UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

O NITROGÊNIO PROTÉICO NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA E SUA INFLUÊNCIA NA QUALIDADE DA CACHAÇA

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos

Elisangela Marques Jeronimo
Engenheira Agrônoma

Orientador: Prof. Dr. Gil Eduardo Serra

Campinas - SP
2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Jeronimo, Elisangela Marques
J393n O nitrogênio protéico na fermentação alcoólica e sua influência na qualidade da cachaça. / Elisangela Marques Jeronimo. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Gil Eduardo Serra
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Fermentação alcoólica. 2. *Saccharomyces*. 3. Cachaça. 4. Avaliação sensorial. I.Serra, Gil Eduardo. II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

_____
Prof. Dr. Gil Eduardo Serra
FEA/UNICAMP
Orientador

_____
Profa. Dra. Dejanira Franceschi de Angelis
IB/UNESP
Membro

_____
Profa. Dra. Maria Das Graças Cardoso
DQI/UFLA
Membro

_____
Profa. Dra. Evelyn de Souza Oliveira
FF/UFMG
Membro

_____
Profa. Dr. Lúcia Regina Durrant
FEA/UNICAMP
Membro

_____
Profa. Dra. Márcia Edilamar Pulzatto
UNIBH
Membro

_____
Profa. Dra. Helena Maria André Bolini
FEA/UNICAMP
Membro

HOMENAGEM

Ao Prof. Dr. Gil Eduardo Serra, por ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho, pelos ensinamentos transmitidos com dedicação, consideração e respeito e pela preciosa amizade, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela presença constante em minha vida.

À minha família, pelo apoio, paciência e afeto, sempre.

Ao Reynaldo, por me incentivar, acreditar em mim e por tudo que representa na minha vida.

À amiga Evelyn, por despertar meu interesse no estudo de cachaça e transmitir seus conhecimentos.

Ao Leonel, pela amizade e pelo amparo nas análises químicas.

Ao Sr. Alexandre Babetto, por transmitir sua experiência em produção de cachaça.

Às técnicas Ana Koon e Priscila pela atenção, colaboração e preciosa amizade.

À Ana Lourdes, pelo auxílio prestado na microbiologia.

Ao funcionário Adauto, pela colaboração na etapa piloto.

À Profa. Dra. Helena Maria A. Bolini, pela colaboração no estudo sensorial.

Ao Engenheiro Agrônomo Elson Luiz Rocha de Souza, responsável pelo Laboratório de Bebidas e Vinagres - MAPA, Angradas/MG, pela colaboração na análise de componentes secundários.

À Rosane e ao Flávio, pela inestimável amizade, acolhida e incentivo.

Às queridas amigas que encontrei no Laboratório de Frutas/DTA: Patrícia Prati, Maria Fernanda, Dani Degrandi, Fer Ventura, Ana Vânia, Carol Reis, Ká Fontes, Gisele, Rafa, Alê, Juliana, Simoni e ao Paulo, pela agradável convivência e pela troca de experiências.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos - UNICAMP.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo suporte financeiro ao projeto que originou este trabalho.

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO..... viii
SUMMARY..... x
1. INTRODUÇÃO..... 1
Capítulo 1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL 4
2.1.Caracterização da Cachaça..... 4
2.2. Matéria-prima..... 5
2.3. Caldo de cana: Clarificação..... 7
2.4. Processos de Produção de Cachaça..... 8
2.5. Características de Crescimento e Cinéticas da Levedura..... 9
2.6. Leveduras na Produção de Aguardente de Cana e Outras Bebidas Alcoólicas..... 13
2.7. Nitrogênio Protéico no Caldo..... 15
2.8. Fermentação Alcoólica: Etanol e Compostos Secundários..... 19
2.9. Ácidos Orgânicos..... 20
2.10. Ésteres..... 22
2.11. Aldeídos..... 22
2.12. Álcoois Superiores..... 23
2.13. Cobre..... 24
2.14. Metanol..... 25
2.15. Destilação..... 25
2.16. Métodos de Análise Sensorial..... 28
2.17. Avaliação Sensorial de Cachaça..... 29
2.18. Referências Bibliográficas..... 32
Capítulo 2
EFEITO DE NITROGÊNIO PROTÉICO NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA
Resumo..... 48
Summary..... 49

1. Introdução..... 50
2. Material e Métodos..... 53
3. Resultados e Discussões..... 55
4. Conclusões..... 65
5. Referências Bibliográficas..... 65
Capítulo 3
PERFIL SENSORIAL DE AGUARDENTE DE CANA EM FUNÇÃO DA DILUIÇÃO E VARIAÇÃO DA ACIDEZ DA AMOSTRA
Resumo..... 70
Summary..... 70
1. Introdução..... 71
2. Material e Métodos..... 74
3. Resultados e Discussões..... 77
4. Conclusões..... 87
5. Referências Bibliográficas..... 87
Capítulo 4
ADIÇÃO DE NITROGÊNIO PROTÉICO NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE CALDO DE CANA PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA
Resumo..... 90
Summary..... 91
1. Introdução..... 91
2. Material e Métodos..... 93
3. Resultados e Discussões..... 97
4. Conclusões..... 113
5. Referências Bibliográficas..... 113
3. CONCLUSÕES GERAIS..... 118

RESUMO

Estudos de complementação nitrogenada em fermentação alcoólica têm sido conduzidos utilizando adubos nitrogenados como sulfato de amônia, superfosfato simples e uréia, e dirigidos para a produção de álcool. Nas destilarias artesanais de aguardente a complementação nitrogenada do mosto pode constituir uma prática benéfica na multiplicação e no crescimento celular do fermento, e consequentemente para a melhoria dos índices de eficiência, rendimento e produtividade do processo. Fontes nitrogenadas minerais, bastante empregadas, mostram resultados muitas vezes controversos. Estudos verificaram que a oferta de fonte complexa de nitrogênio, como extrato de levedura, influenciou o rendimento em etanol, massa celular e outros parâmetros da fermentação alcoólica. O objetivo da primeira etapa deste estudo foi avaliar os tratamentos para clarificação do caldo de cana sobre o teor de nitrogênio protéico, estudar a influência da adição de nitrogênio protéico, em fermentações em escala de laboratório, com uma linhagem selecionada de *S. cerevisiae*, sobre alguns parâmetros fermentativos e sobre a formação de compostos secundários, em escala de laboratório. Verificou-se que a clarificação comprometeu a multiplicação celular, sem afetar a viabilidade, o que pode afetar o reaproveitamento do fermento para novas bateladas de fermentação. A adição de nitrogênio protéico influiu positivamente na manutenção da viabilidade celular, podendo assim propiciar melhor qualidade do fermento reciclado; alterou a formação de álcoois superiores, aumentando a formação de propanol e reduzindo a de isobutanol e de álcool isoamílico. O benefício da adição de N protéico também ocorreu na redução do tempo de fermentação. Portanto, a complementação do mosto de caldo de cana com N protéico que contenha formas assimiláveis é recomendada. Considerando a importância da análise sensorial na avaliação e pesquisa da qualidade de aguardentes, o trabalho incluiu um estudo da influência da concentração alcoólica e da acidez no perfil de percepção sensorial de aguardente de cana pelos provadores, detectando igualdades ou diferenças na avaliação

sensorial de atributos típicos de aroma e sabor do produto. Foi utilizada uma aguardente recém-destilada, que foi submetida a diluição e acidificação com ácido succínico, originando quatro amostras para provas. Concluiu-se que a concentração alcoólica e a acidez não influíram na avaliação sensorial dos atributos típicos da aguardente. A diluição da aguardente não contribui para a maximização da percepção de diferenças entre duas amostras, nem tampouco a variação da acidez mascara a expressão sensorial dos atributos devidos aos componentes secundários da aguardente representados principalmente por aldeídos, álcoois superiores, ésteres e ácidos orgânicos. Com base nos resultados de fermentação alcóolica obtidos na etapa de laboratório, foi delineado um experimento com o objetivo de avaliar a adição de nitrogênio protéico no caldo de cana sobre o crescimento da levedura, tempo e características da fermentação, e qualidade química e sensorial da cachaça. Outro aspecto foi avaliar o efeito da adição de N protéico em fermentações conduzidas com duas linhagens de levedura isoladas de destilarias de cachaça artesanal, e a condução de fermentações com reciclo da levedura decantada, em escala piloto simulando o processo artesanal de produção de cachaça. Verificou-se que a adição de nitrogênio protéico influiu positivamente na manutenção da viabilidade celular, podendo assim propiciar melhor qualidade do fermento reciclado. Também se observou redução no tempo de fermentação. A adição de nitrogênio protéico ao mosto para a produção de cachaça não interferiu na aceitação sensorial da bebida. A análise dos componentes secundários não mostrou alteração consistente como resposta à aplicação de N protéico. A complementação do mosto de caldo de cana com N protéico em formas assimiláveis pela levedura, pode ser uma prática útil na otimização do processo de fermentação alcoólica para produção de cachaça.

Palavras-chave: fermentação alcoólica; clarificação do caldo; nitrogênio protéico; levedura; *Saccharomyces*; compostos voláteis; cachaça; análise sensorial; aguardente.

SUMMARY

Studies on the addition of nitrogen source in alcoholic fermentation have been conducted using nitrogen fertilizers as ammonium sulphate, superphosphates and urea, but applied for alcohol production. In small sugarcane distilleries the sugarcane juice complementation with nitrogen can constitute a benefical practice in yeast multiplication and cellular growth, and also for the improvement of fermentation yield and productivity. Mineral nitrogen sources, many times show controversial results. Several authors verified that the a nitrogen complex source, influenced the ethanol yield, yeast biomass and other alcoholic fermentation parameters. The goal of this work is to evaluate the influence of sugarcane juice clarification on proteic nitrogen content of juice, and by otherhand the addition of proteic nitrogen souce - yeast extract on the fermentation parameters and volatile compounds produced. The sugarcane juice clarification reduced the cellular multiplication, without affecting the cell viability, and endanger yeast recycling for a new fermentation. The proteic nitrogen additions enhanced cellular viability and ensure yeast recycling operation. Higher levels of proteic nitrogen affected the synthesis of volatile superior alcohols, increasing propilic formation and reducing isobutilic and isoamilic alcohol. Proteic nitrogen addition also reduced fermentation time. Considering the sensory analysis importance in the brandies quality evaluation and research, the work included a study for to investigate the alcoholic concentration influence and of the acidity in the sugarcane liquor sensory perception profile by the provers, about the equalities or differences detection in the product aroma and flavor typical attributes sensory evaluation. It was going used a sugarcane spirit recently-distillate, which was going submitted at dilution and acidification with succinic acid, originating four samples for proofs. It concluded that the alcoholic concentration and the acidity didn't influence the brandy typical attributes sensory evaluation. The sugar cane spirit dilution doesn't contribute for greatest of the differences perception between two samples, neither at acidity variation masked the attributes sensory expression due to the represented

sugarcane liquor secondary components mostly for aldehyde, superior alcohols, esters and organics acid. Finally, also was study the proteic nitrogen influenced positively the cell viability, and can ensure yeast recycling operation. It was also observed a reduction in fermentation time. The proteic nitrogen addition in the juice didn't affect the sensory acceptance of sugarcane liquor, and also didn't result in different levels of volatile compounds. Assimilable forms of proteic nitrogen can be helpfull on the optimization of alcoholic fermentation.

Key words: ethanol fermentation; juice clarification; proteic nitrogen; yeast; *Saccharomyces*; cachaça; volatile compounds; sensory analysis, sugarcane liquor.

1 - INTRODUÇÃO GERAL

A produção de cachaça no Brasil está buscando uma imagem fortemente vinculada à qualidade da bebida e investindo no desenvolvimento de um mercado consumidor mais exigente, de modo a diversificar e desvincular-se parcialmente de sua linha tradicional de bebida popular. Neste sentido, principalmente os pequenos e médios produtores já se estruturaram e conseguiram resultados, colocando no mercado aguardentes de qualidade, abrindo espaço para consumidores diferenciados e exportação do produto. Essa cachaça de qualidade tem permitido a agregação de valor ao seu preço ao consumidor, remunerando e permitindo um ciclo de expansão aos produtores artesanais. Um exemplo concreto é encontrado na iniciativa de produtores tradicionais de Minas Gerais, que se organizaram e fundaram a AMPAQ - Associação Mineira de Produtores de Aguardente de Qualidade, que instituiu um "selo de qualidade" para orientação e garantia do consumidor.

Segundo as notícias de mercado divulgadas em 2002, o agronegócio da cachaça no Brasil vive um momento de grande expectativa com o reconhecimento da cachaça como a bebida tipicamente brasileira. Isto é, além de globalizar a marca "Cachaça", remove o preconceito contra a bebida e abre para o Brasil grandes oportunidades de negócio nos mercados interno e externo.

A fermentação para obtenção de cachaça em pequenos e médios produtores artesanais, é conduzida pelo processo de cortes e/ou decantação, com duração de cerca de 30 horas. Esse tempo é substancialmente maior que o de 8 a 10 horas de destilarias de álcool que operam com o processo de separação de células com centrifugação e seu reaproveitamento.

Cardello & Faria (1998), pesquisadores bastante envolvidos com estudos de produção e qualidade da cachaça, destacam que apesar da importância econômica e social da aguardente brasileira, são ainda muito escassos os estudos sobre sua qualidade sensorial. Porém, as crescentes exigências do mercado têm feito crescer a preocupação com a qualidade dessa bebida.

