 4 safras consecutivas têm-se 62,5 % das amostras dextranas do grupo 1 como fração majoritária.

É bem estabelecido pela literatura que dextranas de elevada massa molar ($> 10^6$ Da) são preferencialmente formadas pela fermentação de bactérias como o *Leuconostoc mesenteroides*, sendo inclusive este tipo de dextrana denominado de dextrana nativa²⁷. Industrialmente, sob condições controladas e por meio de cepas de *Leuconostoc* selecionadas são obtidas dextranas com de altíssima massa molar ($> 5 \times 10^7$ e até 10^8 Da)^{28,79}. Isso posto, a prevalência das dextranas classificadas no grupo 1 é coerente.

Com o objetivo de detectarmos uma possível distinção entre as amostras da região nordeste e sudeste, o que seria importante do ponto de vista da rastreabilidade e designação de origem do açúcar, foram realizadas análises quimiométricas exploratórias pelas técnicas de análise de componentes principais (PCA) e análise hierárquica de agrupamento (HCA).

Os descritores utilizados foram os parâmetros de distribuição de massa molar, M_n , M_w e M_z , o índice de polidispersividade, e os percentuais relativos entre as dextranas detectadas nas amostras analisadas. Infelizmente não foram determinados padrões de similaridade satisfatórios por nenhuma das técnicas quimiométricas aplicadas (Figuras 12A e 12B).

Figura 12. Gráfico de scores (12 A) e de pesos (12 B) obtidos via PCA para todos os descritores analisados nas amostras de açúcar produzidas nas regiões nordeste e sudeste do Brasil.

Essa uniformidade das amostras ficou ainda mais ressaltada pela análise de variância ANOVA (nível de significância de 95%) realizada neste banco de dados, a qual só demonstrou diferenças significativas entre os açúcares do nordeste e sudeste para os valores médios de polidispersividade e de proporção relativa para as amostras do grupo 1.

O mesmo quadro manteve-se ao serem introduzidos no banco de dados os resultados referentes às amostras de açúcar das usinas monitoradas (Figuras 13 A e 13 B). Inclusive quando da reanálise via PCA valendo-se somente os descritores com maior influência na explicação da variância do sistema (Figuras 14 A e 14 B).

Figura 13. Gráfico de scores (13 A) e de pesos (13 B) obtidos via PCA de todos os descritores analisados nas amostras de açúcar originadas do nordeste, do sudeste e das usinas monitoradas.

Figura 14. Gráfico de scores (14 A) e de pesos (14 B) obtidos via PCA para os principais descritores analisados nas amostras de açúcar originadas do nordeste, do sudeste e das usinas monitoradas.

Observando estes resultados, torna-se evidente que o perfil das dextranas no açúcar brasileiro em função de suas distribuições de massa M_n , M_w e M_z e de polidispersividade para as 77 amostras analisadas exibiu um padrão uniforme durante as cinco safras analisadas.

Neste sentido deve-se ressaltar o fato das amostras da última safra analisada apresentar um intervalo de cinco anos das suas amostras antecessoras e de ainda terem sido oriundas de duas regiões distintas do país. Portanto é provável que este perfil qualitativo não apresente alterações significativas ao longo das próximas safras.

Nas 5 amostras de açúcar cedidas por produtores de aguardente ao LDQA, as distribuições de massa das dextranas presentes nas mesmas, mostraram-se compatíveis com o perfil até então aqui discutido. As dextranas classificadas no grupo 1 foram detectadas em 4 destes açúcares (80%), as dos grupos 2 e 3 respectivamente em 2 e 4 amostras (40 e 80%). A tabela 10 mostra os valores médios para cada parâmetro de distribuição de massa para as dextranas nestes 5 açúcares.

Tabela 10. Valores médios para os parâmetros de distribuição de massa das dextranas nas amostras de açúcares cedidas por 5 produtores de aguardentes.

Parâmetro	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
M_n	$3,13 \times 10^6$	$2,02 \times 10^5$	$4,93 \times 10^4$
M_w	$4,29 \times 10^6$	$2,45 \times 10^5$	$5,42 \times 10^4$
M_z	$5,69 \times 10^6$	$2,87 \times 10^6$	$6,12 \times 10^4$
Polidispersividade (M_w / M_n)	1,37	1,21	1,09

4.2 Distribuição de massa molar das dextranas precipitadas em aguardentes de cana adoçadas

Conforme exposto anteriormente, a formação de precipitados em aguardentes é um problema constante para as aguardentes adoçadas. A tabela 11 apresenta os valores de distribuição de massa molar de dextranas naturalmente precipitadas em aguardentes destiladas em colunas originadas de grandes centros produtores do Brasil, com diferentes tempos de envase.

Tabela 11. Valores dos parâmetros de caracterização da distribuição de massa molar em Da e de polidispersividade das dextranas presentes nos depósitos formados em aguardentes de cana adoçadas.

Amostra*	Dextranas (10^6 Da)				Dextranas (10^5 Da)				Dextranas (10^4 Da)			
	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n
1									$3,40 \times 10^4$	$3,53 \times 10^4$	$3,92 \times 10^4$	1,04
2	$1,48 \times 10^6$	$1,60 \times 10^6$	$1,72 \times 10^6$	1,08								
3	$4,98 \times 10^6$	$5,79 \times 10^6$	$6,63 \times 10^6$	1,16	$2,78 \times 10^5$	$3,80 \times 10^5$	$4,75 \times 10^5$	1,36				
4					$6,36 \times 10^5$	$8,13 \times 10^5$	$1,03 \times 10^6$	1,28				
5					$7,50 \times 10^4$	$1,79 \times 10^5$	$3,48 \times 10^5$	2,38				
6					$5,19 \times 10^5$	$6,54 \times 10^5$	$7,94 \times 10^5$	1,26				
7									$1,96 \times 10^4$	$2,14 \times 10^4$	$2,37 \times 10^4$	1,09
8	$1,25 \times 10^6$	$1,99 \times 10^6$	$2,90 \times 10^6$	1,58								
9					$1,88 \times 10^5$	$1,95 \times 10^5$	$2,03 \times 10^5$	1,04				
10					$1,40 \times 10^5$	$1,49 \times 10^5$	$1,60 \times 10^5$	1,06				
11					$4,41 \times 10^5$	$4,85 \times 10^5$	$5,35 \times 10^5$	1,10				
12									$2,35 \times 10^4$	$3,67 \times 10^4$	$6,29 \times 10^4$	1,56

* Tempo de envase aproximado: Amostras 8 (6 meses – 1 ano); 2, 3, 4, 6, 11, 12 (1 – 2 anos); 1, 5, 9 (2 – 3 anos); 7, 10 (mais de 3 anos).

Diversos são os fatores como tempo de envase, temperatura, concentração hidrogeniônica que podem ter influenciado para a precipitação das dextranas nas amostras de aguardente analisadas. Porém, a insolubilidade das dextranas em etanol é certamente o fator preponderante para a formação destes depósitos.

É bem estabelecido que a solubilidade das dextranas em soluções hidroalcoólicas é altamente dependente da sua massa molar^{40,80}, e que mesmo as dextranas de baixa massa molar tornam-se insolúveis com o aumento da concentração de etanol nestas soluções.

Esta característica é inclusive o princípio das duas metodologias mais empregadas para a quantificação de dextranas: O método da “haze”, onde somente as dextranas de média e alta massa ($M_w > 30 \times 10^4$ Da)^{81,82} são precipitadas numa solução contendo 50% de etanol, e o método descrito por Roberts para a quantificação de dextranas de baixa, média e alta massa molar (dextranas totais) após a precipitação das mesmas pela elevação da concentração etanólica do meio em que se encontram para 80%³⁴.

Dados experimentais coletados em nosso Laboratório, para áreas de picos cromatográficos obtidos via SEC para soluções contendo 500 mg/L de dextranas M_w $5,9 \times 10^6$; $4,86 \times 10^4$ e $1,16 \times 10^4$ Da, individualmente presentes em 3 soluções alcoólicas (40,0 % v/v) antes e após as mesmas terem sido filtradas em condições otimizadas, demonstraram que esta operação eliminou no máximo 83,3 % das dextranas de M_w $5,9 \times 10^6$ Da e somente de 5,0 a 12, 1 % das demais dextranas (respectivamente M_w $1,16 \times 10^4$ e $4,86 \times 10^4$ Da).

Em outras palavras se estas dextranas estivessem presentes na mesma solução, menos de 50% do conteúdo total de dextranas seria retido. As condições experimentais de filtração envolveram a manutenção das soluções a 4 °C por 24

horas, seguida da filtração das mesmas em membranas com diâmetro de poro de 0,45 μm .

Em conformidade com o descrito anteriormente¹⁵ na página 29, e devido a concentração de etanol na cachaça ser normalmente de 40% v/v, não é surpresa a presença das dextranas de altas e médias massas molares (grupos 1 e 2) nos precipitados analisados. Estas constatações tornam-se ainda mais substanciais ao levarmos em conta que o processo de filtração descrito acima é bem mais rigoroso que os procedimentos realizados pela maioria dos produtores.

4.3 Formação de precipitados de dextranas em soluções modelo

A opção do uso de uma aguardente em detrimento das soluções hidroalcoólicas 40% v/v para a construção dos sistemas modelo usados no acompanhamento da formação dos precipitados de dextranas foi dotar o estudo das maiores condições de representatividade e realidade possíveis.

Foi utilizada como base para preparo dos sistemas modelo aguardente-dextrana, uma aguardente industrial destilada em coluna (safra 2008), não adoçada e com teor alcoólico de 47,8% v/v. Esta aguardente foi doada ao LDQA por um dos maiores produtores do país, apresentando-se em concordância com os padrões de identidade e qualidade estabelecidos para comercialização de aguardentes de cana estabelecidos pelo MAPA.

A opção de se utilizar uma aguardente destilada em coluna foi realizada em função das aguardentes assim produzidas serem as mais frequentemente adoçadas e normalmente apresentarem concentrações de sacarose superiores a 6 g/L.

Conforme descrito no item 3.4.3, durante o preparo das soluções modelo aguardente-dextranas a concentração etílica da aguardente base foi reduzida e as soluções modelo preparadas apresentaram 40,0% de etanol v/v devido este ser o teor alcoólico em que a aguardente brasileira é mais frequentemente comercializada.

A acidez total das soluções modelo preparadas a partir da aguardente base com os padrões de dextranas de diferentes distribuições de massa foi de 29,48 mg de ácido acético/100mL álcool anidro determinada de acordo com a metodologia oficial adotada pelo MAPA⁹³. Este valor teve a sua representatividade avaliada por comparação com a acidez total determinada para outras 20 aguardentes também destiladas em colunas originadas dos principais estados produtores do Brasil (Tabela 12).

Tabela 12. Valores de acidez total titulável (mg CH₃COOH/100mL A.A.) determinados em aguardentes de cana não envelhecidas destiladas em colunas.

Amostra	Ac. total	Amostra	Ac. total	Amostra	Ac. total	Amostra	Ac. total
1	43,62	6	19,55	11	6,919	16	58,36
2	73,70	7	67,68	12	24,06	17	45,12
3	18,05	8	37,60	13	25,57	18	30,08
4	46,63	9	66,18	14	31,58	19	33,09
5	16,54	10	7,520	15	21,05	20	63,17

A partir dos dados da Tabela 12 verificou-se que os valores da acidez total média e mediana para as cachaças de coluna foram respectivamente de 36,80 e 32,33 mg de CH₃COOH/100mL A.A. Desta maneira a acidez total de 29,48 mg de

CH₃COOH/100mL de A.A. exibida pelos sistemas modelo preparados apresentou-se em níveis representativos dos valores exibidos aguardentes destiladas em colunas comercializadas no mercado brasileiro, o que também foi corroborado por outros dados disponíveis na literatura^{68,94}.

Para avaliar a formação dos precipitados de dextranas em função da temperatura e da suas distribuições de massa molar, foram preparados sistemas modelo aguardente-dextrana individuais para cada valor de M_w avaliado ($5,5 \times 10^6$; $2,1 \times 10^6$; $5,0 \times 10^5$ e $4,0 \times 10^4$ Da). A escolha destes padrões levou em conta os valores médios observados no perfil de distribuição de massa molar do açúcar brasileiro determinado neste trabalho.

A separação das dextranas precipitadas nestas soluções modelo para a posterior quantificação das dextranas que ainda permaneciam em solução foi realizada por meio da filtração das soluções modelos em membranas de éster de celulose com diâmetros de poros de 0,45 μ m.