Estatísticas oficiais sobre a produção de cachaça no Brasil são pouco acessíveis e divulgadas. Dados divulgados em 2002 pela Associação Brasileira de Bebidas - ABRABE indicam que a produção nacional é de aproximadamente 1,3 bilhões de litros/ano e a quantidade exportada é de cerca de 14,8 milhões de litros/ano. Isso mostra que mercado de cachaça no Brasil está consolidado, apresentando baixas taxas de crescimento, estando sua evolução de mercado atrelado ao crescimento vegetativo da população. Este fato faz com que o setor necessite ampliar sua atuação nos mercados mundiais, com o objetivo de ampliar o seu faturamento, rentabilidade e principalmente fortalecer a sua imagem no mercado interno.

O aumento no consumo da cachaça de qualidade e a exportação exigem que o processo de fabricação dessa bebida seja baseado em práticas criteriosamente determinadas para obtenção de um produto padronizado e com qualidade comprovada nos aspectos físico-químicos e sensoriais (CARDOSO, 2001).

A cachaça, diferente de outras bebidas destiladas (por exemplo, uísque) não tem um padrão definido de preferência e qualidade pelos consumidores, mesmo porque os consumidores de “cachaça” apresentam uma maior variabilidade sociocultural. Ou seja, entre os consumidores que apreciam cachaça encontram-se facilmente divergências profundas ao degustar a mesma. Os uísques “de qualidade” apresentam um comportamento mais uniforme de apreciação entre consumidores dessa bebida.

Considerando todos estes aspectos, este trabalho teve por objetivo estudar o efeito da clarificação do caldo de cana por simples aquecimento, tal como o procedimento adotado por alguns fabricantes de aguardente, e a influência do teor de nitrogênio do mosto no processo fermentativo e qualidade da bebida. Outro aspecto foi avaliar duas diferentes linhagens de leveduras isoladas em produtores de aguardente quanto as características fermentativas. Considerando a importância da análise sensorial na avaliação e pesquisa de qualidade de cachaça, o trabalho incluiu um estudo de fatores básicos, como o teor alcoólico e acidez da bebida, visando a condução da avaliação sensorial em condições as

mais adequadas possíveis para identificação e percepção de diferenças sensoriais. O trabalho foi conduzido primeiramente em escala de laboratório e contemplou variáveis que definiram condições mais adequadas de tratamento do caldo de cana e preparo do mosto para fermentação. A partir dos resultados obtidos nesta etapa, foi conduzido o trabalho em escala piloto, delineado para a condução de fermentações em batelada, visando avaliar o efeito da adição de N protéico na manutenção da viabilidade da levedura, simulando a prática nas unidades produtoras, e verificar a influência destes procedimentos na composição e na qualidade sensorial da cachaça recém-destilada.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL

2.1. Caracterização da Cachaça

O Decreto Federal 4.851 de 02/10/2003 dá nova redação ao artigo 91 do Decreto Federal 2.314 de 04/09/1997. Mantém a denominação e especificação da aguardente de cana no artigo 91, todavia não mais equiparando como sinônimos a aguardente e a cachaça, ao dar nova definição da cachaça no artigo 92. Estabelece que a cachaça apresenta graduação alcoólica de 38 a 48 por cento de etanol em volume a 20°C, portanto em amplitude menor que a aguardente de cana (38 a 54 por cento de etanol em volume a 20°C). Desta forma, o Decreto 4.851 permite a adoção do termo cachaça apenas para as aguardentes de cana enquadradas na especificação apresentada.

Assim a denominação cachaça tornou-se mais específica do que aguardente de cana, e veio ajustar o uso da expressão cachaça de forma a complementar a legislação frente ao Decreto 4.062 (21/12/2001) editado em vista do disposto no artigo 22 do Acordo sobre Aspectos dos Direitos de Propriedade Intelectual relacionados ao Comércio, como parte integrante do Acordo de Marraqueche. Esse Decreto estabelece o nome cachaça como expressão protegida e restrita para uso dos produtores estabelecidos no Brasil.

A cachaça, tal como a aguardente de cana, deve se enquadrar nos Padrões de Identidade e Qualidade de Bebidas, conforme o Decreto Federal 2.314 de 04/09/1997 (BRASIL, 1997), que especifica que os componentes secundários voláteis (soma de aldeídos, ácidos voláteis, ésteres, furfural e álcoois superiores) não podem ser inferiores a 200mg/100mL de álcool anidro. Qualitativamente, os principais componentes do sabor da aguardente são os mesmos encontrados nas demais bebidas alcoólicas (MAIA, 1994). O Decreto 4.851 de 02/10/2003 mantém o limite mínimo de componentes secundários voláteis de 200mg/100mL de álcool anidro. O teor máximo de metanol permitido é 200mg/100mL do produto e o conteúdo de cobre não deve ultrapassar a 5mg/L do produto (BRASIL, 1997).

Os parâmetros de qualidade são escassos, a legislação em vigor pouco rege sobre este atributo, estabelecendo limites para garantia da saúde pública, e pouco se refere à qualidade global do produto (RIBEIRO & HORII, 1997).

Segundo Franco (2001) a conquista de mercados externos, o esclarecimento do consumidor brasileiro e a disponibilidade de novos métodos analíticos são fatores que, em intensidades diferentes, estão conduzindo a uma revisão nos requisitos de qualidade da aguardente brasileira.

Uma boa cachaça não deve possuir em sua composição teores não permitidos de substâncias que possam ser nocivas ao consumidor mesmo quando estas não prejudiquem as propriedades sensoriais da bebida (cor, aroma, sabor). Assim, a cachaça deve ser submetida aos controles de qualidade químico e sensorial. Uma bebida quimicamente aprovada, mas cujos atributos sensoriais não agradem ao consumidor, estará fadada ao insucesso. Por outro lado, uma bebida de excelente qualidade sensorial pode apresentar em sua composição substâncias indesejáveis, em teores elevados, e não serem detectados pelo apreciador (ISIQUE et al., 2002).

2.2. Matéria-prima

Novaes (1995) afirma e descreve que não há variedades de cana que sejam específicas à produção de aguardente, pois as pequenas diferenças na sua composição físico-química muito provavelmente não teriam qualquer influência na qualidade da bebida final. As variedades de cana devem ser adaptadas às condições edafoclimáticas da região onde se encontra instalada a unidade industrial, com a finalidade de apresentar elevada produtividade de açúcar por área.

Andrade et al. (2002) recomendam que as mudas, preferencialmente, devem ser adquiridas de viveiros de usinas e destilarias, instituições de pesquisa ou ensino na área de Ciências Agrárias, a fim de se plantar um material sadio, de

alto vigor e pureza varietal. Na impossibilidade, devem-se retirar mudas dos canaviais de primeiro corte, bem desenvolvidos e sadios.

Segundo Stupiello (1987) a composição química da cana-de-açúcar pode variar devido a diversos fatores, como condições climáticas, propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo, tipo de cultivo, variedade, idade, estágio de maturação, entre outros fatores. O caldo pode ser considerado como uma solução impura e diluída de sacarose, constituído de cerca de 80% água, 20% de sólidos solúveis e 0,5% de minerais, sendo importante considerar que estes constituintes não se encontram nas mesmas proporções nas diferentes partes do colmo. Os sólidos solúveis são agrupados em açúcares, não açúcares e compostos inorgânicos. Os açúcares são representados pela sacarose, glicose e frutose, com teores que dependem do estágio de maturação.

Os compostos orgânicos não açúcares são constituídos de substâncias nitrogenadas (proteínas, aminoácidos, etc.), gorduras, ceras, pectinas, ácidos (málico, succínico, aconítico, etc.) e de matérias corantes (clorofila, sacaretina e antocianina). Os não açúcares inorgânicos, representados pelas cinzas, têm como componentes principais: sílica, potássio, fósforo, cálcio, sódio, magnésio, enxofre, ferro, alumínio, cloro e outros (STUPIELLO, 1987).

Segundo Honig (1974) o caldo de cana possui material disperso, que consiste principalmente de terra, partículas de bagaço, cera, proteínas, gomas, pectinas, taninos e materiais corantes. A clarificação do caldo de cana reduz os não-açúcares e colóides, e diminui a turbidez do caldo (KOMEN, 1966).

Do ponto de vista da clarificação, os compostos mais importantes são os sais, proteínas e gomas (JENKINS, 1966).

O pH do caldo de cana (matéria-prima sadia) varia entre 5,2-5,8 (LIMA, 1975).

A matéria-prima destinada à produção de aguardente com boas características sensoriais deve ser de excelente qualidade, estar no ponto de maturação, apresentar boas condições fitossanitárias, sem deterioração, não passar pela queima no campo e, se possível, não ter contato com o solo após o corte (NOVAES, 1997).

2.3. Caldo de cana: Clarificação

A aguardente de cana é usualmente produzida a partir da fermentação do caldo bruto, sem qualquer tratamento de clarificação, o que dificulta o emprego de determinados métodos de controle de qualidade. Segundo Ribeiro & Horii (1997) a clarificação do caldo através do processo térmico possibilita a obtenção de um meio límpido, livre de sedimentos ou borras, com características favoráveis para o acompanhamento do crescimento celular.

O caldo de cana bruto extraído com o processo de moagem da matéria-prima é um sistema coloidal complexo e de composição variável, no qual o meio de dispersão é a água. Neste sistema, alguns constituintes como os açúcares, estão em dispersão molecular de difícil separação; outros como os ácidos orgânicos e os sais minerais estão dissociados; outros ainda, estão em estado de dispersão coloidal, como matérias corantes, substâncias cremogêneas, sílica, partículas de bagaço, ar e outras impurezas (LEME Jr & BORGES, 1965; DELGADO & CÉSAR, 1977).

A fração coloidal do caldo de cana é constituída fundamentalmente por proteínas e polissacarídeos solúveis de alto peso molecular. As proteínas representam a parte majoritária da fração coloidal e também englobam enzimas associadas à síntese e degradação das substâncias coloidais (RODRIGUÉZ, VALDÉSM e MARTÍNEZ, 1985).

O caldo bruto, pelas suas características, contribui para a formação de espuma mais persistente, de difícil controle pelo emprego da maioria dos antiespumantes comerciais, o que induz a trabalhar com um nível de mosto mais baixo na dorna (STUPIELLO & HORII, 1985).

O aquecimento do caldo até a ebulição, sem adição de cal, provoca a formação de flocos de colóides que centrifugados representam uma quantidade de 0,05 a 0,1 g/L. Este precipitado é composto principalmente de não açúcares nitrogenados (6-25 mg/L), lipídeos - material análogo a ceras (3-15 mg/L),

pentosanas (3-5 mg/L), sesquióxidos de ferro e alumínio (2-7 mg/L) e cálcio, fósforo, magnésio e sílica. No caso de se haver alcalinizado o caldo até pH 7,4 a 7,6 o precipitado formado é constituído principalmente por não-açúcares inorgânicos; um dos principais componentes precipitados é o fosfato de cálcio e magnésio combinado com sesquióxidos e ácido silícico (HONIG, 1974).

Assim, a formação dos colóides durante a clarificação se deve principalmente à ação do calor e alteração do pH. Pelo efeito isolado do calor as albuminas se desidratam, desnaturam e coagulam; esta ação é responsável por uma parte considerável da clarificação do caldo. Outras proteínas com ponto isoelétrico em pH acima daquele do caldo cru podem também ser coaguladas e precipitadas com a elevação do pH (PAYNE, 1974).

No Brasil predominam basicamente dois modelos de clarificação do caldo de cana (para o processo de produção de açúcar): decantação simples ou caleagem e sulfo-decantação ou sulfo-caleagem, que são empregados na fabricação de açúcar bruto e açúcar cristal branco, respectivamente. Pulzatto (1995) estudou a adição de fósforo e dióxido de enxofre ao caldo de cana-de-açúcar, como agentes de clarificação por decantação e sulfo-decantação, cujos resultados obtidos mostraram melhoria da clarificabilidade com a complementação com fósforo. A ação do enxofre é dependente de uma quantidade adequada de fósforo que permita uma boa sedimentação de colóides; a adição de 52 a 104 mg/L de SO_2 melhorou a cor e a turbidez do caldo clarificado.

Marieller (1950) mostra que a clarificação do caldo de cana promove uma precipitação total das albuminas, o que resulta na redução do nitrogênio total no caldo clarificado. As frações de nitrogênio amoniacal, amínico e amídico não são alteradas pela clarificação.

2.4. Processos de Produção de Cachaça

Fluxograma do processo de produção, segundo Silva (1995):

colheita da cana

⇓

carregamento/transporte

⇓

descarregamento

⇓

preparo

⇓

moagem

⇓

filtração

⇓

preparo do mosto

⇓

fermentação

⇓

destilação

⇓

filtração, repouso/envelhecimento, engarrafamento

O processo de fermentação por batelada e inoculação por corte é o mais utilizado pelos produtores de cachaça artesanal. Consiste na inoculação de uma dorna com o fermento e, quando a fermentação atinge um estágio apropriado, transfere-se metade do conteúdo para uma dorna vazia (corte de dorna). Em seguida, completa-se o volume das duas dornas com o caldo a ser fermentado (AQUARONE et al.,1983).