Com o intuito de assegurar a eficiência destas membranas na retenção de dextranas de diferentes distribuições de massa que compunham os modelos realizou-se a precipitação isolada de cada um dos padrões e procedeu-se a análise por MEV neste material.

O procedimento de precipitação foi executado isoladamente para cada padrão da seguinte maneira: dissolução de 0,10 g da dextrana a ser testada pela adição de 20 mL de água a 50 °C (para facilitar a sua dissolução); adição de 80 mL de etanol anidro para a completa precipitação das dextranas. Após 24 horas evaporou-se a fase líquida até a secura por rotoevaporação a pressão reduzida e seguindo-se da coleta do resíduo sólido para análise via MEV.

Conforme ilustrado na Figuras 15 A, 15 B, 15 C e 15 D, todos os padrões testados apresentaram partículas com diâmetros superiores a 1 μm . Estes resultados apresentam-se em concordância com dados da literatura, onde Stenekes, Talsma e Hennink (2001)⁸⁴, ao avaliarem a formação de precipitados de dextranas (M_w 6,0 x 10³ Da) em soluções aquosas para uso farmacêutico, demonstraram que mais de 95% das partículas formadas apresentavam diâmetros superiores a 5 μm .

Figura 15. Micrografia de grânulos dos padrões de dextranas utilizados para compor os sistemas modelos monitorados.

As Figuras 16, 17 e 18 e as Tabelas 13, 14 e 15 retratam a influência da temperatura na formação dos depósitos de dextranas nos sistemas modelo. A turbidez e as concentrações de dextranas em solução e precipitadasⁱ nos sistemas aguardente-dextrana foram utilizadas como indicadores da evolução de formação de precipitados.

Figura 16. Turbidez dos sistemas aguardente-dextrana mantidos ao longo do tempo a 15 °C.

Com relação às variações de turbidez apresentadas na figura acima, observa-se que a evolução da turbidez modelo é função das massas molares das dextranas utilizadas no diferentes sistemas aguardente-dextrana.

O sistema composto por dextranas de baixa massa molar ($M_w = 4,0 \times 10^4$ Da) manteve-se com uma turbidez praticamente constante durante os primeiros 120 dias de observação. O que é condizente para dextranas com esta ordem de M_w . De

ⁱ Calculada pela diferença entre a massa de dextranas inicialmente presentes e a massa de dextranas solúveis remanescentes em solução.

acordo com a literatura, estas dextranas em concentrações da ordem de mg/L somente seriam rápida e completamente precipitadas em soluções hidroalcoólicas a 80% v/v de etanol. Isto constitui a base da metodologia adotada pela AOAC para a análise quantitativa de dextranas totais^{34,62}.

Nos demais sistemas o aumento na turbidez foi acentuando-se ao longo dos dias, com aumentos mais evidenciados para as soluções contendo dextranas de massas molares mais elevadas. Este comportamento é bem conhecido, pois em soluções hidroalcoólicas a solubilidade das dextranas decresce em função do aumento da sua massa molar^{40,45,46}.

Contudo existem relatos da literatura que descrevem a precipitação de dextranas de baixa massa molar em soluções aquosas, mas somente quando em concentrações superiores a 10 % m/v (concentrações estas inexistentes na aguardente). Isto ocorre pela associação das cadeias de dextranas por ligações de hidrogênio, induzidas pela elevada relação dextrana/água em soluções concentradas^{84,85,86}.

Outro ponto pertinente a Figura 16 que deve ser salientado, são as abruptas reduções de turbidez exibidas pelos sistemas contendo dextranas de massas molares superiores a 10^4 Da (principalmente para as dextranas de M_w 2,1 e $5,0 \times 10^6$ Da) em torno dos 120 dias de observação. Tal comportamento mostrou-se coerente, visto que os depósitos existentes até este momento começam a se aglutinar de forma condensada no fundo das garrafas.

Ainda sobre o parâmetro turbidez, pode-se observar na Figura 17 que o mesmo padrão de comportamento descrito acima para as soluções modelo mantidas a 25 °C é desenvolvido. Todavia as reduções de turbidez passaram a ocorrer em torno dos 160 dias de observação e em menor intensidade. Já para os sistemas modelo mantidos a 35 °C (Figura 18), a redução da turbidez só começa a delinear-se a partir dos 210 dias de observação, e ainda assim restringindo-se para as dextranas alta M_w .

Figura 17. Turbidez dos sistemas aguardente-dextrana mantidos ao longo do tempo a 25 °C.

Figura 18. Turbidez dos sistemas aguardente-dextrana mantidos ao longo do tempo a 35 °C.

Desta maneira, o parâmetro turbidez sugere que em menores temperaturas a formação de precipitados de dextranas em aguardentes é facilitada. O que é confirmado quando observamos valores de dextranas em solução e precipitadas ao longo do tempo nos sistemas modelo, listados nas Tabelas 13, 14 e 15.

Tabela 13. Dextranas em solução e precipitadas nas soluções modelo mantidas ao longo do tempo a 15 °C.

Dextrana M _w (Da)	Dias	Massa inicial de em 125 mL de solução	Dextranas em solução*		Dextranas precipitadas	
			mg	%	mg	%
5,50 x 10 ⁶	60	62,5 mg (500ppm)			N	
5,50 x 10 ⁶	90		46,4 (± 2,7)	74,2	16,1	25,8
5,50 x 10 ⁶	120		31,8 (± 3,2)	50,9	30,7	49,1
5,50 x 10 ⁶	160		10,4 (± 5,9)	16,6	52,1	83,4
5,50 x 10 ⁶	210		1,61 (± 7,6)**	2,57	60,9	97,4
5,50 x 10 ⁶	270		1,43 (± 8,2)**	2,29	61,1	97,7
2,10 x 10 ⁶	60	62,5 mg (500ppm)			N	
2,10 x 10 ⁶	90		54,3 (± 1,4)	86,9	8,2	13,1
2,10 x 10 ⁶	120		47,0 (± 2,9)	75,2	15,5	24,8
2,10 x 10 ⁶	160		19,6 (± 5,1)	31,4	42,9	68,6
2,10 x 10 ⁶	210		8,18 (± 7,8)	13,1	54,3	86,9
2,10 x 10 ⁶	270		3,92 (± 6,3)	6,27	58,6	93,7
5,00 x 10 ⁵	120	62,5 mg (500ppm)			N	
5,00 x 10 ⁵	160		55,6 (± 2,1)	88,9	6,9	11,0
5,00 x 10 ⁵	210		44,9 (± 1,6)	71,8	17,6	28,2
5,00 x 10 ⁵	270		39,8 (± 3,7)	63,7	22,7	36,3
4,00 x 10 ⁴	120	62,5 mg (500ppm)			N	
4,00 x 10 ⁴	160		58,4 (± 4,2)	93,4	4,1	6,56
4,00 x 10 ⁴	210		54,4 (± 3,9)	87,0	8,1	13,0
4,00 x 10 ⁴	270		51,2 (± 5,8)	81,9	11,3	18,1

Onde: N = não foi constatada precipitação até esta data de observação.

*Medidas realizadas em duplicata.

**Quantificação realizada após a concentração de uma alíquota da amostra em 4x^j.

^j 100 mL da amostra foram rotoevaporados até um volume aproximado de 20 mL, que em seguida foram transferidos para um balão volumétrico de 25 mL que foi aferido com água tipo Milli-Q.

Tabela 14. Dextranas em solução e precipitadas nas soluções modelo mantidas ao longo do tempo a 25 °C.

Dextrana M_w Da	Dias	Massa inicial de em 125 mL de solução	Dextranas em solução*		Dextranas precipitadas	
			mg (CV%)	%	mg	%
$5,50 \times 10^6$	90				N	
$5,50 \times 10^6$	120		39,3 ($\pm 3,7$)	62,9	23,2	37,1
$5,50 \times 10^6$	160	62,5 mg (500ppm)	21,6 ($\pm 4,4$)	34,6	40,9	65,4
$5,50 \times 10^6$	210		7,40 ($\pm 8,2$)	11,8	55,1	88,2
$5,50 \times 10^6$	270		4,09 ($\pm 5,9$)	6,54	58,4	93,4
$2,10 \times 10^6$	90				N	
$2,10 \times 10^6$	120		51,8 ($\pm 4,4$)	82,9	10,7	17,1
$2,10 \times 10^6$	160	62,5 mg (500ppm)	43,9 ($\pm 2,3$)	70,2	18,6	29,8
$2,10 \times 10^6$	210		29,8 ($\pm 6,2$)	47,7	32,7	52,3
$2,10 \times 10^6$	270		17,3 ($\pm 7,9$)	27,7	45,2	72,3
$5,00 \times 10^5$	210				N	
$5,00 \times 10^5$	270	62,5 mg (500ppm)	54,3 ($\pm 5,8$)	86,9	8,20	13,1
$4,00 \times 10^4$	270	62,5 mg (500ppm)			N	

Onde: N = não foi constatada precipitação até esta data de observação.

*Medidas realizadas em duplicata.

Tabela 15. Dextranas em solução e precipitadas nas soluções modelo mantidas ao longo do tempo a 35 °C.

Dextrana M _w Da	Dias	Massa inicial de em 125 mL de solução	Dextranas em solução*		Dextranas precipitadas	
			mg (CV%)	%	mg	%
5,50 x 10 ⁶	90				N	
5,50 x 10 ⁶	120		56,1 (± 4,9)	89,8	6,4	10,2
5,50 x 10 ⁶	160	62,5 mg (500ppm)	45,5 (± 7,7)	72,8	17,0	27,2
5,50 x 10 ⁶	210		31,9 (± 3,8)	51,1	30,6	48,9
5,50 x 10 ⁶	270		24,7 (± 6,1)	39,5	37,8	60,5
2,10 x 10 ⁶	90				N	
2,10 x 10 ⁶	120		60,2 (± 2,7)	96,3	2,3	3,7
2,10 x 10 ⁶	160	62,5 mg (500ppm)	55,4 (± 3,3)	88,6	7,1	11,4
2,10 x 10 ⁶	210		46,6 (± 6,5)	74, 6	15,9	25,4
2,10 x 10 ⁶	270		37,1 (± 3,9)	59,4	25,4	40,6
5,00 x 10 ⁵	210				N	
5,00 x 10 ⁵	270	62,5 mg (500ppm)	57,9 (± 3,5)	92,6	4,6	7,4
4,00 x 10 ⁴	270	62,5 mg (500ppm)			N	

Onde: N = não foi constatada precipitação até esta data de observação.

*Medidas realizadas em duplicata.

Em linhas gerais as Figuras 16, 17, 18 e as Tabelas 13, 14, 15, demonstram a que a redução da temperatura aumenta a precipitação das dextranas nos sistemas modelo avaliados.

A redução da temperatura com o objetivo de reduzir a formação de precipitados de outra natureza é a muito utilizada por produtores de outras bebidas

como alguns whiskys submetidos a maiores períodos de maturação através do processo denominado “Chill Filtration”, ou filtração a frio⁸⁷.

Entretanto em nossos experimentos, este efeito torna-se menos pronunciado para dextranas com distribuições de massas molar da ordem de 10^5 e 10^4 Da, como pode ser observado na Tabela 16. Nesta tabela para efeito comparativo, são listadas as taxas de precipitação das diferentes dextranas monitoradas, calculadas a partir das razões entre as concentrações de dextranas solubilizadas (62,5 mg / 125 mL) inicialmente presentes em todos os modelos e as dextranas não precipitadas decorridos 270 dias de monitoramento. Desta maneira quanto maior o quociente em cada observação mais rápido terá sido o processo de formação destes depósitos.

Tabela 16. Razões entre as concentrações de dextranas inicialmente em solução (62,5 mg) e ainda em solução (em mg) decorridos 270 dias de permanência dos modelos a 15, 25 e 35 °C.

Dextrana (M _w)	15 °C	25 °C	35 °C
$5,5 \times 10^6$	43,7	15,3	2,53
$2,1 \times 10^6$	15,9	3,61	1,68
$5,0 \times 10^5$	1,57	1,15	1,08
$4,0 \times 10^4$	1,22	+	+

Onde: + = precipitações não observadas para as medidas realizadas em 270 dias de monitoramento.

As maiores taxas de precipitação exibidas pelas dextranas com M_w superiores a 10^6 Da nos modelos estudados, certamente será uma das principais razões para a determinação isolada de dextranas com valores de M_w desta magnitude nos depósitos analisados das amostras de aguardente da Tabela 11.

Com base nas taxas de precipitação relativas às dextranas com M_w da ordem de 10^5 e 10^4 Da, não se exclui a possibilidade da sua futura precipitação em alguma das amostras da Tabela 11 não ocorridas até o momento de sua análise. Isto pode ocorrer principalmente no caso das dextranas de 10^4 Da, pois estas além de exibirem as menores taxas de precipitação, são encontradas em maior frequência no açúcar, e em maiores proporções em relação às de M_w da ordem de 10^5 Da (Tabelas 6 – 9) devidos as maiores dificuldades de remoção das mesmas quando da sua presença no açúcar.

Já para as amostras da Tabela 11 nas quais não foram detectadas dextranas com M_w superiores a 10^5 Da, mas somente dextranas da ordem de 10^4 Da, certamente é bem mais difícil sugerir uma única causa para este fato. Neste caso o motivo da detecção isolada destas dextranas (10^4 Da) provavelmente está na associação de suas baixas taxas de precipitação a outros fatores.

Um destes fatores seria, por exemplo, o processo de adoçagem da aguardente pela adição de um xarope hidroalcoólico de açúcar, preparado e filtrado na própria fábrica. Este procedimento é utilizado por alguns produtores, de médio e grande porte.

Contudo essa filtração nem sempre é eficiente para a remoção de dextranas de baixa M_w , conforme demonstrado na Figura 19. Nesta, observa-se a comparação entre o cromatograma obtido para as dextranas isoladas do resíduo de filtração de um xarope hidroalcoólico (cedido ao LDQA por um grande produtor de aguardente, sob a forma de uma suspensão) e o obtido para a mistura de dois padrões de dextranas com M_w de $5,90 \times 10^6$ Da e $2 = 4,83 \times 10^4$ Da.

Figura 19. Cromatogramas de uma mistura de dois padrões de dextranas (1 = M_w $5,90 \times 10^6$ Da e 2 = $4,83 \times 10^4$ Da), e de dextranas isoladas do resíduo de filtração de um xarope hidroalcoólico de açúcar utilizado para a adoçagem de uma aguardente de cana (em vermelho).

Podemos observar na Figura 19 a ausência de dextranas com M_w da ordem de 10^4 Da, originalmente dissolvidas na fase líquida do resíduo de filtração do xarope.

Esta constatação foi possível, pela indução da precipitação^k destas dextranas presentes na fase líquida do resíduo (resultante da ultracentrifugação deste resíduo a 4 °C; 10.000 rpm; 60 min), e confirmada após a análise via SEC de uma segunda alíquota desta mesma fase.

Outro fator que pode estar associado a não detecção de dextranas com valores de M_w maiores que 10^5 Da, seria a utilização de açúcares de melhor qualidade pelos produtores de aguardente. Isso implicaria em açúcares com menores concentrações de dextranas com altos valores de M_w . Estas dextranas são

^k Realizada pela elevação da concentração de etanol da mesma até 80%.

as normalmente controladas com maior atenção pelos produtores açúcar. Estes muitas vezes monitoram a concentração de dextranas no caldo de cana através do método da haze (adotado pela International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis – ICUMSA)³⁴ e indicado para a detecção de dextranas de mais alta massa molar.

A influência da acidez na precipitação das dextranas, foi avaliada através do monitoramento de uma novas soluções modelo aguardente-dextrana (M_w $2,1 \times 10^6$ Da), preparadas nas mesmas condições dos modelos anteriores e tiveram a sua acidez reduzida de 29,48 para 13,91 mg de ácido acético/100mL de A.A. (pela adição de NaOH 0,1M), o que correspondeu a uma decréscimo de aproximadamente de 50 % na sua acidez total. Os dados obtidos foram então comparados com os obtidos para os anteriores obtidos os quais como já discutidos são representativos da acidez total média das cachaças produzidas em colunas.

A razão pela qual os experimentos foram realizados com redução da acidez total para valores da ordem da metade dos valores medianos (e ainda assim maiores que os mínimos registrados de 6,91 e 7,52 mg de ácido acético/100mL de A.A. determinados para as cachaças destiladas em coluna, Tabela 12) se deve ao fato de que atualmente um dos critérios sensoriais que mais negativamente influenciam na escolha de uma cachaça por conta do consumidor é a sua acidez⁹⁵. Além disso, elevados valores de acidez são fortes indicativos de cachaças que apresentaram problemas de contaminação bacteriana durante a fermentação e destilação^{7,8,9}, portanto a melhoria da qualidade da cachaça brasileira naturalmente incorrerá na oferta de produtos com menor acidez.

A Figura 20 apresenta a comparação dos valores de turbidez para as soluções modelo contendo dextranas $M_w 2,1 \times 10^6$ Da com valores de acidez total de 29,48 e 13,91 mg de ácido acético/100mL de A.A.

Figura 20. Turbidez dos sistemas modelo aguardente-dextrana em concentrações de acidez total de 29,48 e 13,91 mg de ácido acético/100mL A.A. ao longo do tempo a uma temperatura de 25 °C, e de 28,79 mg de ácido acético/100mL A.A. mantidos ao longo do tempo a uma temperatura de 15 °C.

Na Tabela 17 são apresentadas as massas de dextranas precipitadas e remanescentes em solução nos sistemas modelo com reduzida monitorados ao longo do tempo a 25°C e com acidez dentro dos níveis medianos para cachaça de coluna a 15 e 25°C.

Tabela 17. Dextranas em solução e precipitadas nas soluções modelo com acidez total de 28,79 e 13,91 mg de ácido acético/100 mL de A.A.

Dextrana M _w	Dias	Massa inicial de em 125 mL de cachaça	Dextranas em solução		Dextranas precipitadas	
Da			mg (CV%)	%	mg	%
29,48 mg de ácido acético/100mL de A.A. a 15 °C						
2,10 x 10 ⁶	60	62,5 mg (500ppm)			N	
2,10 x 10 ⁶	90		54,3 (± 1,4)	86,9	8,2	13,1
2,10 x 10 ⁶	120		47,0 (± 2,9)	75,2	15,5	24,8
2,10 x 10 ⁶	160		19,6 (± 5,1)	31,4	42,9	68,6
2,10 x 10 ⁶	210		8,18 (± 7,8)	13,1	54,3	86,9
2,10 x 10 ⁶	270		3,92 (± 6,3)	6,27	58,6	93,7
29,48 mg de ácido acético/100mL de A.A. a 25 °C						
2,10 x 10 ⁶	90	62,5 mg (500ppm)			N	
2,10 x 10 ⁶	120		51,8 (± 4,4)	82,9	10,7	17,1
2,10 x 10 ⁶	160		43,9 (± 2,3)	70,2	18,6	29,8
2,10 x 10 ⁶	210		29,8 (± 6,2)	47,7	32,7	52,3
2,10 x 10 ⁶	270		17,3 (± 7,9)	27,7	45,2	72,3
13,91 mg de ácido acético/100mL de A.A. a 25 °C						
2,1 x 10 ⁶	6	62,5 mg (500mg/L)			N	
2,1 x 10 ⁶	15		55,7 (± 2,9)	89,1	6,8	10,9
2,1 x 10 ⁶	30		20,8 (± 1,4)	33,4	41,7	66,7
2,1 x 10 ⁶	60		8,6 (± 6,8)	13,8	53,9	86,2
2,1 x 10 ⁶	90		6,4 (± 5,5)*	10,2	56,1	89,8
2,1 x 10 ⁶	120		2,7 (± 7,3)*	4,32	59,8	95,7
2,1 x 10 ⁶	160		2,3 (± 4,2)*	3,70	60,2	96,3
2,1 x 10 ⁶	210		1,1 (± 13,2)*	1,70	61,4	98,3
2,1 x 10 ⁶	270		1,3 (± 8,6)*	2,10	61,2	97,9

Onde: N = não foi observada precipitação até esta data de observação.

* Quantificação realizada após uma concentração de uma alíquota da amostra em 4x^l.

^l 100 mL da amostra foram rotoevaporados até um volume aproximado de 20 mL, que em seguida foram transferidos para um balão volumétrico de 25 mL que foi aferido com água tipo Milli-Q.

Os resultados acima demonstram claramente a influência da redução da acidez total quanto ao favorecimento da precipitação das dextranas de alta massa molecular média numa mesma temperatura (25 °C). Ainda neste sentido também foi possível constatar que para dextranas com um mesmo valor de M_w o efeito da redução da acidez total numa ordem 50% foi superior ao obtido pela diminuição de 10 °C na faixa de temperatura de 25 – 15 °C.

Desta maneira, é coerente assumirmos que para a precipitação de dextranas de alta massa molar média a influência da redução da acidez total em cachaças que apresentem concentrações deste parâmetro em torno dos níveis medianos seja superior ao pronunciado pela redução da sua temperatura de estocagem (admitindo variações de temperatura de ± 10 °C na estocagem da aguardente).

Com o intuito de avaliar a influência dos íons metálicos Ca^{II} , Mg^{II} , Cu^{II} e Fe^{III} , na formação dos depósitos de dextranas, a concentração destes íons que na aguardente base era de $\text{Ca} = 4,61$ $\text{Mg} = 7,92$; $\text{Cu} = 1,39$; $\text{Fe} = 0,31$ mg/L, foi elevada por meio da adição de padrões (1.000 mg/L) para $\text{Ca} = 20,2$; $\text{Mg} = 19,8$; $\text{Cu} = 5,12$; $\text{Fe} = 2,93$ mg/L.

Estas concentrações correspondem a aproximadamente duas vezes a média encontrada para o cálcio e magnésio, dez vezes a de ferro em aguardentes em aguardentes disponíveis no comércio⁸³ e ao limite máximo permitido para o Cobre pela legislação brasileira¹.

A escolha destes metais foi realizada em função do cálcio e do magnésio figurarem entre os componentes inorgânicos mais abundantes da aguardente⁸³, do cobre ser o material de construção da maioria dos alambiques, e do ferro estar presente em diversos utensílios usados durante a produção da aguardente.

Desta forma a partir da aguardente base que teve fortificada as suas concentrações de cálcio, magnésio, cobre e ferro, foi preparada uma nova solução modelo contendo 500 mg/L de um padrão de dextrana de $M_w 2,1 \times 10^6$ Da que teve a sua acidez total ajustada para 14,04 mg de ácido acético/100 mL de A.A. Esta nova solução modelo foi fracionada em frascos contendo cada um 125 mL de solução que foram mantidos a 25 °C.

O objetivo da redução na acidez total nestes sistemas modelo foi além de propiciar condições mais rápidas de precipitação (com tempos conhecidos a partir dos experimentos realizados com acidez de 13,91 mg utilizado para verificação do efeito da redução da acidez na formação dos precipitados de dextranas), considerar os dados da literatura os quais relatam que as condições mais propícias para a formação de complexos dextrana-metais estão em meios de baixa acidez até alcalinos com valores ótimos distintos para diferentes metais^{42,86,89}.

Neste sentido podemos citar o trabalho de Norkus et al (2002)⁴² que aponta o início da complexação de íons de cobre com dextranas a partir de pH 7. Já Somsook et al. (2005)⁸⁶ descrevem a obtenção de complexos ferro-dextrana em pH 9. Soares, Rodrigues e Alario (1993)⁸⁹, relataram que numa escala comparativa as ligações entre dextranas e cálcio, são menos intensas que as exibidas entre dextranas e alumínio e dextranas e térbio, e que estas decaem com o pH.

Outros trabalhos também demonstram a interação entre as dextranas e metais, porém todos em meios alcalino, para o cádmio e para o chumbo com valores ótimos quando o pH do meio situa-se entre 6 e 8, para o cobalto e níquel entre 11 e 12, e para o manganês, zinco e cobre em 10,9, 11,6 e 10,6 respectivamente^{42,88,89}.

A concentração dos metais estudados foi monitorada nos intervalos de 30, 60 e 90 dias, por meio da análise dos mesmos nas soluções modelos, após estas

serem submetidas à filtração em membranas com diâmetro de poro de 0,45 µm. As concentrações para cada metal em solução ao longo do tempo de observação estão apresentadas na Tabela 18.

Tabela 18. Concentrações em mg/L de Ca, Mg, Cu e Fe nas soluções modelo mantidas com acidez total de 14,04 mg de ácido acético/100 mL de A.A. ao longo do tempo a 25 °C*.