2.5. Características de Crescimento e Cinética da Levedura

O rendimento da fermentação é uma importante característica de economia da produção, e no caso da aguardente pode afetar diretamente a sua qualidade. Vinhos com teor alcoólico padronizado certamente originam destilados igualmente mais padronizados (OLIVEIRA 2001).

O desempenho do processo fermentativo é significativamente afetado pela linhagem da levedura (BASSO, ALVES, AMORIM, 1996). Do ponto de vista econômico as linhagens de leveduras do gênero *Saccharomyces* são consideradas os microrganismos mais importantes na obtenção de álcool por via fermentativa, embora em fermentações de aguardente artesanais estejam presentes leveduras de outros gêneros, como *Candida* e *Schizosaccharomyces*, também com atividade fermentativa (OLIVEIRA, 1993).

As leveduras presentes na fabricação de aguardente variam em função do processo de fermentação e procedimento de preparo do fermento. Valsechi (1960) classifica os fermentos preparados para o início da safra como: fermento caipira, aquele que aproveita as leveduras que estão presentes na cana-de-açúcar (contaminam a cana no campo); fermento misto, no qual o tratamento destinado à multiplicação das leveduras selvagens do processo caipira, é reforçado pela adição de fermento comercial; fermento comercial adquirido no mercado; fermento selecionado, ou seja, cultura pura de linhagem previamente selecionada.

A viabilidade celular é extremamente importante para o desenvolvimento do processo fermentativo, e a tolerância da levedura ao produto da fermentação (etanol) é determinante na produtividade em álcool de fermentações em escala industrial. A presença de álcoois superiores como butanol, álcool isoamílico, ácidos graxos e seus ésteres, mesmo em baixas concentrações, juntamente com o etanol, agem de maneira sinergística reduzindo a tolerância da célula de levedura ao etanol, levando-a à morte e consequentemente diminuindo a viabilidade celular (OLIVEIRA et al. 1996).

Luong (1984) observou que o etanol apresenta um efeito significativo sobre a velocidade de crescimento celular em concentrações acima de 15g/L e que as concentrações de etanol máxima a partir da qual as células não mais cresciam era aproximadamente 100g/L. Este autor também verificou que a capacidade de

produção de etanol por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* era completamente inibida a uma concentração de 105g/L de etanol.

O efeito da temperatura na velocidade das reações bioquímicas é bem conhecido. Horii (1980) descreve que alterações na temperatura de fermentação, sejam devidas a fatores externos (clima, temperatura da água, temperatura do mosto), como a fatores intrínsecos (o calor liberado nas reações), produzem uma considerável alteração no desenvolvimento da fermentação.

Segundo Jones, Pamment e Greenfield (1981) a temperatura ótima para a fermentação é de 5-10 °C acima do ótimo para o crescimento da levedura, que para Watson (1987) encontra-se na faixa de 25-30 °C. Porém, Alves (1994) ressalta que estas considerações não condizem com o fato de que nas regiões tropicais a temperatura do processo facilmente atinge 40 °C. Stupiello & Horii (1981) afirmaram que a reprodução de células pode ocorrer até temperatura da ordem de 38 ºC, havendo inibição da multiplicação a 40 ºC na presença de 8 a 9ºGL de etanol.

A utilização de temperaturas mais elevadas reduz o tempo de fermentação e eleva a taxa de morte celular (FERREIRA, 1998), pela maior sensibilidade ao etanol por parte da levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) nessas condições (GAO & FLEET, 1988). Quanto maior a temperatura, mais acentuada é a queda da viabilidade (FERREIRA, 1998).

Ramsay & Berry (1984) estudando o efeito da temperatura de fermentação na formação de álcoois superiores, verificaram que as maiores quantidades de álcoois superiores foram obtidas na faixa de 25-30 °C e que a composição relativa dos álcoois superiores foi pouco afetada pela temperatura.

A concentração hidrogeniônica é um fator significativo para as fermentações industriais devido ao seu efeito sobre o crescimento da levedura, velocidade de fermentação e formação de subprodutos, como também, no controle da contaminação bacteriana (JONES, PAMMENTE e GREENFIELD, 1981).

Segundo Novaes et al. (1974), durante a fermentação a acidez aumenta, enquanto o pH diminui, devido à formação de ácidos orgânicos. Assim, quando

variações anormais da acidez total e do pH ocorrem, podem ser atribuídas à presença de bactérias contaminantes. Uma acidez final muito maior que a inicial pode indicar uma má fermentação e cujo valor pode ser relacionado com os valores de pH do mosto.

Ferreira (2002) verificou que em fermentações alcoólicas, em condições de inóculo 10^8 células viáveis/mL, o pH inicial do meio mostrou influência no metabolismo da levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). Em pH 3,5 a eficiência e o rendimento foram maiores que em pH 5,0.

No decorrer da fermentação, a velocidade de produção de etanol varia conforme o teor de açúcar no meio. A concentração de açúcar limite para que o rendimento e produtividade sejam maximizados é ao redor de 150g/L; acima deste limite a velocidade de conversão de açúcar em álcool diminui (MAIORELLA, 1989).

Nagodawithana & Stainkraus (1974) definem uma “fermentação rápida” aquela em que o teor de etanol atinge 12% (v/v) em 6 horas ou menos. Esta fermentação é conseqüência, primeiro, do uso de concentração de células de 3 x 10^9 células/mL. Estes autores mostraram que a 30 °C houve queda na viabilidade celular ao longo de 5 horas em que a fermentação ocorreu. Dentre temperaturas de 15 a 30 °C, as menores causaram retardamento da produção de etanol, apresentando menores velocidades máximas de fermentação (tempo de7 horas).

Durante a fermentação em bateladas a levedura *S. cerevisiae* mostra, ao longo da fase de crescimento, taxas elevadas de produção de etanol. Durante a fase estacionária as taxas decrescem gradualmente, levando ocasionalmente a fermentações muito lentas e incompletas (“sluggish fermentation” ou “stuch fermentation”) em meios contendo altos teores iniciais de açúcar (SALMON & MAURÍCIO, 1994).

Oliveira (2001) avaliou 24 linhagens de leveduras pertencentes à espécie *Saccharomyces cerevisiae* e 6 pertencentes a gêneros diversos (*Candida, Kloechera, Pichia* e *Schizosaccharomyces*), isoladas de fermentações em produtores de aguardente de cana. As linhagens estudadas, em meio sintético, apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos

parâmetros fermentativos de rendimento da fermentação, eficiência de conversão de substrato em etanol ($Y_{p/s}$), em células ($Y_{x/s}$), em ácidos orgânicos ($Y_{ac/s}$), e em glicerol ($Y_{g/s}$), e velocidade específica de crescimento celular (μ_{max}). De uma maneira geral, as linhagens de *S. cerevisiae* apresentaram rendimento entre 83 a 91%. Baseando-se nas diferenças verificadas, utilizando como ferramenta estatística a Análise de Componentes Principais, esta pesquisadora selecionou 10 dentre 30 linhagens de leveduras para avaliar a produção de aguardente artesanal.

2.6. Leveduras na Produção de Aguardente de cana e outras Bebidas Alcoólicas

Morais et al. (1997) observaram que durante a multiplicação do fermento natural e no decorrer da fermentação para produção de aguardente de cana artesanal, a qual varia de 12 a 48 horas, há uma sucessão de espécies de leveduras, sendo a espécie predominante *Saccharomyces cerevisiae. Candida sake, Kluyveromyces marxianus* var. *drosophilarum* e leveduras apiculadas também são freqüentes. Espécies de leveduras transientes também foram encontradas em número variável, provavelmente provenientes das adições diárias de caldo de cana nas dornas de fermentação. *S. cerevisiae* também é a levedura dominante nas fermentações espontâneas para produção de uma bebida alcoólica nigeriana (SANNI & LONNER, 1993), e de vinhos (CONSTANTI et al., 1997; FLEET, LAFON-LAFOURCADE e RIBÉREAU-GAYON, 1984). Entretanto, os primeiros estágios da fermentação espontânea para produção de vinhos são caracterizados pelo crescimento de leveduras apiculadas, principalmente *Kloeckera e Hanseniaspora* (FLEET, LAFON-LAFOURCADE e RIBÉREAU-GAYON, 1984).

Com o progresso da tecnologia de fermentação alcoólica e da taxonomia de leveduras, foi possível verificar também que a linhagem predominante é a que possui características mais propícias de adaptação às diferentes condições de

processo, tais como teor de açúcar no mosto, teor de etanol no vinho, acidez do vinho, operação de clarificação do caldo, temperatura do mosto. Alterando-se as condições de processo, provavelmente será estabelecido um novo equilíbrio entre as linhagens de leveduras, podendo surgir outra linhagem dominante. Assim, a inoculação de uma linhagem selecionada, ou de uma linhagem dominante isolada de uma determinada destilaria não garante sua permanência e/ou melhora a eficiência em outras destilarias (BASSO et al., 1993; ANDRIETTA, ANDRIETTA e SERRA, 1997).

Oliveira (2001) descreve que a alteração e a adequação de procedimentos tecnológicos de processo, certamente é um passo preliminar importante para alterar a microbiota e a(s) levedura(s) com condições de dominância na fermentação para produção de aguardente. Esta mesma autora descreve que é importante observar que não ocorrem leveduras dominantes *per si*, mas leveduras dominantes em determinadas condições ou processos. A seleção de uma microbiota mais eficiente e de maior rendimento, sem perder de vista a qualidade da bebida, deve ser buscada com a adoção de processo adequado e que opere em condições as mais estáveis possíveis.

A população responsável pela fermentação do caldo-de-cana é constituída normalmente por leveduras e bactérias (PATARO et al., 2002). As leveduras presentes numa fermentação de aguardente artesanal estão em constante sucessão, devido à presença de microrganismos que acompanham o caldo de cana (PATARO et al., 1998). A linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* é predominante nestas fermentações, além da presença de leveduras apiculadas (*Kloeckera japonica)* e espécies de *Candica*, *Kluyveromyces* e *Pichia*, também freqüentemente isoladas (PATARO et.al., 2000).

A utilização de linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* na fabricação da cachaça de alambique está sendo avaliada por alguns pesquisadores (PATARO et al., 2002) em conjunto com produtores de cachaça artesanal em Minas Gerais. As linhagens selecionadas têm sido utilizadas como fermento iniciador e têm conseguido dominar a fermentação por um período de 20 a 30 dias. Esse mesmos autores verificaram também que o uso da levedura

selecionada, na maioria das vezes, aumentou a produtividade do alambique e melhorou a qualidade do produto final, principalmente em relação aos teores de acidez e concentração de álcoois superiores.

O processo mais utilizado por produtores de cachaça artesanal é o de batelada simples com reciclagem do inóculo. O volume inicial do inóculo inicial, quando sedimentado, eqüivale normalmente a 20% do volume da dorna de fermentação. Em geral, este inóculo consiste de uma população mista de leveduras em torno de 3,6 x 10^9 UFC/mL, e de 3,6 x 10^4 UFC/mL de bactérias (SCHWAN & CASTRO, 2001).

2.7. Nitrogênio Protéico no Caldo

A busca de padrões operacionais adequados para assegurar a qualidade da aguardente deverá considerar ajustes nos níveis dos nutrientes disponíveis para a levedura, de modo a equilibrar seus efeitos benéficos sobre a viabilidade celular e o metabolismo fermentativo com níveis adequados de compostos secundários da fermentação (DOMÍNGUEZ, NELSON e MAIA, 1997).

A levedura é capaz de utilizar diversos compostos nitrogenados tais como aminoácidos, pequenos peptídeos, bases nitrogenadas (purímicas e purimidínicas), uréia, amônia, utilizando-se de vários sistemas de transporte e absorção (HENSCHKE & JIRANEK, 1994).

Em média o caldo de cana contém 200-600 ppm de nitrogênio, do qual cerca de 60% está presente como amônia e amino-compostos. Os compostos nitrogenados não-açúcares presentes no caldo de cana compreendem amidas de aminoácidos (como asparagina e glutamina), compostos de alto peso molecular (proteínas) e aminoácidos (SHARMA & JOHARY, 1984).

O nitrogênio na forma amoniacal (NH_4^+) é encontrado no mosto proveniente do caldo de cana, e sua concentração influi sobre o brotamento, taxa de multiplicação da levedura e sua porcentagem no vinho. Esta forma de nitrogênio na cana é intermediária, pois o nitrato (NO_3^-) absorvido do solo pela planta é

reduzido a nitrogênio amoniacal e então transformado em aminoácidos, proteínas, ácidos nucléicos e demais compostos nitrogenados (BASSO, ALVES e AMORIN, 1996).

Henschke & Jiranek (1994), citando outros autores, mostram que o pH ótimo para o transporte e absorção de amônia é de 6,0-6,5, mas o pH do mosto de fermentação é geralmente mais baixo (4,5).

Jorgensen (1959) ao discutir resultados de outros pesquisadores, relata que o nitrogênio orgânico assimilado pelas leveduras produtoras de álcool são aminoácidos, amidas e peptídeos de baixo peso molecular, e que os substratos naturais (com nitrogênio orgânico) são mais adequados à incorporação de nitrogênio que os substratos amoniacais. Segundo este mesmo autor, uma série de experimentos confirmam que a superioridade de substratos naturais se deve a que neles são encontrados uma mistura adequada de aminoáciodos, que podem ser utilizados diretamente pela levedura para a síntese de proteínas sem desaminação prévia. A levedura em crescimento assimila diretamente cerca de 80% do nitrogênio à partir de aminoácidos.