Dias	Ca	Mg	Cu	Fe
0	20,2	19,8	5,12	2,93
30	19,3	19,3	5,36	2,64
60	21,5	20,7	5,43	3,12
90	19,5	20,4	4,78	2,89
CV%	4,94	3,11	5,67	6,82

* Temperatura de estocagem ou de exposição em mostruários normalmente encontradas para a aguardente nos depósitos de fábricas, supermercados e lojas de bebidas, e também de acidez total com tempos de precipitação conhecidos mais favorável à precipitação da dextrana $M_w 2,1 \times 10^6$ Da de acordo com os nossos dados experimentais.

Apesar de ter sido observada a formação de precipitados nas amostras fortificadas desde as análises realizadas com 30 dias, os valores determinados para a concentração de dextranas remanescentes em solução não diferiram consideravelmente dos determinados no experimento conduzido sem a fortificação dos metais avaliados com acidez de 13,91 mg ácido acético/100 mL de A.A. nos períodos de 30, 60 e 90 dias os quais foram: 20,8; 8,6; 6,4 mg/L e 19,2; 9,7; 7,3 mg/L respectivamente para o sistemas sem e com a fortificação do íons avaliados.

Os dados acima, associados aos coeficientes de variação obtidos para a concentração dos metais em solução nos sistemas aguardente-dextrana e metais,

sugerem que a presença de cálcio, magnésio, cobre e magnésio, nas concentrações estudadas não devem influenciar significativamente no processo de precipitação das dextranas.

Assim, tomando como base os experimentos aqui relatados e os dados da literatura podemos apontar a acidez da aguardente como um fator limitante para a não influência da presença dos metais estudados no aumento da velocidade de precipitação das dextranas.

Além disso, foi analisada a massa de precipitado de dextrana originada de outro recipiente (estocado por 90 dias) contendo uma alíquota da mesma solução modelo, através da análise dos mesmos íons metálicos de via MEV-EDX.

Os resultados não revelaram a presença de concentrações acima dos limites de detecção para os íons analisados. Foram identificados apenas os elementos carbono e oxigênio, inclusive sem alterações significativas nas proporções dos mesmos com relação ao padrão de dextrana deste adicionado ao modelo e após os 90 dias de incubação (Apêndice E).

As proporções relativas para estes dois elementos no padrão de dextrana e na massa precipitada do mesmo após 90 dias foram respectivamente de C= 43,3 %; O= 56,7 % e C= 43,4 % e 56,6 %

Os resultados acima concordam com os resultados analíticos obtidos inicialmente via análise elementar para os elementos C, O, N, H deste mesmo padrão de dextrana, que revelou a seguinte composição centesimal: C = 38,2 %, O = 56,9 %, H = 6,7 e N = 0,06.

Os dados dos sistemas modelo aqui apresentados, indicam que do ponto de vista de constituição química os depósitos formados por dextranas em aguardentes

podem ser definidos majoritariamente em termos dos elementos Carbono, Oxigênio e Hidrogênio.

Também foi questionada a possibilidade da interação entre dextranas com diferentes Mw, onde um modelo que compreendeu a mistura dos 4 padrões de dextranas $5,5 \times 10^6$; $2,1 \times 10^6$; $5,0 \times 10^5$ e $4,0 \times 10^4$ Da, numa concentração total de 500 mg/L (125 mg/L de cada padrão), que também foram mantidos a 25 °C por 90 dias (3 garrafas). Após esse período as soluções modelo foram filtradas. A análise do filtrado não apresentou reduções na concentração de dextranas solúveis de nenhum padrão.

Quanto à turbidez medida nas soluções modelo neste experimento, o valor registrado para as mesmas foi de 3,3 ($\pm 11,8$ %), contra 4,7 ($\pm 7,6$ %) exibida para a solução contendo somente o padrão de dextrana $5,5 \times 10^6$ Da. Interpretamos essa redução como esperada devido a menor massa presente das dextranas de Mw da ordem de 10^6 Da, as quais segundo os dados obtidos pelo nossos modelos confeccionados com iguais concentrações de dextranas propiciam a aguardente uma maior turbidez.

Por fim uma possível influência da incidência de luz na insolubilização das dextranas em aguardentes foi avaliada por meio do seguinte experimento: seis garrafas (objetivando medidas em triplicata para cada situação) contendo 150 mL de soluções modelo aguardente-dextrana (acidez total 13,91 mg ácido acético/100 mL de A.A.) contendo 62,5 mg/125 mL (500 ppm) do padrão Mw $2,1 \times 10^6$ Da foram expostas a incidência da luz proveniente de uma lâmpada fluorescente tipo luz do dia (Philips – TLDRS-S84W; temperatura de cor 4000 K) similares as usadas para iluminação residencial e de expositores de supermercados por um período de 120 dias em ambiente refrigerado com temperatura média de 25 °C. Tais condições

foram adotadas, visando mais uma vez a maior proximidade das condições mais comuns de comercialização da aguardente.

Ao final deste período não foram observados variações de turbidez em relação aos resultados obtidos para os modelos mantidos ao abrigo da luz.

Tabela 19. Valores de Turbidez e de dextranas remanescente em solução para os sistemas aguardente-dextrana com e sem incidência de luz após 120 dias de incubação.

Modelo	Turbidez (NTU)	Dextranas remanescentes em solução	Dextranas precipitadas
	Dia 0	Dia 120	Dia 120
Com incidência de luz	0,33	2,97 (C.V. 8,0 %)*	59,5 mg (C.V. 6,9 %)
Sem incidência de luz	0,36	3,11 (C.V. 9,3 %)*	59,4 mg (C.V. 7,5 %)
C.V.** para dextranas remanescentes em solução com e sem incidência de luz		3,3 %	-

* = C.V. % da medida triplicata de cada experimento, ** = C.V. % entre os experimentos com e sem incidência de luz.

Desta maneira, os resultados listados na Tabela 19 para os parâmetros turbidez e massa de dextranas remanescente em solução após 120 de experimento indicam que a luz não apresenta influência significativa no tocante ao aumento ou decréscimo na velocidade de formação dos precipitados de dextranas.

Por meio dos resultados gerados através dos diversos sistemas modelo aqui estudados, podemos apontar os fatores temperatura e acidez como os que mais influenciam na precipitação de dextranas em aguardente.

Estes resultados corroboram com os relatos da literatura¹⁵ e de produtores, de que a formação de precipitados em muitos casos não ocorre de modo imediato a adoçagem da aguardente.

Quanto ao procedimento do preparo de um xarope hidroalcoólico e a sua posterior filtração realizados por alguns produtores, este se apresenta como uma solução paliativa. Todavia este procedimento poderá ser otimizado quando da prévia quantificação de dextranas totais e da análise de distribuição de massa molar das dextranas que compõem o açúcar a ser utilizado no preparo do xarope. Isso resultaria na aquisição de açúcares com menores concentrações de dextranas de baixa e moderados valores de M_w (da ordem de 10^4 e 10^5 Da), as quais são menos passíveis de remoção pelo procedimento acima descrito.

Outra prática que poderia ser avaliada para melhorar a remoção de dextranas nestes xaropes seria o aumento no tempo entre a dissolução do açúcar e a sua filtração.

Baseados nos nossos resultados, a medida da acidez da aguardente antes da adoçagem da aguardente, ao lado do conhecimento do teor e da distribuição de massa das dextranas hora presentes no açúcar, também pode servir de parâmetro para auxiliar na estimativa de eventuais problemas de formação de precipitados de dextranas.

Já a elaboração de um modelo para a exata fixação de um intervalo para o início da formação de precipitados de dextranas em aguardentes adoçadas, não é trivial.

Fatores como a variação na proporção das diferentes dextranas presentes no açúcar utilizado, a presença de dextranas com diferentes características estruturais como o seu número de ramificações originadas pela ação de cepas mutantes do *Leuconostoc mesenteroides* ou mesmo de outras bactérias poderiam fugir as predições deste modelo.

Em termos gerais estimamos que, uma aguardente adoçada, com acidez próxima em torno dos valores medianos aos encontrados no mercado para cachaças de coluna mantida sob estocagem na faixa de 25 – 30 °C (temperaturas corriqueiras no Brasil), e contendo dextranas com M_w da ordem de 10^6 Da demandará um tempo mínimo 90 dias para a observação da formação de precipitados.

Este período em se tratando de um produto não perecível como a aguardente de cana ressalta a necessidade de um controle mais elaborado no processo de adoçagem da aguardente.

5. CONCLUSÃO

Este é o primeiro relato do perfil de distribuição de massa molar das dextranas presentes no açúcar brasileiro, e em depósitos oriundos de cachaças adoçadas.

Os açúcares analisados indicam a predominância de dois grupos de dextranas, com valores de M_w médios de $5,04 \times 10^6$ e $4,79 \times 10^4$ Da para os açúcares provenientes do nordeste brasileiro e de $5,03 \times 10^6$ e $4,91 \times 10^4$ Da para as amostras do sudeste. Eventualmente, dextranas com valores de M_w da ordem de 10^5 Da foram observadas, e passaram a compor um terceiro grupo com média de M_w de $1,03 \times 10^5$ e $3,26 \times 10^5$ Da para os açúcares originados do nordeste e sudeste respectivamente. Este perfil manteve-se e foi o mesmo observado para as dextranas presentes em amostras de açúcar de quatro safras (97/98 – 00/01).

Apesar das dextranas com M_w médio da ordem de 10^5 Da serem as menos abundantes, estas foram identificadas em 58% dos depósitos de cachaças adoçadas analisados.

Este também é o primeiro trabalho a correlacionar as diferentes distribuições de M_w das dextranas presentes no açúcar brasileiro com a formação de precipitados em aguardentes de cana.

Dentre os parâmetros avaliados os que efetivamente demonstraram aumentar a velocidade de precipitação das dextranas foram a temperatura e a acidez total.

Apesar das dextranas de baixa massa molar M_w , da ordem de 10^4 Da, apresentarem uma taxa de precipitação sensivelmente menor que as demais, observou-se a influencia positiva da redução da temperatura na precipitação das dextranas na faixa de $4,0 \times 10^4$ – $5,5 \times 10^6$ Da em aguardentes.

Uma redução em torno de 50% na acidez total de uma aguardente que se encontre dentro dos valores medianos deste parâmetro para as cachaças destiladas em coluna é mais favorável para a formação de precipitados de dextranas com massa molecular média da ordem de 10^6 Da do que a redução de 10 °C na temperatura de estocagem das mesmas no intervalo de 25 °C para 15 °C.

Não foi observada a influência dos metais Ca, Mg, Cu e Fe e da incidência de luz na formação de precipitados de dextranas nos sistemas modelos avaliados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 jun. 2005. Seção 1, p. 3-4.
2. AQUINO, F. W. B.; BOSO, L. M.; CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W. Amino acids profile of sugar spirit (cachaça), rum, and whisky. **Food Chemistry**, v. 108, n. 2, p. 784-793, 2008.
3. PITONDO, P. B. A cachaça e o desafio e o desafio da “tequila” brasileira. **Engarrafador Moderno**, n. 167, p. 12-17, 2008.
4. INSTITUTO BRASILEIRO DA CACHAÇA (IBRAC). Brasília, 2009: Seção informações setoriais. Disponível em: <<http://www.ibraccachacas.org/informacoes-setoriais>>. Acesso em: 02 fev. 2009.
5. LEÃO, Daniella Arruda Falcão de Souza. **Coopetição: tipologia e impactos no desempenho das empresas da indústria de cachaça de alambique do estado de Minas Gerais**. 2004. 146 f. Dissertação (Mestrado em Administração) – Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2004.
6. OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C. A.; MORGANO, M. A.; SERRA, G. E. Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 19-24, 2004.
7. YOKOYA, Fumio. **Fabricação da aguardente de cana**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1995. 92 p. (Série fermentações industriais 2).
8. NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI FILHO, W. G. **Aguardente de cana**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2005, 71 p.
9. NOVAES, Fernando Valadares. **Controle da Destilaria de Aguardente de Cana**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1988. 43 p.

10. FURTADO, Solange Marília Bezerra. **Avaliação sensorial descritiva de aguardente de cana (*Saccharum officinarum*, L): Influência da composição em suas características sensoriais e correlação entre as medidas sensoriais e físico-químicas**. 1995. 99 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.
11. CARDELLO, H. M. A. B.; FARIA, J. B. Análise de aceitação de aguardentes de cana por testes afetivos e mapa de preferência interno. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 1, p. 32-36, 2000.
12. CARVALHO NETTO, Osmar Vaz de. **Identificação de bactérias contaminantes de fermento de cachaça por sequenciamento do gene 16S rDNA**. 2007. 51 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
13. FARIA, J. B.; LOYOLA, E.; LÓPEZ, M. G. P.; DUFOUR, J. P. Cachaça, Pisco and Tequila. In: LEA, A. G. H.; PIGGOT, J. R. **Fermented beverages production**. 2. ed. New York: Plenum, 2003. cap. 15, p. 335-363.
14. MOREL DU BOIL, P. G. Refined sugar and flock formation. **International Sugar Journal**, v. 99, p. 310, 1997.
15. RODRIGUES-FILHO, M. G.; LEITE-NETO, A. F.; AQUINO, F. W. B.; PLESPIS, A. M. G.; RODRIGUES-FILHO, U. P.; FRANCO, D. W. Quantificação de dextranas em açúcares e em cachaça. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1115-1118, 2007.
16. OLIVEIRA, D. T.; ESQUIAVETO, M. M. M.; SILVA-JÚNIOR, J. F. Impacto dos itens da especificação do açúcar na indústria alimentícia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, supl. 1, p. 99-102, 2007.
17. EDYE, L. A. Sugar quality in soft drink manufacture: the acid beverage flock problem. In: Shahidi F, Spanier A. M., Chi-Tang Ho, Braggins T. (eds.), **Quality of Fresh and Processed Foods**. Book Series: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. vol. 542, p. 317-326, 2004.
18. LEE, W. C.; YUSOF, S.; HAMID N. S. A.; BAHARIN B. S. Effects of finig treatment and storage temperature on the quality of clarified banana juive. **LWT – Food Science and Technology**, v. 40, n. 10, p. 1755-1764, 2007.

19. WU, L. C.; SIEBERT, K. J. Characterization of haze-active proteins in Apple juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 13, p. 3828-3834, 2002.
20. SIEBERT, K. J.; CARRASCO, A.; LYNN, P. Y. Formation of protein-polyphenol haze in beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 1997-3834, 2005.
21. LOMOLINO, G.; CURIONI, A. Protein haze formation in white wines: Effect os *Saccharomices cerevisiae* cell wall components prepared with different procedures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 21, p. 8737-8744, 2007.
22. WATERS, E. J.; PENG, Z.; POCOCK, K. F.; JONES, G. P.; CLARKE, P.; WILLIAMS, P. J. Solid-state C-13 nmr investigation into insoluble deposits adhering to the inner glass-surface of bottled red wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 8, p. 1761-1766, 1994.
23. REFSGAARD, H. H. F.; SCHAUMBURG, K.; SKIBSTED, L. H. Solid-state ¹³C NMR investigations of insoluble deposits in aromatic bitters. **Zeitschrift fur Lebensmittel-untersuchung und –Forschung A**. v. 203, n. 3, p. 287-292, 1996.
24. NAESSENS, M.; CERDOBBEL, A.; SOETAERT, W.; VANDAMME, E. J. Leuconostoc dextranucrase and dextran: production, properties and applications. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, n. 8, p. 845-860, 2005.
25. JIMÉNEZ, E. R. The dextranase along sugar-marking industry. **Biotechnologia Aplicada**, v. 22, n. 1, p. 20-27, 2005.
26. GIL, E. C.; COLARTE, A. I.; EL-GHZAOU, A.; DURAND, D.; DELARBRE, J. L.; BATAILLE, B. A sugar cane native dextran as an innovative funcional excipient for the development of pharmaceutical tablets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 68, n. 2, p. 319-329, 2008.
27. RODRIGUES, Sueli. **Estudo da síntese enzimática de dextrana na presença de maltose como aceptor**. 2003. 244 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

28. AQUINO, Denise Silva. **Produção de dextrana por novas linhagens de bactérias isoladas da cana-de-açúcar**. 2006. 91 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
29. EBERT, K. H.; SCHENK, G. Mechanisms of biopolymer growth: formation of dextran and levan. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 30, p. 179-221, 1968.
30. ROBYT, J. F.; KIMBLE, B. K.; WALSETH, T. F. The mechanism of dextranase action: Direction of dextran biosynthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 165, n. 2, p. 634-640, 1974.
31. ALSOP, R. M. Industrial production of dextrans. In: Bushel, M. E. **Progress in Industrial Microbiology**, New York: Elsevier 1983, v. 18, cap. 1, p. 1-44.
32. ROBYT, J. F.; WALSETH, T. F. The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranase. **Carbohydrate Research**, v. 61, n. 1, p. 433-445, 1978.
33. ROBYT, J. F.; TANIGUCHI, H. The mechanism of dextranase action: Biosynthesis of linkages by acceptor reactions with dextran. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 174, n. 1, p. 129-135, 1976.
34. RAVNO, A. B.; PURCHASE, B. B. Dealing with dextran in the South African sugar industry. **International Sugar Journal**, v. 108, n. 1289, p. 255-269, 2006.
35. RAUH, J. S.; CUDDIHY, J. A.; FALGOUT R. N.; MARQUETTE M. L. Dextran test method provides versatility for sugar factory process monitoring. **International Sugar Journal**, v. 105, n. 1251, p. 100-103, 2003.
36. CLARKE, M. A. Dextranas em los ingenios azucareros: Presencia y control. **Sugar y Azucar**, v. 92, p. 38-46, 1997.
37. CLARKE, M. A. Dextranas em los ingenios azucareros: Presencia y control. Segunda Parte. **Sugar y Azucar**, v. 92, p. 35-45, 1997.

38. OLIVEIRA, A. S.; RINALDI, D. A.; TAMANINI, C.; VOLL, C. E.; HAULY, M. C. O. Factors that interfere in dextran production by sugarcane contaminating microorganisms. **Semina – Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 23, n. 1, p. 99-104, 2002.
39. CARRASCO, F.; CHORNET, E.; OVEREND, R. P.; COSTA, J. A generalized correlation for the viscosity of dextrans in aqueous solutions as a function of temperature, concentration, and molecular weight at low shear rates. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 37, n.8, p. 2087-2098, 1989.
40. NEUCHL, C.; MERSMANN, A. Comparison of the non-solvents ethanol and isopropanol for the fractionation of dextran. **Fluid Phase Equilibria**, v. 116, n 1-2, p. 133-139, 1996.
41. JEREMI, K.; ILI, L. J.; JOVANOVI, S. Kinetics of dextran depolymerization in aqueous HCl. **European Polymer Journal**, v. 21, n. 6, p. 537-540, 1985.
42. NORKUS, E.; VAI, I. NIENE, J.; VUORINEN, T.; HEIKKILÄ. Interaction of Cu(II) with dextran in alkaline solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, n. 2, p.159-164, 2002.
43. CALDAS, C.; SILVA-JÚNIOR, J. F.; CARVALHO-FILHO, T. D. A dextrana na produção de açúcar demerara. **STAB**, v. 17, n. 1, p. 24, 1998.
44. CALIARI, M.; SOARES-JÚNIOR, M.; GOMES, R. J. C. Efeito das ondas ultrassônicas sobre a população de *Leuconostoc mesenteroides* em caldo de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 34, n. 3, p. 139-146, 2004.
45. YANG, F.; ITO, Y. Method for the fractionation of dextran by centrifugal precipitation chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 2, p. 440-445, 2002.
46. ECKELT, J.; SUGAYA, R.; WOLF, B. A. Large scale fractionation of pullulan and dextran. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 2, p. 205-209, 2006.
47. CANEVAROLO JÚNIOR, S. V. Cromatografia de exclusão por tamanho. In: CANEVAROLO JÚNIO, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: ARTLIBER, 2004. cap. 6, p. 116-145.

48. MELÍK, R.; ŠTIKAROVSKÁ, M.; CHMELÍK, J. Different behavior of dextrans in positive-ion and negative-ion mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 12, p. 1467-1473, 2004.
49. AMUR, K. S.; HARLAPUR, S. F.; AMINABHAVI, T. M. A novel analytical method to estimate molar and virial coefficients of polymers from osmometry. **Polymer**, v. 38, n. 26, p.6417-6420, 1997.
50. WU, C. Laser light-scattering characterization of the molecular weight distribution of dextran. **Macromolecules**, v. 26, n. 15, p. 3821-3825, 1993.
51. CANEVAROLO JÚNIOR, Sebastião Vicente. **Ciência dos polímeros: um curso básicos para tecnólogos e engenheiros**. 2. ed. São Paulo: Artliber, 2006. v. 1.
52. CHMELÍK, J.; CHMELÍKOVÁ, J.; NOVOTNY, M. V. Characterization of dextrans by size-exclusion chromatography on unmodified silica gel columns, with light-scattering detection, and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 93, n. 1-2, p. 93-100, 1997.
53. KOSTANSKI, L. K.; KELLER, D. M.; HAMIELEC, A. E. Size-exclusion chromatography – a review of calibration methodologies. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 58, n. 2, p. 159-186, 2004.
54. SON, M. J.; JANG, E. K.; KWON, O. S.; SEO, J. H.; KIM, I. J.; LEE, I. S.; PARK, S. C.; LEE, S. P. Characterization of dextran produced from *Leuconostoc citreum* S5 strain isolated from Korean fermented vegetable. **European Food Research and Technology**, v. 226, n. 4, p. 697-706, 2008.
55. PENUGONDA, S.; KUMAR, A.; AGARWAL, H. K.; PARANG, K.; MEHVAR, R. Synthesis and in vitro characterization of novel dextran-methylprednisolone conjugates with peptide linkers: Effects of linker length on hydrolytic and enzymatic release of methylprednisolone and its peptidyl intermediates. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 7, p. 2649-2664, 2008.
56. MERIENNE, S.; BUSNEL, J. P.; FRICOTEAUX, F.; PRUDHOMME, J. C. Size exclusion chromatography of dextrans in DMSO as eluent. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 23, n. 11, p. 1745-1756, 2000.
57. BARTH, H. G.; BOYES, B. E.; JACKSON, C. Size exclusion chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 68, n.12, p.445r-466r, 1996.

58. HAGEL, Lars. In: DUBIN, P. L. **Aqueous size-exclusion chromatography**. 1 ed. New York: Elsevier, 1988. cap. 5, p. 119-150. (Journal of Chromatography Library, 40).
59. PORATH, J.; FLODIN P. Gel filtration: A method for desalting and group separation. **Nature**, v. 183, n. 4676, p. 1657-1659, 1959.
60. ALSOP, R. M.; VLACHOGIANNIS, G. J. Determination of the molecular weight of clinical dextran by gel permeation chromatography on TSK PW type columns. **Journal of Chromatography A**, v. 246, n. 2, p. 227-240, 1982.
61. NICHOLSON, R. I.; HORSLEY, M. Impurities in sugar processing, determination of dextran and starch in cane juices and sugar products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 7, n. 9. p. 640-643, 1959.
62. ROBERTS, E. J.; A quantitative method for dextran analysis. **International Sugar Journal**, v. 85, n. 1009, p. 10-13, 1983.
63. AQUINO, F. W. B.; FRANCO, D. W. Molecular mass distribution of dextran in Brazil sugar and insoluble deposits of cachaça. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1391-1395, 2009.
64. CABALLERO, B.; TRUGO, L.; FINGLAS, P. (eds.) **Encyclopedia of food sciences and nutrition**. Oxford: Academic Press, 2003. v. 9, p. 5561.
65. RATNAYAKE, W. S.; JACKSON, D. S. Gelatinization and solubility of corn starch during heating in excess water: New insights. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 10, p. 3712-3716, 2006.
66. IRVINE, J. E. Sugarcane and sugar. In: CHEM, J. C. P. **Cane sugar handbook**. New York: Wiley-Interscience 1985, cap 1, p. 25-28.
67. EUROPEAN Pharmacopoeia. 3. ed. Strasbourg: Council of Europe, 1997, p. 1369.
68. RECHE, R. V.; LEITE-NETO, A. F.; SILVA, A. A.; GALINARO, C. A.; OSTI, R. Z.; FRANCO, D. W. Influence of type of distillation apparatus on chemical profiles of brazilian cachaças. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 16, p. 6603-6608, 2007.