Ribeiro, Lopes e Ferrari (1987) ao discutirem o tema da complementação nitrogenada considerou-a como uma prática benéfica e decisiva na multiplicação e no crescimento celular do fermento, e consequentemente para a melhoria dos índices de eficiência, rendimento e produtividade do processo.

Estudos de fermentação foram realizados por Pulzatto (2000) com diversas cepas de levedura, em condições de laboratório em mosto sintético, contendo fonte de nitrogênio amoniacal e com teores variados de nitrogênio protéico, correspondendo a 3, 6 e 9 g/L de extrato de levedura. A produção específica de células (Yx/s), gramas de massa celular seca/gramas de ART consumido, aumentou linearmente com o aumento do nitrogênio protéico no meio. Também foram positivamente influenciados o teor de etanol no vinho e o rendimento da fermentação, conforme equações de segundo grau, ambas com r= +1,00.

Cabezas, Trivelin e Silveira (1990) determinaram as diversas frações de componentes nitrogenados no caldo de cana e no vinho resultante da fermentação alcoólica e verificaram o uso e comportamento de algumas dessas frações. Os

resultados obtidos mostraram que o nitrogênio total de 582 ppm do caldo de cana era composto de 415 ppm (71%) de nitrogênio solúvel e 167 ppm (29%) de nitrogênio insolúvel de origem protéica. O vinho delevurado proveniente da fermentação alcoólica desse caldo apresentou 77 ppm (57%) de nitrogênio solúvel e 58 ppm (43%) de nitrogênio insolúvel, perfazendo 135 ppm de nitrogênio total. O nitrogênio solúvel é composto de nitrogênio amino-solúvel e nitrogênio não amino-solúvel. O caldo de cana apresentava 95 ppm (16%) de nitrogênio amino-solúvel e 320 ppm (55%) de nitrogênio amino não-solúvel; no vinho delevurado esses componentes são, respectivamente, 24 ppm (18%) e 53 ppm (39%). Desses resultados, e utilizando isótopo de 15_N, os autores concluíram que a biomassa celular imobilizou 78% do nitrogênio amoniacal, ficando a maior parte deste (72%) retida na fração de nitrogênio insolúvel iminentemente protéica.

Pinotti (1991) pondera que nas etapas do processo de produção de álcool existem perdas significantes de nutrientes, notadamente o nitrogênio, cuja perda ocorre principalmente na etapa de clarificação do caldo, o que muitas vezes requer a complementação com nitrogênio durante a fermentação, onerando o custo final e sem atingir o objetivo esperado, pois a levedura não assimila momentaneamente aquele nutriente, que é geralmente adicionado na forma de uréia (46% de N) ou de sulfato de amônia (21%). Também se refere ao fato de que a reprodução de *Saccharomyces cerevisiae* varia em função do nível de nutrientes encontrados na matéria-prima, e que dentre estes o nitrogênio é o que apresenta uma resposta significativa.

Abramov, Éfendieva e Kotento (1994) enfatizam que a síntese de biomassa celular pela levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) é significativamente dependente do conteúdo em nitrogênio no meio de crescimento, uma vez que a proporção de compostos nitrogenados na célula de levedura atinge 50% de sua massa.

Segundo Pulzatto (2000) a oferta de fonte complexa de nitrogênio, como extrato de levedura, influenciou o rendimento em etanol, massa celular e outros parâmetros da fermentação alcoólica, mesmo na presença de fonte de nitrogênio mineral em concentração não limitante, em leveduras com baixo a alto teor de proteína. Esta mesma autora também verificou que a oferta de fonte complexa de

nitrogênio protéico não alterou os níveis de proteína em leveduras contendo baixos a altos teores de proteína.

As características básicas da biomasssa de levedura seca podem ser resumidas como tendo: alto teor de proteína, alto conteúdo de ácidos nucléicos, baixo conteúdo de lipídeos, alto conteúdo de cinzas, conteúdo moderado de carboidratos e alto conteúdo de vitaminas (AIBA, HUMPHREY e MILLS, 1971). Reed (1982) determinou a composição química bruta da biomassa de levedura: 7,5-9,0% de nitrogênio, 47-56% de proteína (fator 6,25), 6-15% de ácidos nucléicos, 5,0-9,5% de cinzas e 2-6% de lipídeos. Dentre os aminoácidos determinados em *S. cerevisiae* destacam-se lisina (8,43%), leucina (8,13%), valina (6,67%), arginina (5,35%), treonina (5,20%), isoleucina (5,19%), tirosina (4,87%), fenilalanina (4,50%), e outros como histidina, cistina, metionina e triptofano.

Giudici, Zambonelli e Kunkee (1993) relataram que os álcoois superiores são produzidos a partir de aminoácidos correspondentes, presentes no meio, e que a quantidade formada é influenciada pela composição do meio (concentração de açúcar, pH, concentração e tipo de fonte de nitrogênio), pela temperatura, pelo grau de aeração durante a fermentação e ainda pela linhagem da levedura. Foi também verificado que a produção de propanol está relacionada ao metabolismo de metionina e de treonina, que são reguladores das rotas metabólicas de compostos sulfurados. As linhagens produtoras de maiores concentrações de propanol são também aquelas que mostram pouca ou nenhuma produção de sulfeto de hidrogênio.

Salmon & Barre (1998) mostram que o metabolismo de compostos nitrogenados afeta a eficiência da fermentação de mosto de uva. O íon amônio, normalmente presentes em mosto de uva, reduz os níveis de enzimas catabólicas e atividades de transporte de fontes nitrogenadas não-preferenciais. Esta repressão catabólica do nitrogênio impede de modo severo a utilização da prolina e arginina. Esses autores promoveram uma alteração genética que desregulou a via de utilização de prolina; esses mutantes mostraram maior produção de biomassa e maior taxa máxima de produção de CO_2. As diferenças foram devidas primariamente à desrepressão das vias de utilização de aminoácidos. Vias

alternativas de assimilação de nitrogênio não são expressadas quando o amônio está presente. No mosto de uva o amônio é a fonte preferida de nitrogênio. À medida que amônio é consumido, os aminoácidos são utilizados em um padrão determinado por sua concentração relativa às necessidades da célula para biossínteses e à disponibilidade total de nitrogênio. Duas exceções são conhecidas: a) a prolina não é absorvida do mosto sob condições fermentativas anaeróbias e o metabolismo da mesma requer oxigênio e uma cadeia de transporte de elétrons para clivar o anel de prolina; e b) a arginina e o γ-aminobutirato são usualmente absorvidos durante os últimos estágios da fermentação do mosto de uva. A prolina e a arginina são os compostos nitrogenados mais comuns no mosto de uva e representam 30 a 65% do teor total de aminoácidos nesse mosto.

2.8. Fermentação Alcoólica: Etanol e Compostos Secundários

São vários os fatores que interferem na qualidade das bebidas alcoólicas destiladas, tais como a matéria-prima, fermentação, o método de condução do processo fermentativo, destilação, envelhecimento etc. No entanto, as leveduras e as condições de fermentação têm sido apontadas como os fatores que mais influenciam o sabor das bebidas alcoólicas (SUOMALAINEN & LEHTONEN, 1979; LEHTONEN & JOUNELA-ERIKSSON, 1983).

Segundo Gutierrez (1993) no processo de produção de aguardente é na etapa da fermentação alcoólica que são produzidos os principais componentes químicos da bebida, pela ação direta ou indireta da levedura e de outros microrganismos atuantes nesta fase.

As leveduras são *per si* importantes produtoras de aroma. Vários pesquisadores têm demonstrado que existe uma certa variação na formação de compostos aromáticos entre diferentes cepas de leveduras na produção de diversas bebidas (NIKANEN & NIKANEN, 1977; CABRERA et al., 1988; GIUDICI et al., 1990; LONGO et al., 1992; LURTON et al., 1995).

A aguardente de cana é composta principalmente de água e álcool em proporções variáveis, segundo a sua graduação, e de componentes secundários em quantidades muito menores, que conferem à bebida suas características peculiares de aroma e sabor (MAIA, 1994; CARDOSO, 2001). Os componentes secundários, responsáveis pelo aroma ou "bouquet" das bebidas, pertencem às seguintes classes: aldeídos, álcoois superiores, ésteres, furfural, terpenos, lactonas, furanos, pirazinas e ácidos orgânicos, dentre outros (LEHTONEN & JOUNELA-ERIKSSON, 1983; NYKANEN & NIKANEN, 1983). Os principais componentes constituintes da fração "não-álcool" de aguardente de cana são: aldeído acético, ácidos succínico, acético, lático e ésteres desses ácidos, glicerol, furfural e álcoois superiores tais como amílico, isoamílico, butanol, isobutanol, propanol e isopropanol (LIMA, 1983)

Furtado (1995) identificou componentes voláteis em aguardente de cana por meio da cromatografia gasosa: etanol, acetaldeído, acetato de etila, metanol, propanol, isobutanol, butanol, álcool isoamílico e ácido acético. Segundo a referida autora a quase totalidade dos componentes (97,4% a 99,7%) é representada pelo etanol.

Atualmente, estão sendo desenvolvidos estudos sobre a caracterização química da cachaça brasileira, dentre os quais constatou-se que a concentração de aldeídos na aguardente é, em média, inferior à de alguns uísques importados (VASCONCELOS, 2003).

2.9. Ácidos Orgânicos

A acidez de uma cachaça é de grande importância, constituindo um fator de qualidade, uma vez que durante sua produção os ácidos reagem com os álcoois presentes, aumentando a formação dos ésteres, que são um dos constituintes responsáveis pelo aroma. O excesso de acidez promove sabor indesejado e

ligeiramente “agressivo” em aguardente de cana, depreciando a qualidade da bebida (CHERUBIN, 1998).

Os principais ácidos presentes em bebidas destiladas são: fórmico, acético, propiônico, butírico, ácido hexanóico, ácido decanóico, láurico, mirístico e succínico. O ácido acético é quantitativamente predominante e sua concentração varia de 60-95% da acidez total (NYKANEN & NYKANEN, 1991). Lehtonem & Jounela-Erikson (1983) também afirmam que o ácido acético constitui 75-85% da quantidade total de ácidos presentes nas bebidas alcoólicas. Apesar do ácido acético ser predominante, o principal ácido formado pela levedura é o succínico e pode ser obtido por duas vias: a redutiva e a oxidativa, esta, prioritária em leveduras (ALVES, 1994).

Nóbrega (1994) descreve que é normal uma aguardente de cana que passou por um processo de destilação ter carregado consigo uma discreta quantidade de ácidos, principalmente os de forma volátil, sendo a acidez expressa como volátil, fixa e total (soma das duas anteriores). Em bebidas destiladas Novaes et al. (1974) e Whiting (1976) citam como ácidos voláteis presentes: fórmico, acético, lático e butírico; como fixos: málico, succínico, fumárico, cítrico e tartárico.

Os ácidos orgânicos têm suas características próprias de sabor. O ácido succínico tem um sabor salgado "salty" incomum, amargo, além da sua acidez. O ácido acético apresenta aroma característico e efeito no palato posterior (WHITING, 1976).

Bizelli, Ribeiro e Novaes (2000) destacam o papel da acidez em relação aos teores de cobre da aguardente e Boza & Horii (2000) afirmam que os teores de cobre durante a destilação da aguardente acompanham os teores de acidez encontrados no destilado, sendo elevado principalmente na fração "cauda". Estes autores concluem que separando-se a fração "cauda" a qualidade da aguardente será melhorada, segundo os padrões oficiais de qualidade, pela redução dos níveis de cobre.

2.10. Ésteres

O acetato de etila é o mais abundante éster das bebidas alcoólicas. Geralmente representa mais de 50% do total de ésteres. Devido a apresentarem odor agradável de frutas, os ésteres são considerados compostos importantes de aroma nas bebidas alcoólicas (LEHTONEM & JOUNELA-ERIKSON, 1983). Segundo Peddie (1990) vários fatores interferem na síntese de ésteres, tais como a cepa de levedura, a composição do meio, aeração (inibe a formação de ésteres), temperatura.

O principal éster da aguardente também é o acetato de etila, o qual em pequenas concentrações incorpora um aroma de frutas à bebida, que é desejável e agradável. Em quantidades excessivas, porém, confere aroma indesejável e enjoativo (MAIA, 1994).

Llistó, Souza e Mischan (1979) analisaram amostras de aguardentes de cana comerciais por cromatografia gasosa para identificação e dosagem de ésteres e em todas foi detectada a presença dos ésteres: acetato de butila, acetato de etila, acetato de isoamila e butirato de etila. Os teores encontrados foram de 26,71-68,68, 31,75-67,20, 35,77-84,85 e 41,23-86,51 mg/100mL de amostra, respectivamente para cada um dos componentes detectados e quantificados.

2.11. Aldeídos

Os aldeídos representam a fração mais volátil encontrada nas bebidas alcoólicas, sendo a maioria formados durante estágios preliminares do processo de fermentação. A formação de aldeídos depende da levedura, assim como das condições de fermentação. De odor penetrante, afetam o aroma das bebidas alcoólicas. Entre os compostos carbonílicos, o acetaldeído é aquele encontrado em maior quantidade nas bebidas alcóolicas, constituindo mais de 90% do conteúdo de aldeídos em whisky, conhaque e rum (NYKANEN, 1986). Os principais aldeídos que aparecem nas aguardentes são o acético e fórmico (BRAU, 1957).