69. BROWN, C. F.; INKERMAN, P. A. Specific method for quantitative measurement of the total dextran content of raw sugar. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 227-233, 1992.
70. SHAMALA, T. R.; PRASAD, M.S. Preliminary studies on the production of high and low viscosity dextran by *Leuconostoc mesenteroides* spp. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 3, p. 237-241, 1995.
71. VEDYASHKINA, T. A.; REVIN, V. V.; GOGOTOV, I. N. Optimizing the conditions of dextran synthesis by the bacterium *Leuconostoc mesenteroides* grown in a molasses-containing medium. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 361-364, 2005.
72. ROBYT, J. F.; KIM, D.; YU, L. Mechanism of dextran activation of dextransucrase. **Carbohydrate Research**, v. 266, n. 2, p.293-299, 1995.
73. SETFORD, J. S. Measurement of native dextran synthesis and sedimentation properties by analytical ultracentrifugation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, n. 1, p. 17-24, 1999.
74. SEBATHIE, J.; CHOPLIN, L.; MOAN, M.; DOUBLIER, J. L.; PAUL, F.; MONSAN, P. The effect of synthesis temperature on the structure of dextran NRRL B 512F. **Carbohydrate Polymers**, v. 9, n. 2, p.87-101, 1988.
75. BAZÁN, Juan Heraldo Viloche. **Estudo da produção enzimática de dextrana clínica**. 1993. 136 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1993.
76. SCHWAN, R. F.; MENDONÇA, A. T.; SILVA-JUNIOR, J. J.; RODRIGUES, V.; WHEALS, A. E. Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 79, n. 1, p. 89-96, 2001.
77. KUGE, T.; KOBAYASHI, K.; KITAMURA, S.; TANAHASHI, H. Degrees of long-chain branching in dextrans. **Carbohydrate Research**, v. 160, p. 205-214, 1987.
78. KIM, D.; ROBYT, J. F.; LEE, S. Y.; LEE J. H.; KIM, Y. M. Dextran molecular size and degree of branching as a function of sucrose concentration, pH, and temperature of reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM dextransucrase. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 11, p. 1183-1189, 2003.

79. BeMiller, J. N. In: CABALLERO, B.; TRUGO, L.; FINGLAS, P. **Encyclopedia of food sciences and nutrition**. Oxford: Academic Press, 2003. v. 3, p. 1772.
80. NEUHL, C.; MERSMANN, A. Fractionation of polydisperse dextran using ethanol. **Chemical Engineering Science**, v. 50, n. 6, p. 951-958, 1995.
81. CLARKE, M. A. In: CHEM, J. C. P. **Cane Sugar Handbook**. New York: Wiley-Interscience 1985, cap 35, p. 901.
82. AMERICAN POLYMER STANDARDS CORPORATION. Disponível em: <<http://www.ampolymer.com/DXT.html>>. Acesso em: 07 jun. 2009.
83. NASCIMENTO, R. F.; BEZERRA, C. W. B.; FURUYA, S. M. B.; SCHULTZ, M. S.; POLASTRO, L. R.; LIMA-NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Mineral profile of brazilian cachaças and other international spirits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 12, p. 17-25, 1999.
84. STENEKES, R. J. H.; TALSMA, H.; HENNINK, W. E. Formation of dextran hydrogels by crystallization. **Biomaterials**, v. 22, n. 13, p. 1891-1898, 2001.
85. HIRATA, Y.; AOKI, M.; KOBATAKE, H.; YAMAMOTO, H. Insolubilization of water-soluble dextran. **Biomaterials**, v. 20, n. 4, p. 303-307, 1999.
86. AIZAWA, M.; SUZUKI, S.; KUOKA, T.; NAKAJIMA, N.; IWA O Y. Stability of dextran solutions. **Bulletin of chemical society of Japan**. v. 49, n. 8, p. 2061-2065, 1976.
87. BOOTH M.; SHAW, W.; MORHALO, L. Blending and bottling. In: PIGGOTT, J> R.; PATERSON, A. (Eds.). **The science and technology of whiskies**. New York: Longman Scientific & Technical, 1989, cap 10, p.310-311.
88. SOMSOOK, E.; HINSIN, D.; BUAKHRONG P.; TEANCHAI, R.; MOPHAN, N.; POHMAKOTR, M.; SHIOWATANA. Interactions between iron (III) and sucrose, dextran, or starch in complexes. **Carbohydrate Polymers**, v.61, n. 3, p. 281-287, 2005.

89. SOARES, S.; RODRIGUES, J. F.; ALARIO, A. Study of terbium (III) – dextran and terbium (III) – – methyl glucoside interactions. **Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics** . v. 31, n. 11, p. 1611-1616, 1993.
90. TOLMACHEV, V. N.; LUGOVAYA, Z. A. Interaction of dextran with some transition-metals ions. **Vysokomolekulyarnye Soedineniya Seriya B.** v. 18, n. 7, p. 548-549, 1976.
91. TOLMACHEV, V. N.; LUGOVAYA, Z. A.; MARTIROSYAN, T. M.; ZABORONOK, V. U.; VALAKHANOVICH, A. I. Interaction of dextran with copper, cobalt and nickel ions in solution. **Vysokomolekulyarnye Soedineniya Seriya B.** v. 17, n. 10, p. 756-758, 1975.
92. MORI, Sadao; HOWARD, G Barth. **Size Exclusion Chromatography.** 1 ed. New York: Springer-Verlag, 1999, p 63.
93. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual Operacional de Bebidas e Vinagres. Disponível em:
<http://www.agricultura.gov.br/portal/page?_pageid=33,1040761&_dad=portal&_schema=PORTAL> Acesso em: 12 jun. 2009.
94. PARAZZI, C.; ARTHUR, C. M.; LOPES, J. C.; BORGES, M. T. M. R. Avaliação e caracterização dos principais compostos químicos da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de carvalho (*Quercus* sp.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 193-199, 2008.
95. ODELLO, L.; BRACESCHI, G. P.; SEIXAS, F. R. F.; SILVA, A. A.; GALINARO, C. A.; FRANCO, D. W. Avaliação sensorial da cachaça. **Química Nova**, v. 23, n. 7, p. 1839-1844, 2009.

7. Apêndices

Apêndice A

Localização das usinas de onde foram coletadas as amostras de açúcar durante o período de monitoramentos de 4 safras consecutivas (A1) e Imagens de sensoriamento remoto do mapeamento da área plantada com a cultura de cana-de-açúcar no Paraná (A2) e nos maiores produtores da região sudeste brasileiro São Paulo (A3) e Minas Gerais (A4).

Apêndice A

Fonte: Projeto CANASAT <http://www.dsr.inpe.br/mapdsr/>. Consórcio formado por: Ministério da Ciência e Tecnologia – Divisão de sensoriamento (DSR), Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), Centro de Tecnologia Canaveira (CTC), União da Indústria de cana-de-Açúcar (UNICA), Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA/ESALQ/USP).

Apêndice B

Foto ilustrativa do precipitado oriundo de uma amostra de açúcar obtido após a ultracentrifugação de sua solução durante o procedimento de isolamentos das dextranas nos açúcares e aguardentes analisados.

Neste caso a massa de dextranas obtida foi dissolvida com 5 mL de Na_2SO_4 , e foi dada sequência ao processo anteriormente descrito.

Apêndice C

Curvas de calibração obtidas pelo método do padrão externo utilizadas para a quantificação de dextranas solúveis nos sistemas modelo aguardente-dextrana.

Apêndice D

Área de trabalho do software GPC for Class-Vp 1.02 (Shimadzu), utilizado nos cálculos dos percentuais relativos das dextranas presentes nas amostras de açúcar, após as mesmas terem sido separadas via cromatografia de exclusão por tamanho (Tabela 8).

Na porção direita da figura abaixo encontram-se em destaque o número de cada pico por ordem de eluição, seguido do percentual relativo da dextrana que o originou em relação ao conteúdo de dextranas totais eluídas na amostra. Estes valores foram obtidos por intermédio da curva cumulativa exibida na porção esquerda desta mesma figura.

Apêndice E

Espectro de dispersão de energia de raio-X (EDX) da dextrana $M_w 2,1 \times 10^6$ Da antes e após o período de contato com os metais Ca, Mg, Cu e Fe por 90 dias no sistema aguardente-dextrana-metal.

Precipitado $M_w 2,1 \times 10^6$ Da 90 dias

Padrão $M_w 2,1 \times 10^6$ Da

ANEXO 1

1º Artigo científico originado deste trabalho

TÍTULO: Molecular mass distribution of dextran of in Brazilian sugar and insoluble deposits of cachaça.

PERIÓDICO: Food Chemistry

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.019>

Molecular mass distribution of dextran in Brazilian sugar and insoluble deposits of cachaça

Francisco W.B. Aquino, Douglas W. Franco *

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Avenida do Trabalhador São Carlense 400, CP 780, CEP 13560-970, São Carlos – SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 July 2008

Received in revised form 25 September 2008

Accepted 7 November 2008

Keywords:

Dextran
Sugar cane
Cachaça
SEC

ABSTRACT

The dextran molecular mass distribution profile in 77 sugar samples from Brazil and twelve insoluble deposits (alcoholic flocks) samples from sugared cachaças (Brazilian sugar cane spirit) is described in terms of number-average molecular mass M_n , weight-average molecular mass M_w , Z-average molecular mass M_z , and polydispersity. The analyses were performed by size-exclusion chromatography, using a refractive index detector. In most of the sugar samples, it was possible to identify two major groups of dextrans with M_w averages of 5×10^6 and 5×10^4 Da. Based on the evaluated parameters, the dextran distribution profile is about the same in samples analyzed over five seasons, and, therefore, it is likely that the Brazilian product pattern will not change very much over the years. In insoluble deposits from sugared cachaças, dextrans with M_w values in the order of the 10^5 Da were the most frequent ones, being present in 58% of the samples.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Brazilian sugar production in the 2006/2007 crop season was approximately 30.7 million tons, and the Brazilian southeast region accounted for 26.4 million tons. São Paulo state, which is located in the southeast, accounts for about 70% of the production of its region. The Brazilian northeast region accounts for the remaining 4.3 million tons (Rocha, 2007; Brasil – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2008). The ethanol production in the same period was about 22.2×10^9 m³; and 91.1% of production was in the southeast.

Brazilian sugar cane spirit, which is commonly known as cachaça, is the third most abundant industrial product from sugar cane with an estimated production of 2×10^9 l per year. It is only over-come by vodka and soju productions (Aquino, Boso, Cardoso, & Franco, 2008). At this time, less than 20 million litres of cachaça are exported per year (Aquino et al., 2008; Fernandes et al., 2007).

Today, Brazil is the world's largest sugar cane producer and exporter, respectively accounting for 13% and 45% of the world's production and exportation (ISO – International Sugar Organization, 2007; Rocha, 2007). Brazil is also the largest sugar consumer, with an average *per capita* consumption of 59.4 ± 0.2 kilogrammes within the period 2004 to 2006 (ISO – International Sugar Organization, 2007). Food manufacturers, including those that produce carbonated drinks, chocolate, ice cream, and the like, account for approx-

imately 35–45% of the sugar consumption, while domestic use accounts for the remaining 55–65% (Bolling & Suarez, 2001).

Considering Brazil's large territorial area, the suitable climate for sugar cane production, the accumulated knowledge of sugar cane cultivation, the development of new sugar cane varieties, and the fact that crops are continuously harvested over the year (from April to November in the southeast, and from September to March in the northeast), Brazil is enhancing its production and exportation potential in sugar and sugar cane derivatives (Bolling & Suarez, 2001; Baldani, Reis, Baldani, & Döbereiner, 2002; Rocha, 2007). Therefore, strict quality policies to control sugar cane and its products should be rigorously followed and improved, whenever possible.

The quality of the sugar cane crops supplying the factories is a critical point in production costs and product quality (Eggleston, Legendre, & Tew, 2004; Rauh, Cuddihy, Falgout, & Marquette, 2003). In sugar cane juices, compounds, such as mannitol and isomaltooligosaccharides (Eggleston & Harper, 2006; Eggleston et al., 2004), were suggested as chemical indicators of cane degradation, and, consequently, they have been used to predict and control processing problems in sugar production plants. However, in Brazil, dextran is the most common contaminant indicator used for quality control purposes in the sugar cane industry (Oliveira, Rinaldi, Tamanini, Voll, & Haully, 2002).

Dextran ($C_6H_{10}O_5$)_n is synthesized from sucrose by dextransucrase enzymes which are excreted by microorganisms such as *Streptococcus*, *Lactobacillus* and *Leuconostoc mesenteroides*, the last of these being the predominant species in sugar cane fields. The glucose monomers are predominantly linked by $\alpha(1,6)$ bonds in

* Corresponding author. Tel./fax: +55 16 3373 9976.
E-mail address: douglas@iqsc.usp.br (D.W. Franco).

their major chains with a variable percentage of $\alpha(1,3)$ and occasional $\alpha(1,2)$ or $\alpha(1,4)$ branched linkages (Naessens, Cerdobbel, Soetaert, & Vandamme, 2005). The presence of dextran is associated with operational problems in sugar mills (Jiménez, 2005; Khalikova, Susi, & Korpela, 2005; Rauh et al., 2003; Ravno & Purchase, 2006), and with spoilage in other food industries, such as candy and chocolate manufacture (Edye, 2004; Haynes, Zhou, & Hopkins, 2004; Ravno & Purchase, 2006). Furthermore, since sugar cane is used as a sweetener in alcoholic and soft drinks, the presence of dextran could lead to the formation of haze and precipitations (Edye, 2004; Rodrigues-Filho et al., 2007).

Despite the relevance of the problems caused by the presence of dextrans in sugar in the food and beverage industries, the dextran molecular mass distribution profile in Brazilian processed sugar has not yet been reported. Aiming to contribute to the development of sugar cane technology, we present here the dextran molecular mass distribution profile in Brazilian sugar and isolated insoluble deposits (alcoholic flocks) from sugared cachaças in terms of number-average molecular mass M_n , weight-average molecular mass M_w , Z-average molecular mass M_z , and polydispersity (M_w/M_n) (Chmelík, Chmelíková, & Novotný, 1997; Karmarkar, Garber, Klusa, & Koberda, 2006; Kostanski, Keller, & Hamielec, 2004).

2. Materials and methods

2.1. Samples

A general picture of the dextran molecular mass distribution profile was obtained for the 2006/2007 season by analyzing 25 sugar samples from São Paulo (SP) state, which is the largest producer in the southeast (responsible for 70% of the production in its region), and twelve sugar samples from the northeast. The production sites in São Paulo state and their respective number of samples were: Catanduva (6), Jaboticabal (4), Sertãozinho (2), Quatá (2), Rincão (2), Lençóis Paulista (2), Ribeirão Preto (2), São Carlos (1), Araras (1), Cerquilha (1), Itapira (1), Mococa (1). The samples were provided by Centro de Tecnologia Canavieira – CTC (Piracicaba, SP). The providers of sugar samples from the northeast, which are sugar mills, and their production sites are: Alteza I (Ipojuca, PE), Alteza II (Rio Formoso, PE), Caeté (São Miguel dos Campos, AL), Coruripe cristal (Coruripe, AL), Coruripe demerara (Coruripe, AL), Estrela (Arês, RN), Titara (São Luiz do Quitunde, AL), Sublime (Primavera, PE), Coceal (Vitória da Conquista, BA), Singular (Alvorada, BA), and Padin (Itabuna, BA). Regarding the samples from the northeast, all the sugar mills provided one sugar sample, except for Caeté, which provided two sugar samples.

The possible variations in the dextran molecular weight distribution profile in sugar samples during four consecutive cane crops (seasons 1997/1998, 1998/1999, 1999/2000, 2000/2001), were evaluated in an additional forty samples, which were collected from ten representative sugar mills in the southeast region. These sugar samples from the producers listed were supplied and certified by the Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL (Campinas, SP). The producers were: Alvorada (Araporã, MG), Cresciumal (Leme, SP), Da Pedra (Descalvado, SP), Ipiranga (Descalvado, SP), Santa Rosa (Boituva, SP), São Luiz (Ourinhos, SP), Quatá (Quatá, SP), Santa Adélia (Jaboticabal, SP), Rafard (Rafard, SP), and Jacarezinho (Jacarezinho, PR). Thus, for every season, one sample from each plant was collected.

The insoluble deposits were collected from commercial sugared cachaças available in our Laboratory collection, produced in the following cities: Tanabi (SP), Campina Grande (PB), Patos (PB), Candido Mota (SP), Fortaleza (CE), Colônia de Leopodina (AL), São José dos Pinhais (PR), Jandaia do Sul (PR), São Paulo (SP), Tabatinga (SP), Vitória do Santo Antão (PE), and Sorocaba (SP).

2.2. Chemicals

Dextran calibration reference standards M_w 2,100,000, 4,200,000, 5,900,000 and 7,400,000, were purchased from American Polymer Standards (Mentor, OH, USA), and those of M_w 11,600, 23,800, 48,300, 148,000, 410,000 and 1,100,000 were purchased from Waters (Milford, MA, USA). Ethanol (anhydrous) and sodium sulfate, both ACS grade, were acquired from J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). The water was previously bidistilled and then deionized using a Millipore Milli-Q system (Bedford, MA, USA).

2.3. Apparatus, analytic conditions and sample preparation

Size-exclusion chromatography (SEC) analyses were performed on a Shimadzu liquid chromatography system (Tokyo, Japan), consisting of an SLC-10AVP system controller supporting an LC-10AD pump, a refraction index detector RID-10A and a Rheodyne injection valve with a 100 μ l loop. Data acquisition and processing was performed using Class-VP 6.12 and GPC 1.02 for Class-Vp softwares.

The best chromatographic conditions were achieved under aqueous solutions with 3.55 g of Na_2SO_4 per litre (0.5 ml/min, at room temperature) using three columns assembled in line: two Waters Ultrahydrogel linear (7.8 mm i.d. $\times$ 300 mm) packed with a blend of different pore size particles (ranging from 250 to 2000 Å), and one Tosoh Bioscience TSK-gel 3000PWxl column (7.8 mm i.d. $\times$ 300 mm, pore size of 200 Å).

Stock calibration solutions of dextrans and the dextrose were prepared by separately weighing 20.0 ± 1 mg of the desired standard in 10 volumetric flasks of 5 ml (4000 ppm). The standards in each flask were dissolved and diluted with the mobile phase (0.025 M Na_2SO_4). The calibration curve used to characterize the dextran molecular mass distribution ($\log M = 0.00021109X^3 - 0.03370649X^2 + 1.62437664X + 16.85697652$; dispersion: 0.08151) was built up by injecting 250 ppm of each standard obtained through the dilution of the stock solutions.

For dextran analysis in sugar samples, preparation was carried out as follows: A sample of 40.0 g of the sugar sample was dissolved in water, and then the volume was adjusted to 100 ml in a volumetric flask. 50 ml of this solution were filtered, using filter paper (80 g/m²) to remove insoluble particles. 160 ml of anhydrous ethanol were added to a 40 ml aliquot of the filtered solution. After standing 24 h, this solution was centrifuged at 10,000RPM and 4 °C for 1 h (Hitachi Himac – CR20b2). The supernatant solution was discarded and the precipitate was dissolved in 1.5 ml of 0.025 M Na_2SO_4 . This solution was cooled to 5 °C and filtered through mixed cellulose ester membrane (Millipore – 0.45 μ m pore size $\times$ 25 mm Ø). Previously to the injection in the chromatography system, an aliquot of 0.3 ml was tested with iodine solution for the presence of starch (Aquino & Franco, 2008). The tests were all negative.

The insoluble deposits from sugared cachaças were collected directly from the bottles. For the SEC analysis, the deposits were separated from the cachaça through centrifugation at 10,000RPM at 4 °C for 1 h. The precipitate was then dissolved in 0.50 or 1.00 ml of 0.025 M Na_2SO_4 according to the it is amount, and filtered through the same type of membrane, as described above.

3. Results and discussion

A typical SEC dextran chromatogram obtained for a sugar sample, is illustrated in Fig. 1. In this chromatogram, two distinct peaks can be observed at the retention times of 47 and 61 min for dextrans. As will be discussed in this paper, this pattern has often been found in sugar samples used by Brazilian cachaça producers.

Fig. 1. Size-exclusion chromatogram of a sugar sample, where peak 1 corresponds to a dextran with M_w 4.23×10^6 Da and peak 2 corresponds to a dextran with M_w 8.10×10^4 Da.

The average values for the dextran characterization parameters are summarized in Tables 1 and 2. Considering that the M_w is one of the most used parameters as a reference to dextran polymers, the dextrans were arbitrarily classified into three groups according to their M_w : dextrans with $M_w > 1$ million – Group 1 (high molecular weight), $1 \text{ million} > M_w > 85,000$ – Group 2, and $M_w < 85,000$ – Group 3 (lower molecular weight or clinical dextrans).

The predominant presence of bi-modal molecular weight distribution (Fig. 1) is observed in 83.3% of the northeast and 84% of the southeast sugar samples. The presence of a single dextran was observed in two sugar samples from the northeast (samples 8 and 9) and in only one from the southeast (sample 20). Only in three samples from the southeast (samples 2, 11, and 18) was it possible to observe a tri-modal molecular mass distribution.

According to the literature, the dextrans of the Groups 1 and 3 are typically formed by the *Leuconostoc mesenteroides* bacterium, which is endogenous and largely found in sugar cane fields (Jiménez, 2005; Shamala & Prasad, 1995; Vedyashkina, Revin, & Gogotov, 2005).

The explanation of the low occurrence of the dextrans from Group 2 in all samples may be the fact that dextrans with M_w up to 10^6 Da are quickly formed during the dextransucrase consumption of sucrose, making the dextrans from Group 1 stable aggregations of dextrans with true M_w values of $10^4 - 5 \times 10^5$ Da (Robyt, Kin, & Yu, 1995; Setford, 1999). Thus, the detected dextrans from Group 2 would only correspond with the remaining non-clustered ones. Another likely hypothesis would be the action of other strains of *Leuconostoc* and other bacteria, such as *Lactobacillus*, which are also found in Brazilian sugar cane fields (Oliveira et al., 2002; Schwan, Mendonça, Silva-Jr, Rodrigues, & Wheals, 2001),

Table 2

Average of dextran molecular mass distribution from the same producers in the period 1997/1998–2000/2001.

Dextran	Southeast region mean of data along the time		
	Group 1	Group 2	Group 3
M_n	2.94×10^6	1.83×10^5	5.88×10^4
M_w	4.60×10^6	2.09×10^5	6.59×10^4
M_z	6.26×10^6	2.39×10^5	7.54×10^4
Polydispersity	1.56	1.14	1.12

Total of 40 samples. One sample from 10 different mills, collected annually over four crop seasons: 1997/1998, 1998/1999, 1999/2000, 2000/2001.

resulting in the origin of distinct dextrans. These two factors combined could explain the large variation of the mass distribution values determined in the dextrans of Group 2.

The presence of dextrans with M_w around 5.0×10^6 Da, is frequently found in cane juice and sugar originating from canes in some state of deterioration (Brown & Inkerman, 1992). This condition would be favoured by temperatures higher than 25°C , which will enhance the dextransucrase enzyme activity (Choplin, Moan, Doublier, Paul, & Monsan, 1988; Goyal, Nigam, & Katiyar, 1995). These temperatures are often observed in northeastern sugar fields. Based on the relative abundance of the dextrans from Group 1, it would be tempting, at first, to associate the percentage of these dextrans with the quality of the original sugar cane juice or the geographic origin of the sugar. Although this is partially true, this assumption should be made with care because these dextran levels are certainly also influenced by other aspects, such as the harvest type (manual or mechanical), or the technological process of making the sugar in the mills (Jiménez, 2005; Oliveira et al., 2002; Ravno & Purchase, 2006).

The one-way ANOVA test was applied to the complete data set of dextran molecular mass distribution and their relative abundance, aiming to evaluate the possibility of using the data to obtain regional distributions. This result only shows significant differences between northeastern and southeastern dextrans for polydispersity and relative proportion of the dextrans from Group 1. In agreement with ANOVA, the principal component analysis (PCA) and the hierarchical cluster analysis (HCA) did not supply a satisfactory pattern to highlight significant differences between the sugars from these two regions.

The variation of dextran molecular mass distribution profile throughout four consecutive crops was also analyzed in sugar mills from the southeast. As mentioned previously, most of the Brazilian sugar mills are concentrated in this region. The average data are presented in Table 2.

The predominant presence of bi-modal molecular weight distribution applies during the four consecutive crop seasons, being detected in 82.5% of the sugar samples (33 samples). In only one sample (sample 30), was it possible to observe the presence of three different dextrans; and in 7.5% of the sugar samples (samples

Table 1

Average of the characterization parameters of dextran molecular mass distribution in Brazilian sugars during the 2006/2007 crop season.

Dextran	Northeast region			Southeast region		
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 1	Group 2	Group 3
M_n	3.77×10^6	9.03×10^4	4.30×10^4	3.39×10^6	2.72×10^5	4.17×10^4
M_w	5.04×10^6	1.03×10^5	4.79×10^4	5.03×10^6	3.26×10^5	4.91×10^4
M_z	6.11×10^6	1.28×10^5	5.41×10^4	7.17×10^6	4.15×10^5	5.90×10^4
Polydispersity	1.34	1.14	1.11	1.48	1.19	1.17

Number-average molecular mass: $M_n = \sum n_i M_i / \sum n_i$, where n_i represents a number of polymer chains with mass M_i .