Outro aldeído importante em bebidas destiladas é a acroleína (2- propenal), formada pela desidratação do glicerol durante a destilação, a sua presença em aguardente de cana é indesejável devido ao seu forte odor pungente (GUTIERREZ, 1997 apud CHERUBIN, 1998).

Segundo Novaes et al. (1974), quando a colheita da cana-de-açúcar é precedida pela queima, o furfural e o hidroximetilfurfural podem aparecer no caldo, promovendo a desidratação parcial de uma pequena fração de açúcares presentes.

2.12. Álcoois Superiores

Os álcoois superiores, conhecidos também como óleo fúsel, formam quantitativamente o maior grupo de compostos responsáveis pelo aroma e sabor das bebidas alcoólicas. Este grupo é composto por álcoois alifáticos e aromáticos. Dentro do grupo dos álcoois alifáticos podemos destacar o propanol, 2-metil-1-butanol (d-amílico) e o 3-metil-1-butanol (isoamílico); os álcoois fúsel têm um aroma característico e influenciam no sabor das bebidas destiladas (LEHTONEM & JOUNELA-ERIKSON, 1983; NYKANEN & NIKANEN, 1991).

Os principais álcoois superiores encontrados nas aguardentes de cana são o amílico, isoamílico, propanol, isobutanol, isopropanol e butanol. Os álcoois hexílico, heptílico e otílico estão presentes em mínimas quantidades (LIMA, 1964).

A produção de álcoois superiores parece ser uma característica das leveduras em geral, e as quantidades produzidas variam com as condições de fermentação e também com o gênero, espécie e provavelmente com a linhagem utilizada (GIUDICI, ROMANO e ZAMBONELLI, 1990). Estes mesmos autores examinaram a capacidade de produção de álcoois superiores de 100 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e constataram que a produção de álcool superior é uma característica individual da linhagem. Oliveira (2001) também verificou que as quantidades de álcoois superiores variam em função da linhagem de levedura.

Almeida & Barreto (1971) determinaram qualitativa e quantitativamente, através de cromatografia gasosa, os álcoois superiores em 60 amostras de aguardente de cana de marcas diferentes, provenientes de várias regiões do Brasil. Estes autores verificaram que as aguardentes consideradas de boa qualidade apresentam somente os álcoois propanol, isobutanol e isoamílico e os teores variaram de 7,00; 6,40 e 19,60 a um máximo de 65,20; 36,60 e 98,50mg/100mL de amostra, respectivamente. As amostras consideradas de qualidade inferior apresentaram um teor elevado de propanol.

Souza & Llistó (1978) também descrevem que grandes quantidades de óleo fúsel diminuem o valor comercial e a qualidade das aguardentes, e que o teor dos álcoois superiores normalmente deve acompanhar proporcionalmente os ésteres numa aguardente de boa qualidade.

2.13. Cobre

O cobre é um dos metais indesejáveis na aguardente. A presença do cobre na bebida provém da constituição do material utilizado na construção dos

alambiques. Esse metal contribui para a eliminação de determinados odores desagradáveis observados em cachaça destiladas em alambiques feitos com outros materiais, como o aço inoxidável (CARDOSO, 2001).

Faria (1989) relata que o limite de cobre estabelecido pela legislação brasileira (5mg/L de aguardente), com base nos níveis de ingestão diários recomendados para o cobre pela Organização Mundial de Saúde (OMS), garante com grande margem o consumo da bebida sem riscos à saúde.

Investigando o efeito da destilação em alambiques feitos de cobre e outros metais, Faria (1989) verificou que as aguardentes de cana obtidas em alambiques que continham cobre em sua estrutura apresentavam acidez, teor de aldeídos e de enxofre mais reduzidos quando comparadas àquelas obtidas de alambiques de outros metais, sendo este último o principal efeito do cobre sobre as características sensoriais da bebida.

2.14. Metanol

O metanol é um álcool particularmente indesejável na aguardente, originando-se da degradação da pectina, um polissacarídeo presente na cana-de-açúcar. A molécula de pectina é um composto formado pela associação de centenas de moléculas de ácido galacturônico, que possuem fragmentos de moléculas de metanol, as quais são liberadas durante o processo de fermentação (CARDOSO, 2001).

2.15. Destilação

A prática de destilação é realizada em aparelhos descontínuos como o alambique simples e o de três corpos, e em aparelhos contínuos, como as colunas de destilação (STUPIELLO, 1992).

Os vinhos possuem vários compostos voláteis que destilam conforme o ponto de ebulição, afinidade com o álcool ou água e o teor alcoólico no vapor durante a destilação (LÉAUTÉ, 1990).

Durante a destilação em alambiques, muitas reações ocorrem e geram aromas delicados. Estas reações são função das características do vinho (como destilação de vinho com células de levedura, pH e acidez do mesmo); da dimensão do alambique; da temperatura gerada pela fonte de aquecimento; da duração da destilação e da limpeza do alambique. Algumas reações são conhecidas, como a hidrólise, esterificação, acetalização, reações com o cobre, e produção de furfural. Por exemplo, além da "quebra" de moléculas pode ocorrer o rearranjo das unidades geradas, com formação de: monoterpenos (linalol e alfa terpineol < 1mg/L); cetonas (α e β-iononas, <0,01 mg/L), e outros compostos (LÉAUTÉ, 1990).

A destilação influi na composição e na qualidade sensorial da aguardente. A composição dos destilados é determinada por muitos fatores, incluindo o tipo de destilador, o grau de purificação, e a seleção das frações agregadas ou separadas do destilado (COLE & NOBLE, 1995; BOZA & HORII, 1998; BOZA & HORII, 1999).

Considerando apenas a destilação em batelada, em alambique simples, tal como efetuada na fabricação artesanal de aguardente, distingue-se usualmente três frações destiladas, e Maia (1994) relata esta técnica usual de destilação:

a) O "destilado de cabeça", que corresponde às primeiras frações recolhidas na saída do alambique;

b) O "destilado de coração", que é a porção destilada que corresponde à aguardente;

c) O "destilado de cauda", ou "água fraca", que é a última porção destilada, obtida quando a destilação não é interrompida após obtenção da aguardente.

Maia (1994) comenta que a separação entre as três frações do destilado é feita através de “cortes”, e via de regra, o critério para os cortes são a temperatura dos vapores no domo do alambique (para o destilado de cabeça) e o teor alcóolico do destilado (para encerrar a retirada do destilado de coração). Acrescenta ainda que nesta etapa, a qualidade da aguardente depende fundamentalmente da composição do vinho encaminhado à destilação; da geometria do alambique, para assegurar um nível de refluxo que permita a separação adequada dos componentes secundários; e da habilidade do operador para efetuar os cortes nos momentos adequados.

Sabe-se que os componentes voláteis do vinho possuem diferentes graus de volatilidade, o que possibilita a separação por destilação. Segundo Barbet, citado por Novaes (1994), no que diz respeito à volatilidade, são denominados produtos de "cabeça" aqueles que apresentam ponto de ebulição inferior ao do álcool etílico e produtos de "cauda" os que possuem ponto de ebulição superior a ele. Contudo, determinados compostos comportam-se ora como produtos de "cabeça", ora como produtos de "cauda", segundo a concentração alcoólica do líquido submetido à destilação.

É importante ressaltar que a fração mais volátil (cabeça) é freqüentemente separada das demais. Essa fração contém muitos compostos do aroma, sendo rica principalmente em acetaldeído, dióxido de enxofre e acetato de etila, compostos considerados como atribuidores de impacto sensorial negativo (GUYMON, 1973).

Léauté (1990) detalha mais esta prática de "cortes", classificando os compostos voláteis no processo de destilação em alambique como:

- tipo 1: componentes solúveis em álcool, com baixo ponto de ebulição, destilam no início, apresentando-se em altas concentrações na cabeça e no início do coração (exemplo, o acetaldeído, com ponto de ebulição de 21 °C e o acetato de etila, com 77 °C);

- tipo 2: componentes que apresentam ponto de ebulição relativamente alto e são total ou parcialmente solúveis em etanol; alguns destes

compostos terminam de destilar no meio do coração e os ácidos graxos e seus ésteres estão nesta categoria;

- tipo 3: componentes que apresentam baixo ponto de ebulição (≤93 °C), solúveis em álcool, total ou parcialmente solúveis em água, encontram-se no coração do destilado (exemplo, o metanol e álcoois superiores, como propanol, isobutanol, álcool isoamílico;

- tipo 4: componentes que apresentam ponto de ebulição maior que o da água, solúveis ou parcialmente solúveis em água, iniciando a destilação no meio do coração, como o ácido acético, com ponto de ebulição de 110 °C;

- tipo 5: componentes que apresentam alto ponto de ebulição, muito solúveis em água e que são produzidos durante a destilação, como por exemplo o furfural (ponto de ebulição de 167 °C), cuja concentração aumenta do meio do coração para a cauda.

2.16. Métodos de Análise Sensorial

Estudos em alimentos e bebidas, visando relacionar os componentes responsáveis pelo aroma e sabor com sua qualidade, são monitorados com análise sensorial que continua sendo, ainda, a única forma de avaliar a aceitação dos mesmos diretamente através da percepção humana (STONE & SIDEL, 1993).

Os testes sensoriais são incluídos como uma garantia de qualidade na indústria de alimentos e bebidas devido ao fato que representam uma medida multidimensional integrada, com importantes vantagens, como: ser capaz de identificar a presença ou ausência de diferenças perceptíveis, definir características sensoriais importantes de um produto de forma rápida, ser capaz de detectar particularidades que não podem ser detectadas com outros procedimentos analíticos, e ainda ser capaz de avaliar a aceitação de produtos (MUÑOZ et al., 1992).

Os métodos sensoriais são baseados em respostas aos estímulos, os quais são levados por impulsos nervosos ao cérebro, e interpretados em sensações. O estímulo pode ser medido por métodos físicos e químicos, e produz sensações cujas dimensões são intensidade, extensão, duração, qualidade e gosto; tais sensações podem ser dimensionadas por processos psicológicos (MORAES, 1993). Quando pessoas são usadas como instrumento de medida, é necessário controlar cada uma das condições e métodos de avaliação, para reduzir erros, podendo-se considerar como erro toda influência estranha que prejudique o bom resultado do teste sensorial (TEIXEIRA, 1995).

Existem três classes de métodos estatísticos sensoriais (ABNT, 1993):

- Métodos Discriminativos ou Métodos de Diferença: são métodos que servem para determinar se as amostras que sofreram diferentes tratamentos diferem significativamente ($p \leq 0,05$) entre si (Teste Triangular, Teste Duo-Trio, Teste de Comparação Pareada, Teste de Ordenação, Teste de Comparação Múltipla ou Diferença do Controle, Teste de Escalas de Intensidade).

- Métodos Descritivos ou Métodos Analíticos: são métodos de resposta objetiva que envolvem tanto a discriminação quanto a descrição dos atributos sensoriais de um produto (Teste de Escala Descritiva, Teste de Escala de Valores). Usualmente os vários métodos analíticos são descritivos, descrevem as amostras em termos sensoriais, e quantitativos, avaliando numericamente a intensidade de cada atributo.

- Métodos Afetivos: compreendem menor número de testes, e avaliam a preferência ou aceitação de um produto junto ao mercado consumidor (Teste de Preferência, Teste de Aceitação). A análise de aceitação pode refletir o grau de preferência por determinado produto.

2.17. Avaliação Sensorial de cachaça

Uma bebida destilada é julgada pelo consumidor através da cor, odor e gosto, ou seja, pelas características sensoriais. Portanto, uma boa cachaça, além

de atender às exigências legais com relação à sua composição, deve também apresentar qualidade sensorial, capaz de satisfazer as expectativas de seus consumidores.

O sabor das bebidas alcoólicas é formado por inúmeros compostos orgânicos voláteis, que conferem à bebida seu odor e gosto típico. Esses compostos podem ser divididos em vários grupos de acordo com sua natureza química. Álcoois superiores, ácidos graxos e ésteres formam quantitativa e qualitativamente os maiores grupos presentes nas bebidas alcoólicas, sendo os álcoois superiores os mais abundantes (LEHTONEN & JOUNELA-ERIKSSON, 1983; BERRY, 1995).

Segundo Cole & Noble (1995) o sabor perceptível é aquele resultante da combinação de vários componentes; apesar das diferentes bebidas destiladas serem distinguidas uma das outras por suas características sensoriais, não se verifica grande diferença na sua composição química.

Boza & Horii (1998) analisaram dezesseis amostras de aguardente de cana através de análises físico-químicas e sensorial, e verificaram que a acidez e o teor de propanol influem negativamente no sabor da aguardente.

Considerando-se as indesejáveis características sensoriais dos compostos sulfurados e o papel negativo que podem representar na qualidade das aguardentes, ISIQUE, CARDELLO e FARIA (1998) submeteram amostras de aguardentes de cana, de quatro diferentes marcas comerciais, a testes de aceitabilidade quanto ao aroma, sabor e impressão global, realizados por uma equipe de 30 provadores, em cabines individuais, utilizando-se escala hedônica de 9 centímetros. Os autores verificaram que há uma correlação negativa significativa ($p \leq 0,05$) entre os teores de enxofre e a aceitabilidade das amostras de aguardentes.

Cardello & Faria (2000) avaliaram a aceitação de onze amostras de aguardentes de cana envelhecidas e não envelhecidas, por testes sensoriais afetivos e análise estatística univariada e multivariada, utilizando-se escala hedônica de 9 centímetros e 100 provadores consumidores do produto. Os resultados obtidos demonstraram que aguardentes envelhecidas acima de 24

meses em tonel de carvalho de 200L, obtém preferência dos consumidores, em detrimento de aguardentes sem envelhecer.

Os trabalhos encontrados na literatura relativos à qualidade sensorial da aguardente de cana se referem principalmente às aguardentes envelhecidas (CARDELLO & FARIA, 1997; CARDELLO & FARIA, 1998; CARDELLO & FARIA, 2000). Em relação às aguardentes não armazenadas em tonel de madeira e não envelhecidas existem poucos trabalhos publicados relacionados com a sua qualidade sensorial, como o de Faria (1989) que estudou a influência do cobre na qualidade sensorial das aguardentes. Posteriormente Faria, Deliza e Rossi (1993) supondo que o defeito sensorial (odor desagradável), nas aguardentes destiladas na ausência de cobre estivesse relacionado com a presença de compostos sulfurados, realizaram estudo comparativo para relacionar resultados da análise sensorial com os teores de enxofre das aguardentes e verificaram haver preferência pelas amostras destiladas na presença de cobre.

Furtado (1995) determinou as propriedades físico-químicas e estudou as características sensoriais do aroma e sabor de aguardentes recém destiladas utilizando análise descritiva quantitativa. Esta mesma autora analisou a relação existente entre os dois tipos de medidas, concluindo que o conjunto das medidas dos compostos voláteis pode estimar razoavelmente bem o conjunto de medidas sensoriais das amostras.

Ribeiro (1997) estudou diferentes linhagens de leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de aguardente de cana e utilizou a análise sensorial nos destilados. Este autor concluiu que há influência das linhagens sobre os produtos obtidos, indicada pelo teste triangular (teste sensorial de diferença entre amostras).

A analise descritiva quantitativa, metodologia bastante aplicada para caracterização dos atributos sensoriais de alimentos e bebidas, foi utilizada por Cardello & Faria (1998) para estudar o perfil sensorial da aguardente de cana envelhecida em tonéis de carvalho. Todas as aguardentes foram avaliadas sensorialmente a 40% de álcool em volume a 20^{o}C. Esses autores verificaram através da Análise Descritiva Quantitativa que as características sensoriais das

amostras mudaram significativamente com o aumento do tempo de envelhecimento e que o envelhecimento da aguardente proporciona a obtenção de uma bebida de característica sensorial superior. Marcellini (2000) também utilizou a metodologia de análise sensorial descritiva quantitativa para traçar o perfil sensorial de amostras de aguardentes comerciais, envelhecidas e tradicionais. Janzzantti, Cardello e Franco (2002) aplicaram a metodologia de Análise Descritiva Quantitativa para traçar o perfil sensorial de amostras comerciais de cachaças presentes no mercado, cujos dados coletados revelaram que todas amostras (quatro) apresentaram perfis sensoriais distintos entre si, mostrando que falta ainda padrão de qualidade para esta bebida.

Em estudo desenvolvido por Oliveira (2001) foram produzidas 10 aguardentes utilizando-se 10 diferentes linhagens de leveduras, uma para cada aguardente, sendo 6 *Saccharomyces cerevisiae*, além de *Cândida apicola*, *Kloeckera javanica, Pichia subpelliculosa e Schizosaccharomyces pompe*. As aguardentes foram padronizadas com teor alcoólico de 38-39°GL e submetidas a análise de aceitação através de testes sensoriais, utilizando-se escalas hedônicas de nove pontos; através dos resultados obtidos a autora verificou que as aguardentes produzidas apresentaram variações nos teores e nas relações entre os principais compostos voláteis, mas estas não resultaram em diferenças perceptíveis em relação ao aroma, sabor e impressão global. A aguardente produzida pela *S. pombe* foi uma exceção, com aroma considerado pior em relação a uma linhagem de *Saccharomyces* que mostrou tendência para melhores atributos, o que indica que as leveduras não-*Saccharomyces* estudadas, presentes nas fermentações artesanais de caldo de cana, não exercem influência negativa sobre a qualidade sensorial da aguardente.

2.18. Referências Bibliográficas

ABRAMOV, S. A; ÉFENDIEVA, D. A; KOTENTO, S. T. Effect of the growth medium on the protein content of the yeast Saccharomyces cerevisiae. **Applied Biochemistry and Microbiology,** v.30, n.2, p.225-227, 1994.

AIBA, S.; HUMPHREY, A. E.; MILLS, N. F. E. **Engenharia Bioquímica.** 1971, cap. 2, p. 16-42.

ALMEIDA, M. E. W.; BARRETO, H. H. C. Álcoois superiores em aguardente de cana por cromatografia em fase gasosa. **Revista do Instituto Adolfo Lutz,** São Paulo, n. 31, p.117-124, 1971.

ALVES, D. M. G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica**. 1994. 251p. Dissertação (Mestrado em microbiologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

ANDRADE. L. A. B. de; ANJOS, I. A. dos; FIGUEIREDO, P. A. M. de; QUINTELA, A. C. R. Utilização de variedades selecionadas de cana-de-açúcar na produção de cachaça de alambique. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p.33-36, 2002.

ANDRIETTA, S. R.; ANDRIETTA, M. G. S; SERRA, G. E. Leveduras não fermentativas: Processo de instalação e forma de detecção e eliminação. **STAB,** Piracicaba, v.15, n.6, p.32-35, 1997.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. A. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgard Blucher, 1983. v.5, 243 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORNAS TÉCNICAS **NBR 12806:** Análise sensorial dos alimentos e bebidas. São Paulo, 1993, 8p.

BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V.; Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo. In: AMORIN, H. V. **Processos de produção de álcool:** controle e monitoramento. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1996, cap. 4, p. 38-85.

BASSO, L. C.; OLIVEIRA, A. J.; ORELLI, V. F. S. M.; CAMPOS, A. A.; GALLO, C. R.; AMORIM, H. V. Dominância de leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliadas pela técnica de cariotipagem. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 5, 1993, Águas de São Pedro. **Anais.** Piracicaba: STAB, 1993. p.245-250.

BERRY, D. R. Alcoholic beverage fermentations. In: LEA, A. G. H., PIGGOTT, J. R. **Fermented Beverage Production.** 1.ed. London: Blackie Academic & Professional, 1995. cap.2, p. 32-44.

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

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

BOZA, Y.; HORII, J. A destilação na obtenção da aguardente de cana-de-açúcar. **Boletim SBCTA,** v.33, n.1, p.98-105, jan-jun,1999.

BOZA, Y.; HORII, J. Influência do grau alcoólico e da acidez do destilado sobre o teor de cobre na aguardente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** Campinas, v.3, n.20, set-dez, 2000.

BRASIL. Decreto n° 2.314, de 04 de setembro de 1997. Dispõe sobre o registro, classificação, padronização, produção e fiscalização das bebidas. **Diário Oficial da União,** Brasilia, 05 de set. 1997.

BRASIL. Decreto n° 4.062, de 21 de dezembro de 2001. Dispõe sobre a definição das expressões "cachaça", "Brasil" e "cachaça do Brasil" como indicações geográficas e dá outras providências. **Diário Oficial da União,** Brasilia, 21 de dez. 2001.

BRASIL. Decreto n° 4.851, de 02 de outubro de 2003. Altera dispositivos do Regulamento aprovado pelo Decreto 2.314, de 04/07/1997, que dispõe sobre o registro, classificação, padronização, produção e fiscalização das bebidas. **Diário Oficial da União,** Brasilia, 02 de out. 2003.

BRAU, H. M. Review on the origin and composition of fusel oil. **Technology. Paper 17**, Universidade de Puerto Rico, Agric. Exp. Sta., Rio Piedras, p.5-30, 1957.

CABEZAS, W. A. R. L.; TRIVELIN, P. C. O.; SILVEIRA, J. A. C. Distribuição de 15N-$(NH_4)_2SO_4$ complementado no processo de fermentação etanólica nas frações de N-insolúvel e N-solúvel. **STAB,** Piracicaba, v.9, n.12, p.41-44, 1990.

CABRERA, M. J.; MORENO, J.; ORTEGA, J.M.; MEDINA, M. Formation of ethanol, higher alcohols, esters, and terpenes by five yeast strains in musts from Pedro Ximénez grapes in various degrees of ripeness. **American Journal Enology and Viticulture,** v. 39, n.4, p. 283-287, 1988.

CARDELLO, H. M. A. B.; FARIA, J. B. Modificações físico-químicas e sensoriais de aguardente de cana durante o envelhecimento em tonel de carvalho (*Quercus alba* L.). **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos,** Curitiba, v.15, n.2, p.87-100, 1997.

CARDELLO, H. M. A. B. & FARIA, J. B. Análise descritiva quantitativa da aguardente de cana durante o envelhecimento em tonel de carvalho (Quercus alba L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** v.18, n.2, p.169-175, maio-jul, 1998.

CARDELLO, H. M. A. B. & FARIA, J. B. Análise da aceitação da aguardente de cana por testes afetivos e mapa de preferência interno. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** v.20, n.1, p.32-36, jan-abr, 2000.

CARDOSO, M. das G. **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. Lavras: Ed. UFLA, 2001. 264p.

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da adição de benzoato de sódio na fermentação alcoólica para produção de aguardente de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp).** 1998. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba,1998.

COLE, V. C.; NOBLE, A. C. Flavor chemistry and assessment. In: LEA, A. G. H.; PIGGOTT, J. R. **Fermented Beverage Production**, 1. ed. London: Blackie Academic & Professional, 1995, p. 361-385.

CONSTANTI, M.; POBLET, M.; AROLA, L.; MAS. A., GUILLAMÓN, J.M. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. **American Journal of Enology and Viticulture,** n.48, v.3, p.339-344, 1997.

DELGADO, A. A.; CESAR, M. A. A. **Elementos de tecnologia e engenharia do açúcar de cana.** Piracicaba, 1977, p. 365-752.

DOMÍNGUEZ, V. E. L.; NELSON, D. L.; MAIA, A. B. R.; Influência do fubá e do farelo de arroz sobre a formação de produtos secundários da fermentação alcoólica. **STAB**, Piracicaba, v.15, n.4, p. 28-31, 1997.

FARIA, J. B. **A influência do cobre na qualidade das aguardentes de cana (*Saccharum officinarum*, L.)**. 1989. 88p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

FARIA, J. B.; DELIZA, R.; ROSSI, E. A. Compostos sulfurados e a qualidade das aguardentes de cana (*Saccharum officinarum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v.13, n.1, p. 89-93, 1993.

FERREIRA, L. V. **Fermentação de trealose e glicogênio endógenos em *Saccharomyces cerevisiae***. 1998. 125 p. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba,1998.

FERREIRA, L. V. **Estudo da fermentação alcoólica em frascos agitados**. Campinas, 2002. 235 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2002.

FLEET, G. H.; LAFON-LAFOURCADE, S.; REBÉREAU-GAYON, P. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of bordeaux wines. **Applied and Environmental Microbiology,** n.48, v.5, p.1034-1038, 1984.

FRANCO, D. W. Controle de qualidade de aguardentes. Palestra: Resumo. Campinas: FEA/UNICAMP, 2001.

FURTADO, S. M. **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. 99p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1995.

GAO, C.; FLEET, G. H. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of wine yeast, *Saccharomyces cerevisiae, Candida stellata* and *Kloeckera apiculata.* **Journal of Applied Bacteriology**, v. 65, p.405-409, 1988.

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

GIUDICI, P.; ZAMBONELLI, C.; KUNKEE, R.E. Increased production of n-propanol in wine by yeast strains having an impaired ability to form hydrogen sulfide. **American Journal of Enology and Viticulture**, n. 44, v.1 p. 17-21, 1993.

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

GUYMON, J. F. Chemical aspects of distilling wines into brandy. In: WEBB, A. D. (ed.) **Chemistry of Winemaking,** Dallas: American Chemical Society, 1973. p. 232-253.

HENSCHKE P. A. & JIRANEK V. Yeasts - Metabolism of nitrogen compounds. In: **Wine Microbiology and Biotechnology**. FLEET, G. H. ed. Suissa: Hardwood Academic Publishers, 1994, 510p.

HONIG, P. **Principios de Tecnologia azucarera.** México: Continental, 1974, v.1, 645p.

HORII, J. Condução de processos fermentativos. In.: SEMINÁRIO SOBRE ECONOMIA E TECNOLOGIA DO ÁLCOOL; 1, Piracicaba, p. 37-41. **Anais**. São Paulo, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1980.

ISIQUE, W. D.; CARDELLO, H. M. A. B.; FARIA, J. B. Teores de enxofre e aceitabilidade de aguardentes de cana brasileiras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.3, ago.-out., 1998.

ISIQUE, W. D.; LIMA-NETO, B. S.; FRANCO, D. W. A qualidade da cachaça, uma opinião para discussão. **O Engarrafador Moderno**, p.32-36, julho. 2002.

JANZANTTI, N. S.; CARDELLO, H. M. A. B.; FRANCO, M. R. B. Análise Descritiva Quantitativa de aguardente de cana. *In*:. IV Brazilian Meeting on Chemistry of Foods and Beverages. **Anais**. Campinas: FEA/UNICAMP, 2002, p. 60.