Weight-average molecular weight: $M_w = \sum n_i M_i^2 / \sum n_i M_i$.

Z-average molecular mass: $M_z = \sum n_i M_i^3 / \sum n_i M_i^2$.

Polydispersity = M_w/M_n , where this term is used to describe the width of molecular mass distribution of the dextrans.

Table 3

Dextran molecular mass distribution in insoluble deposits from sweetened cachaças.

Sample code	Molecular weight distribution of dextrans in flocks from sugared Cachaça											
	Dextran (range 10^6 Da)				Dextran (range 10^5 Da)				Dextran (range 10^4 Da)			
	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n	M_n	M_w	M_z	M_w/M_n
1									3.40×10^4	3.53×10^4	3.92×10^4	1.04
2	1.48×10^6	1.60×10^6	1.72×10^6	1.08								
3	4.98×10^6	5.79×10^6	6.63×10^6	1.16	2.78×10^5	3.80×10^5	4.75×10^5	1.36				
4					6.36×10^5	8.13×10^5	1.03×10^6	1.28				
5					7.5×10^4	1.79×10^5	3.48×10^5	2.38				
6					5.19×10^5	6.54×10^5	7.94×10^5	1.26				
7									1.96×10^4	2.14×10^4	2.37×10^4	1.09
8	1.25×10^6	1.99×10^6	2.90×10^6	1.58								
9					1.88×10^5	1.95×10^5	2.03×10^5	1.04				
10					1.40×10^5	1.49×10^5	1.60×10^5	1.06				
11					4.41×10^5	4.85×10^5	5.35×10^5	1.10				
12									2.35×10^4	3.67×10^4	6.29×10^4	1.56

5, 20, and 23), only one dextran was detected. No dextran was found in 3 other sugar samples (samples 11, 15, and 31).

Regarding the dextran polydispersity index (M_w/M_n), which is a measure of the width of a molecular mass distribution, the results are always greater than unity (Alsop & Vlachogiannis, 1982; Chmelík et al., 1997). As can be observed in Tables 1 and 2, the calculated polydispersity in progressive reduction from Group 1 to Group 3 is in agreement with the data generally reported in the literature.

The dextran distribution profiles in terms of M_n , M_w , M_z , and polydispersity, are about the same for the 77 samples analyzed over the five seasons, and, therefore, it is likely that the Brazilian product pattern will not change much over the years.

It is universally accepted that dextran solubility in ethanolic solutions is highly dependent on their molecular weight, and it decreases as a function of the increase of ethanol concentration. This is the basis of the two most used methodologies for dextran analyses: the haze method, in which only low M_w dextrans are analyzed after the precipitation with 50% ethanol (v/v), and the method described by Robert, where the totals of dextrans are precipitates in 80% (v/v) of alcohol (Ravno & Purchase, 2006).

As reported previously by Rodrigues-Filho et al. (2007), based on the total soluble dextran analysis, mass of precipitation formed, and turbidimetric measurements, the precipitation does not occur immediately after the sugar addition, however, it takes place with a half life of around seventy days at $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$. Thus, the ethanol content in the Brazilian cachaça, usually around 40% (v/v), would explain why the dextrans are not fully precipitated just after the addition of sugar to the cachaça.

The non-uniformity of the filtering process by the producers also accounts for part of the problem. Usually, with the small producers, the filtering is not as efficient as in the industrial distilleries. In the first case, this operation is only suitable for separating large materials, such as insoluble particles of the sugar itself, small pieces of wood from the standardization tanks, and fragments from the casks.

In Brazil, when the cachaça is of the sugared type, around 10 g/l of sugar is usually added to the spirit. According to experimental data from our laboratory, the median values of total dextrans in the sugar typically used by Brazilian producers of cachaça are 820 mg/kg, thus, leading to a final dextran concentration of 8.2 mg/l. However, according to our data, 0.5 mg/l of dextrans in cachaça is already enough to yield a perceptible formation of insoluble deposits (Rodrigues-Filho et al., 2007).

Experiments carried out in our laboratory, under optimized conditions, showed that the filtering is not totally efficient for addressing the deposit formation problem. For dextrans with M_w around 5×10^6 Da, efficiency of retention at 4°C is near 80%

whereas, for the dextrans from Groups 2 and 3, the results were clearly unsatisfactory, showing retention values smaller than 50% (Aquino & Franco, 2008). The contribution of the dextrans from Group 1 in analyzed deposits is only around 25%, which is expected since they are easily separated by filtering.

Considering that the analyzed deposits were not precipitated immediately by the ethanol addition, the predominance of dextrans from Group 2 in the samples (Table 3) is consistent with the considerations discussed above.

In addition to the bottled storage time factor, the insoluble deposits can also be generated through combinations among dextrans and other components of cachaça, for example metal ions, amino acids and phenolic compounds originating from blending. Possible alterations in the dextran structures by acidity of spirit and light incidence can contribute to the formation of insoluble aggregates. This is a subject currently under investigation in our laboratory. The model systems and results will be reported later.

4. Conclusions

The dextran molecular mass distribution profile in Brazilian sugar used by cachaça producers and the insoluble deposits from this spirit are reported for the first time.

The analyzed sugar samples exhibited predominantly the same two dextran groups, with M_w averages of 5.04×10^6 ; 4.79×10^4 and 5.03×10^6 ; 4.91×10^4 Da for the northeastern and southeastern samples, respectively. Eventually, a third dextran group with M_w average of 1.03×10^5 – 3.26×10^5 was found for northeastern and southeastern sugars. This profile holds for the analyzed samples in the other four seasons crops also analyzed.

Despite the fact that dextrans with M_w average in the order of 10^5 Da are less abundant in sugar samples, these dextrans are present in about 58% of the deposit samples.

Acknowledgements

The authors would like to thank CNPq, CAPES and FAPESP for the financial support, Elmo da Silva (Centro de Tecnologia Canavieira – Piracicaba SP) and Roberto Machado de Moraes (Instituto de Tecnologia de Alimentos – Campinas SP) for sugar samples, and Mrs. Margareth Piggott for reviewing the English of this manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.foodchem.2008.11.019.

References

- Alsop, R. M., & Vlachogiannis, R. M. (1982). Determination of the molecular weight of clinical dextran by gel permeation chromatography on TSK PW type columns. *Journal of Chromatography A*, 246(2), 227–240.
- Aquino, F. W. B., Boso, L. M., Cardoso, D. R., & Franco, D. W. (2008). Amino acids profile of sugar cane spirit (cachaça), rum, and whisky. *Food Chemistry*, 108(2), 784–793.
- Aquino, F. W. B., & Franco, D. W. (2008). Dextranas em açúcares do estado de São Paulo. *Química Nova*, 31(5), 1034–1037.
- Baldani, J. I., Reis, V. M., Baldani, V. L. D., & Döbereiner, J. (2002). A brief story of nitrogen fixation in sugarcane – reasons for success in Brazil. *Functional Plant Biology*, 29(4), 417–423.
- Brown, C. F., & Inkerman, P. A. (1992). Specific method for quantitative Measurement of the total dextran content of raw sugar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(2), 227–233.
- Chmelík, J., Chmelíková, J., & Novotný, M. V. (1997). Characterization of dextrans by size-exclusion chromatography on unmodified silica gel columns, with light-scattering detection, and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 790(1–2), 93–100.
- Choplin, J. S. L., Moan, M., Doublier, J. L., Paul, F., & Monsan, P. (1988). The effect of synthesis temperature on the structure of dextran NRRL B512F. *Carbohydrate Polymers*, 9(2), 87–101.
- Edye, L. A. (2004). Sugar quality in soft drink manufacture: The acid beverage flock problem. In F. Shahidi, A. M. Spanier, Chi-Tang Ho, & T. Braggins (Eds.), *Quality of fresh and processed foods. Advances in experimental medicine and biology* (Vol. 542, pp. 317–326). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Eggleston, G., & Harper, W. (2006). Determination of sugarcane deterioration at the factory: Development of a rapid, easy and inexpensive enzymatic method to measure mannitol. *Food Chemistry*, 98(2), 366–372.
- Eggleston, G., Legendre, B., & Tew, T. (2004). Indicators of freeze-damaged sugarcane varieties which can predict processing problems. *Food Chemistry*, 87(1), 119–133.
- Fernandes, W. J., Cardoso, M. G., Vilela, F. J., De Moraes, A. R., Silva, V. F., & Nelson, D. L. (2007). Physicochemical quality of a blend of domestic cachaças from the south of Minas Gerais. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3–4), 257–261.
- Goyal, A., Nigam, M., & Katiyar, S. S. (1995). Optimal conditions for production of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F and its properties. *Journal of Basic Microbiology*, 35(6), 375–384.
- Haynes, L., Zhou, N., & Hopkins, W. (2004). Dextran in, refined sugar: Impact on hard candy processing. In *Proceedings of the 2004 conference on sugar processing research institute* (pp. 138–146). Atlanta: Verlag.
- ISO (International Sugar Organization) (2007). 2007 *ISO Sugar year book* (p. 372). ISBN 978-92-990045-0-0. London: International Sugar Organization.
- Jiménez, E. R. (2005). The dextranase along sugar-making industry. *Biocombustíveis Aplicados*, 22(1), 20–27.
- Karmarkar, S., Garber, R., Klusa, J., & Koberda, M. (2006). Gel permeation chromatography of dextrans in parenteral solutions: Calibration procedure development and method validation. *Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis*, 41(4), 1260–1267.
- Khalikova, E., Susi, P., & Korpela, T. (2005). Microbial dextran hydrolyzing enzymes: Fundamentals and applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(2), 306–325.
- Kostanski, L. K., Keller, D. M., & Hamielec, A. E. (2004). Size-exclusion chromatography—a review of calibration methodologies. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 58(2), 159–186.
- Naessens, M., Cerdobbel, A., Soetaert, W., & Vandamme, E. J. (2005). *Leuconostoc dextranase* and dextran: Production, properties and applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80(8), 845–860.
- Oliveira, A. S., Rinaldi, D. A., Tamanini, C., Voll, C. E., & Haully, M. C. O. (2002). Factors that interfere in dextran production by sugarcane contaminating microorganisms. *Semina – Ciências Exatas e Tecnológicas*, 23(1), 99–104.
- Rauh, J. S., Cuddihy, J. A., Falgout, R. N., & Marquette, M. L. (2003). Dextran test method provides versatility for sugar factory process monitoring. *International Sugar Journal*, 105(1251), 100–103.
- Ravno, A. B., & Purchase, B. S. (2006). Dealing with dextran in the South Africa sugar industry. *International Sugar Journal*, 108(1289), 255–269.
- Robyt, J. F., Kin, D., & Yu, L. (1995). Mechanism of dextran activation of dextranase. *Carbohydrate Research*, 266(2), 293–299.
- Rocha, L. B. (2007). Brazil's impact on the world sugar market: An overview and challenges for the industry. *International Sugar Journal*, 109(1305), 541–549.
- Rodrigues-Filho, M. G., Leite Neto, A. F., Aquino, F. W. B., Plepis, A. M. G., Rodrigues Filho, U. P., & Franco, D. W. (2007). Quantificação de Dextranas em Açúcares e em Cachaças. *Química Nova*, 30(5), 1115–1118.
- Schwan, R. F., Mendonça, A. T., Silva-Jr, J. J., Rodrigues, V., & Wheals, A. E. (2001). Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79(1), 89–96.
- Setford, S. J. (1999). Measurement of native dextran synthesis and sedimentation properties by analytical ultracentrifugation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74(1), 17–24.
- Shamala, T. R., & Prasad, M. S. (1995). Preliminary studies on the production of high and low viscosity dextran by *Leuconostoc* spp. *Process Biochemistry*, 30(3), 237–241.
- Vedyashkina, T. A., Revin, V. V., & Gogotov, I. N. (2005). Optimizing the conditions of dextran synthesis by the bacterium *Leuconostoc mesenteroides* grown in a molasses-containing medium. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41(4), 361–364.

Further reading

- Bolling, C., Suarez, N. R. (2001). *The Brazilian sugar industry: Recent developments. Sugar and Sweetener Outlook*. September/2001. (p.17). <<http://www.ers.usda.gov/briefing/Brazil/braziliansugar.pdf>>.
- MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento) 2008. *Estatísticas*. <http://www.agricultura.gov.br/portal/page?_pageid=33,969861&_dad=portal&_schema=PORTAL>.