JENKINS, G. H. **Introduction to sugar cane technology.** Elsevier, 1966. 478p.

JONES, R. P.; PAMMENT N.; P. F. GREENFIELD. Alcohol fermentation by yeasts: The effect of environmental and other variables**. Process Biochemistry**, London, 1981. v.16, p. 42-49.

JORGENSEN, A. **Microbiologia de las fermentaciones industriales**. Zaragoza: Acribia, 1959. 591p.

KOMEN, J. P. Factors in clarifications. **Society of Sugar Cane Technology,** Queensland, p.97-102, 1966.

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

LEHTONEN, M.; JOUNELA-ERIKSSON, P. Volatile and non-volatile compounds in the flavour of alcoholic beverages. In: PIGGOTT, J. R. **Flavour of distilled beverages**: Origin and Development. Flórida: Verlag Chemie International Inc., 1983. p. 64-78.

LEME, Jr. J.; BORGES, J. M. **Açúcar de cana** Viçosa: Imprensa Universitária, Universidade Rural do Estado de Minas Gerais, 1965. 328p.

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

LIMA, U. de A. Produção de etanol. In: LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgar Blucher, 1975. v.1, p. 48-69.

LIMA, U. de A. Aguardentes. In: AQUARONE, E.; LIMA, U. de A.; BORZANI, W. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgar Blucher, 1983. 227p. (Série Biotecnologia 5).

LIMA, U. de A. Produção nacional de aguardentes e potencialidades dos mercados interno e externo. In: MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. **Aguardente de cana: produção e qualidade**. Jaboticabal: FUNEP, 1992, p.54-98.

LLISTÓ, A. M. S. M.; SOUZA, L. G. de; MISCHAN, M. M. Alguns componentes do coeficiente não-álcool das aguardentes de cana: ésteres. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v.5, p.45-50, 1979.

LONGO, E.; VELÁZQUEZ, J. B.; SIEIRO, C.; CANSADO, J., CALO, P.; VILLA, T. G. Production of higher alcohols, ethyl acetate, acetaldehyde and other

compounds by 14 Saccharomyces cerevisiae wine strains isolated from the same region (Salnés, N. W. Spain). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 8, p. 539-541, 1992.

LUONG, J. H. T. Kinetics of etanol inibition in alcohol fermentation. **Biotechnology Bioengineering,** v. 27, p. 280-285, 1984.

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

MAIA, A. B. R. Componentes voláteis da Aguardente. **STAB,** Piracicaba, v.12, n.6, p. 29-34, 1994.

MAIORELLA, B. L. Ethanol. In: **Comprehensive biotechnology.** Berkeley: University of California, 1989. p.861-914.

MARCELLINI; P., S. **Análise Descritiva Quantitativa de aguardentes de cana (*Saccharum spp*) comerciais e destiladas em alambiques de cobre e aço-inoxidável**. 2000. 77p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2000.

MARIELLER, C. Traitemente des matières sucreès. In: MARIELLER, C. **Distillerie agricole e industrielle.** Paris: Baillière et fils, 1950. v.4, c.VII, p.336-487.

MORAES, M. A. C**. Métodos para avaliação sensorial dos alimentos.** 8. ed. Experimental, Campinas: editora da UNICAMP, 1993. 93p.

MORAIS, P. B.; ROSA, C. A., LINARDI, V. R.; PATARO, C.; MAIA, A. B. R. A. Short communication: characterization and succession of yeast populations

associated with spontaneous fermentations during the production of brazilian sugar-cane aguardente. **World Journal of Microbiology & Biotechnology,** Oxford, v.13, p.241-243, 1997.

MUÑOZ, A. M.; CIVILLE, G. V., CARR, B. T. **Sensory evaluation in quality control**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1992. 240p.

NAGODAWITHANA, T. W.; STEINKRAUS, K. H. Effect of dissolved oxygen, temperature, initial cell count, and sugar concentration on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in rapid fermentations. **Applied Microbiology,** v.28, p. 383-391, 1974.

NOBREGA, I. C. da C. **Características de qualidade de aguardentes de cana comerciais e comparação entre dois processos de fermentação**. 1994. 67p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1994.

NOVAES, F. V. STUPIELLO, J. P.; OLIVEIRA, E. R. de; VALSECHI, O. **I Curso de extensão em tecnologia de aguardente de cana**. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 1974. 104p.

NOVAES, F. V. **Noções básicas sobre a teoria da destilação**. Piracicaba: ESALQ, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, 1994. 22p.

NOVAES, F. V. **Produção e qualidade da aguardente de cana**. Piracicaba: ESALQ, 1995. 27p. (Apostila)

NOVAES, F. V. Em nome da qualidade da aguardente de cana. **O Engarrafador Moderno**, v.7, n.46, p.68-73, jan-fev. 1997.

NYKÄNEN, L.; NYKÄNEN, I. Production of esters by different yeast strains in sugar fermentations. **Journal of the Institute of Brewing**, London, n.83, p.30-31, 1977.

NYKÄNEN, L.; NYKÄNEN, I. Rum flavour. In: PIGGOTT, J. R. **Flavour of distilled beverages**: Origin and Development. Flórida: Verlag Chemie Internacional, INC., 1983. p. 49-63.

NYKÄNEN, L. Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.37, n.1, p.84-96, 1986.

NYKÄNEN, L.; NYKÄNEN, I. Distilled beverages. In: MAARSE, H. (Ed.) **Volatile compounds in food and beverages**. New York: Marcel Dekker, INC., 1991. p. 548-580.

OLIVEIRA, E. S. **Fermentação Alcoólica: produção industrial de etanol**. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia/UFMG, 1993. 24 p. (Apostila)

OLIVEIRA, E. S. **Características fermentativas, formação de compostos voláteis; e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas em destilarias artesanais.** 2001. 135p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2001.

OLIVEIRA, A. J.; GALLO, C. R.; ALCARDE, V. E.; GODOY, A.; AMORIM, H.V. In: AMORIN, H. V. **Métodos para o controle microbiológico a produção de álcool e açúcar**. Piracicaba: ESALQ/USP.1996. cap.3, p.22-24.

PATARO, C.; SANTOS, A.; CORREIA, S. R.; MORAIS, P. B.; LINARDI, V. R.; ROSA, C. A. Physiological caracterization of yeasts isolated from artisanal

fermentation in an aguardente distillery. **Revista de microbiologia**, São Paulo, n. 29, p.69-73, 1998.

PATARO, C.; GUERRA, J. B.; PETRILLO-PEIXOTO, M. L.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; LINARDI, V. R.; ROSA, C. A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.88, p.1-9, 2000.

PATARO, C.; GOMES, F. C. O.; ARAÚJO, R. A.C.; ROSA, C. A.; SCHWAN, R. F.; CAMPOS, C. R.; CLARET, A. S.; CASTRO, H. A. de. Utilização de leveduras selecionadas na fabricação de cachaça de alambique. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.23, n.217, p.37-43, 2002.

PAYNE, J. H. Reacciones fundamentales del proceso de clarificacion. In: Honig, P. **Principios de Tecnologia Azucarera**, ed., Continental. vol.1, c.13, p.437-464, 1974.

PEDDIE, H. A. B. Ester formation in brewery fermentations. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v.96, p.327-331, sept.-oct., 1990.

PIGGOTT, J. R. **Distilled beverage flavour: recent developments** Chinchester: E. Horwood, 1989 352p.

PINOTTI, R. F. Quantificação do nível de nitrogênio nas etapas do processo de produção de álcool. **STAB**, Piracicaba, v.10, n.1, p.34-35, 1991.

PULZATTO, M. E. **Ação do fósforo e do enxofre na clarificação por sulfo-defecação do caldo de cana-de-açúcar.** 1995. 77p. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1995.

PULZATTO, M. E. **Fatores que Influem na Obtenção de Biomassa de Levedura Seca (*Saccharomyces cerevisiae*) da Fermentação alcoólica.** 2000. 112p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2000.

RAMSAY, C. M.; BERRY, D. R. Effect of temperature and pH on the formation of higher alcohols, fatty acids and esters in the malt whisky fermentation. **Food Microbiology,** London, n.1, p.117-121, 1984.

REED, G. Microbial biomass, single-cell protein, and other microbial products. In: REED, G. **Prescott & Dunn's Industrial Microbiology.** 4 ed., Westport: AVI, 1982. p.541-592.

RIBEIRO, F. J.; LOPES, J. J.; FERRARI, S. E. Complementação de nitrogênio de forma contínua no processo de fermentação alcoólica. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v.1, n.105, p.26-30, 1987.

RIBEIRO, C. A. F., HORII, J. Caldo clarificado para a produção de aguardente de cana. In: Simpósio Latino Americano de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2. **Resumos**. Campinas: FEA/UNICAMP, 1997, p.121.

RIBEIRO, C. A. F. **Potencialidades de diferentes linhagens de levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* na tecnologia de aguardente de cana.** 1997. 107 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997

RODRIGUÉZ, C. W.; VALDÉS, P.; MARTÍNEZ, M. Los carbohidratos y las proteínas solubles de la canã de azúcar en diferentes etapas de su crescimiento. **Ciencias de la Agricultura,** Academia de Ciências de Cuba, n.24, p.55-61, 1985.

SALMON, J. M.; MAURICIO, J. C. Relationship between sugar uptake kinetics and total sugar comsuption in different industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains during alcoholic fermentation. **Biotechnology Letters,** v. 16, n.1, p.89-94,1994.

SALMON, J. M.; BARRE, P. Improvement of nitrogen assimilation and fermentation knetics under enological conditions by depression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.10, p.3831-3837, 1998.

SANNI, A. I.; LONNER, C. Identification of yeasts isolated from Nigerian traditional alcoholic beverages. **Food Microbiology,** London, v.10, p.517-523, 1993.

SCHWAN, R. F.; CASTRO, H. A. Fermentação alcoólica. In: CARDOSO, M. das G. (Ed.). **Produção de Aguardente de cana-de-açúcar.** Lavras: UFLA, 2001. p. 45-47.

SHARMA, S. C.; JOHARY, P. C. Amino-acid removal during cane juice clarification. **International Sugar Journal**, v.86, n.1021, p.7-11, 1984.

SILVA, C. A. B. **Produção de aguardente de cana**. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes-FUNARBE, 1995. 36p. (Série Perfis Agroindustriais, 4).

SOUZA, L. G. de; LLISTÓ, A. M. S. M. Alguns componentes do coeficiente não álcool das aguardentes de cana: determinação por cromatografia de fase gasosa. **Brasil Açucareiro,** Rio de Janeiro, n.3, p.109-112, 1978.

STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation pratices**. 2.ed. San Diego: Academic Press Inc., 1993, 336 p.

STUPIELLO, J. P. Produção de Aguardente: qualidade da matéria-prima. In: MUTTON, M. J. R., MUTTON, M. A. **Aguardente de cana: produção e qualidade.** Jaboticabal: Funep, 1992. p.93-132.

STUPIELLO, J. P. A cana-de-açúcar como matéria-prima. In: **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização.** Campinas: Fundação Cargil, 1987. v.2 p. 761-849.

STUPIELLO, J. P; HORII, J. Considerações sobre tratamento de caldo de cana para fermentação alcoólica. **Álcool & Açúcar,** n.3, p.40-46, 1985.

STUPIELLO, J. P; HORII, J. Condução da fermentação alcoólica. **Saccharum**, v.4, n.17, p.43-46, 1981.

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

TEIXEIRA, E. **Apostila de análise físico-sensorial.** Florianópolis, 1995. 105p.

VALSECHI, O. **Aguardente de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 1960. 116p.

VASCONCELOS, Y. Cachaça sem mistério. **Pesquisa Fapesp,** n.87, p.74-77, 2003.

WATSON, K. Temperature relations. In.: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The Yeasts**. 2 ed. Academic Press, London, 1987. v. 2, c.3, p. 41-71.

WHITING, G. C. Organic acid metabolism of yeast during fermentation of alcoholic beverages - a revew. **Journal of the Institute of Brewing,** London, v.82, p.84-92, 1976.

EFEITO DE NITROGÊNIO PROTÉICO NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Elisangela Marques Jeronimo[1]; Elson Luíz Rocha Souza[2]; Gil Eduardo Serra[3]

[1]Doutoranda do curso de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP; [2]Laboratório de Análise de Bebidas e Vinagres de Andradas, Ministério da Agricultura e do Abastecimento; [3]Professor Dr. da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

RESUMO

Estudos de complementação nitrogenada em fermentação alcoólica têm sido conduzidos utilizando adubos nitrogenados como sulfato de amônia, superfosfato simples e uréia, e dirigidos para a produção de álcool. Nas destilarias artesanais de cachaça a complementação nitrogenada do mosto pode constituir uma prática benéfica na multiplicação e no crescimento celular do fermento, e consequentemente para a melhoria dos índices de eficiência, rendimento e produtividade do processo. Fontes nitrogenadas minerais, bastante empregadas, mostram resultados muitas vezes controversos. Estudos verificaram que a oferta de fonte complexa de nitrogênio, como extrato de levedura, influenciou o rendimento em etanol, massa celular e outros parâmetros da fermentação alcoólica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da clarificação do caldo de cana sobre o teor de nitrogênio protéico do mosto, e a adição de nitrogênio protéico sobre parâmetros fermentativos e formação de compostos secundários, em escala de laboratório. A clarificação comprometeu a multiplicação celular, sem afetar a viabilidade, o que pode afetar o reaproveitamento do fermento para novas bateladas de fermentação. A adição de nitrogênio protéico influiu positivamente na manutenção da viabilidade celular, podendo assim propiciar melhor qualidade do fermento reciclado; alterou a formação de álcoois superiores, aumentando a formação de propanol e reduzindo a de isobutanol e de álcool isoamílico. O benefício da adição de N protéico também ocorreu na redução do tempo de fermentação. A complementação do mosto de caldo de cana com N protéico que contenha formas assimiláveis é recomendada.

Palavras-chave: fermentação alcoólica; cachaça; clarificação do caldo; nitrogênio protéico; levedura; *Saccharomyces*.

THE EFFECT OF PROTEIC NITROGEN ON THE ALCOHOLIC FERMENTATION

SUMMARY

Studies on the addition of nitrogen source in alcoholic fermentation have been conducted using nitrogen fertilizers as ammonium sulphate, superphosphates and urea, but applied for alcohol production. In small sugarcane distilleries the sugarcane juice complementation with nitrogen can constitute a benefical practice in yeast multiplication and cellular growth, and also for the improvement of fermentation yield and productivity. Mineral nitrogen sources, many times show controversial results. Several authors verified that the nitrogen complex source, influenced the ethanol yield, yeast biomass and other alcoholic fermentation parameters. The goal of this work is to evaluate the influence of sugarcane juice clarification on proteic nitrogen content of juice, and by otherhand the addition of proteic nitrogen souce - yeast extract on the fermentation parameters and volatile compounds produced. The sugarcane juice clarification reduced the cellular multiplication, without affecting the cell viability, and endanger yeast recycling for a new fermentation. The proteic nitrogen additions enhanced cellular viability and ensure yeast recycling operation. Higher levels of proteic nitrogen affected the synthesis of volatile superior alcohols, increasing propilic formation and reducing isobutilic and isoamilic alcohol. Proteic nitrogen addition also reduced fermentation time.
Key words: ethanol fermentation; sugarcane liquor; juice clarification; proteic nitrogen; yeast; *Saccharomyces*.

1. INTRODUÇÃO

A fermentação para obtenção de cachaça em pequenos e médios produtores artesanais é conduzida pelo processo de cortes e/ou decantação, com duração de cerca de 30 horas. Esse tempo é substancialmente maior que o de 8 a 10 horas de destilarias de álcool que operam com o processo de separação de células com centrifugação e seu reaproveitamento. Assim, nas destilarias artesanais de cachaça a qualidade do fermento reciclado é comprometida e a

complementação nitrogenada do mosto pode constituir uma prática benéfica na multiplicação e no crescimento celular do fermento, e consequentemente para a melhoria dos índices de eficiência, rendimento e produtividade do processo, conforme também opina Ribeiro, Lopes e Ferrari (1987). Fontes nitrogenadas minerais, bastante empregadas, mostram resultados muitas vezes controversos.

Estudos de fermentação foram realizados por Pulzatto (2000) com diversas cepas de levedura, em condições de laboratório em mosto sintético, contendo fonte de nitrogênio amoniacal e com teores variados de nitrogênio protéico, correspondendo a 3, 6 e 9 g/L de extrato de levedura. A produção específica de células (Yx/s) aumentou linearmente com o aumento do nitrogênio protéico no meio. Também foram positivamente influenciados o teor de etanol no vinho e o rendimento da fermentação, conforme equações de segundo grau ambas com r= +1,00.

O rendimento da fermentação é uma importante característica de economia da produção, e no caso da cachaça pode afetar diretamente a sua qualidade. Vinhos com teor alcoólico padronizado certamente originam destilados igualmente mais padronizados (OLIVEIRA, 2001).

Jorgensen (1959) ao discutir resultados de outros pesquisadores, bem como Henschke & Jiranek (1994), relatam que o nitrogênio orgânico assimilado pelas leveduras alcoólicas são aminoácidos, amidas e pequenos peptídeos, uréia e amônia, utilizando-se de vários sistemas de transporte e absorção. Os substratos naturais (com nitrogênio orgânico) são mais adequados à incorporação de nitrogênio que os substratos amoniacais.

Durante a fase de crescimento da levedura, o nitrogênio é rapidamente assimilado, pois fornece precursores para a síntese de aminoácidos e ácidos nucléicos, dando suporte a altas taxas de crescimento e produção de biomassa, e estimulando a atividade fermentativa (HENSCHKE & JIRANEK, 1994; PULZATTO, 2000).

Em média o caldo de cana contém 200-600 ppm de nitrogênio, do qual cerca de 60% está presente como amônia e amino-compostos. Os compostos não-açúcares nitrogenados presentes no caldo de cana compreendem amidas de

aminoácidos (como asparagina e glutamina), compostos de alto peso molecular (proteínas) e aminoácidos (SHARMA & JOHARY, 1984).

A cachaça é usualmente produzida a partir da fermentação do caldo de cana bruto, sem qualquer tratamento de clarificação. Segundo Honig (1974) o caldo de cana possui material disperso, que consiste principalmente de terra, partículas de bagaço, cera, proteínas, gomas, pectinas, taninos e materiais corantes. A clarificação do caldo de cana reduz os não-açúcares e colóides, e diminui a turbidez do caldo (KOMEN, 1966). Do ponto de vista da clarificação, os compostos mais importantes a serem eliminados são os sais, proteínas e gomas (JENKINS, 1966).

O aquecimento do caldo até a ebulição, sem adição de cal, provoca a formação de flocos de colóides que centrifugados representam uma quantidade de 0,05 a 0,1 g/L. Este precipitado é composto principalmente de não-açúcares nitrogenados (6-25 mg/L), lipídeos - material análogo a ceras (3-15 mg/L), pentosanas (3-5 mg/L), sesquióxidos de ferro e alumínio (2-7 mg/L) e cálcio, fósforo, magnésio e sílica (HONIG, 1974).

Marieller (1950) mostra que a clarificação do caldo de cana promove uma precipitação total das albuminas, o que resulta na redução do nitrogênio total no caldo clarificado. As frações de nitrogênio amoniacal, amínico e amídico não são alteradas pela clarificação.

Novaes (1995) afirma e descreve que não há variedades de cana que sejam específicas à produção de aguardente, pois as pequenas diferenças na sua composição físico-química muito provavelmente não teriam qualquer influência na qualidade da bebida final. As variedades de cana devem ser adaptadas às condições edafoclimáticas da região onde se encontra instalada a unidade industrial, com a finalidade de apresentar elevada produtividade de açúcar por área.

O pH do caldo de cana (matéria-prima sadia) varia entre 5,2-5,8 (LIMA, 1975). Ferreira (2002) verificou que em condições de inóculo 10^8 células viáveis/mL, o pH inicial do meio mostrou influência no metabolismo da levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). Em pH 3,5 a eficiência e o rendimento foram maiores

que em pH 5,0. Segundo Novaes et al. (1974), durante a fermentação a acidez aumenta, enquanto o pH diminui, devido à formação de ácidos orgânicos.

O efeito da temperatura na velocidade das reações bioquímicas é bem conhecido. Segundo Jones, Pamment e Greenfield (1981) a temperatura ótima para a fermentação é de 5-10 °C acima do ótimo para o crescimento da levedura, que para Watson (1987) encontra-se na faixa de 25-30 °C. Porém, Alves (1994) ressalta que estas considerações não condizem com o fato de que nas regiões tropicais a temperatura do processo facilmente atinge 40 °C. Stupiello & Horii (1981) afirmaram que a reprodução de células pode ocorrer até temperatura da ordem de 38 ºC, havendo inibição da multiplicação a 40 ºC na presença de 8 a 9ºGL de etanol.

A utilização de linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* na fabricação da cachaça de alambique está sendo avaliada por alguns pesquisadores (PATARO et al., 2002) em conjunto com produtores de aguardente artesanal em Minas Gerais. Oliveira (2001) avaliou 24 linhagens de leveduras pertencentes à espécie *S. cerevisiae* e 6 pertencentes a gêneros diversos (*Candida, Kloechera, Pichia* e *Schizosaccharomyces*), isoladas de fermentações em produtores de aguardente de cana. As linhagens, estudadas em meio sintético, apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos parâmetros fermentativos de rendimento da fermentação, eficiência, e velocidade específica de crescimento celular. As linhagens de *S. cerevisiae* apresentaram rendimento entre 83 a 91%, enquanto as não *Saccharomyces* o rendimento foi de 24-70%, mostrando que as linhagens de *S. cerevisiae* são mais adequadas para a fermentação alcoólica, por serem as leveduras mais tolerantes ao etanol (OLIVEIRA, 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os tratamentos para clarificação do caldo de cana sobre o teor de nitrogênio protéico, estudar a influência da adição de nitrogênio protéico, em fermentações em escala de laboratório, com uma linhagem selecionada de *S. cerevisiae*, sobre alguns parâmetros fermentativos e sobre a formação de compostos secundários.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados 6 tratamentos, com 4 repetições. CN/SE: caldo de cana natural, sem adição de extrato de levedura; CN/5: caldo de cana natural, com adição de 5g/L de extrato de levedura (cerca de 2,71g de proteína/L); CN/10: caldo de cana natural, com adição de 10 g/L de extrato de levedura (cerca de 5,42g de proteína/L); CC/SE: caldo de cana clarificado, sem adição de extrato de levedura; CC/5: caldo de cana clarificado, com adição de 5 g/L de extrato de levedura (cerca de 2,71g de proteína/L); CC/10: caldo de cana clarificado, com adição de 10 g/L de extrato de levedura (cerca de 5,42g de proteína/L).

O procedimento adotado de clarificação foi similar àquele utilizado em destilarias artesanais de aguardente, que consiste no aquecimento do caldo até ebulição. Foi adotado o procedimento de manter a ebulição por 2 minutos, seguindo o resfriamento em banho de água fria até temperatura ambiente, e retirando as impurezas flotadas com uma peneira de malha fina.

Todos os experimentos foram conduzidos com a linhagem de levedura *S. cerevisiae* UFMG-A905, proveniente da coleção da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, isolada de alambique artesanal, e estudada por Oliveira (2001). A linhagem foi mantida em "slants" em meio GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1%, NaH_2PO_4 0,2% e ágar 2 %). Para o preparo do inóculo, a partir dos "slants" de manutenção, a linhagem foi inoculada em meio de ativação (PDA – Potato Agar Dextrose), isto é, estriada em “slants” 24h antes da inoculação em meio para propagação. Após 24 horas o inóculo de cada “slant” foi assepticamente transferido para seis frascos de 250 mL contendo 100 mL de meio sintético estéril composto de: glicose 40g/L; fosfato diácido de potássio 5g/L; cloreto de amônio 5g/L; sulfato de magnésio heptahidratado 1,0g/L; cloreto de potássio 1,0g/L; extrato de levedura 9,0g/L, pH 6,0. Os frascos foram incubados à temperatura de 32 ºC, a 150 rpm, por 10 horas. O conteúdo de cada frasco foi assepticamente transferido para seis frascos de 2 L contendo 1200 mL do mesmo meio de cultivo estéril; estes foram incubados nas mesmas condições anteriores.

A massa celular foi separada por centrifugação, ressuspensa em água destilada, lavada duas vezes, e usada como inóculo, com assepsia adequada.

Foi utilizada cana de açúcar da variedade SP71-1406, colhida na véspera da moagem. A extração do caldo foi efetuada em moenda de um único terno. O caldo de cana-de-açúcar foi diluído a 15 °Brix, com água destilada. Como fonte de nitrogênio protéico foi adicionado extrato de levedura (5 e 10g/L). As fermentações foram conduzidas em frascos erlenmeyer de 250mL, com 130mL de mosto, inoculados com levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFMG-A905 (10^8cel. viáveis/mL) e incubados a 36 ± 1 °C e 150rpm. Foi utilizado extrato de levedura comercial Prodex Lac SD, com 54,15% de proteína (b.s.), pH 6,78 e 3,05% de umidade.

A contagem de células e sua viabilidade celular foram determinadas em câmara de Neubauer e corante eritrosina, segundo Bonneu et al. (1991). O tempo de fermentação foi estabelecido através dos resultados da cinética de liberação de CO_2. O nitrogênio total no mosto e no vinho foi determinado pelo método de Kjeldahl, conforme descrito em Caldas (1998). A acidez total foi determinada por titulometria, com NaOH 0,025N, segundo ABNT (1997) e o pH foi lido em potenciômetro digital. Amostras do vinho foram destiladas em microdestilador de álcool para as determinações de etanol e compostos secundários. O etanol no destilado foi determinado pelo método espectrofotométrico do dicromato de potássio modificado (SALIK & POVOH, 1993). A determinação de açúcares redutores totais no mosto foi realizada pelo método de Lane & Eynon (AMORIM, 1996), e no vinho pelo método de Somogy & Nelson (AMORIM, 1996).

As determinações de aldeídos, ésteres, álcoois superiores (propanol, isobutanol e álcool isoamílico, foram realizadas em cromatógrafo a gás Shimadzu GC-17-A, com auto injetor, detector de ionização de chama, e coluna cromatográfica capilar DB-WAX (30m x 0,25m x 0,25µm). As análises foram conduzidas nas seguintes condições: temperatura do injetor foi de 180 °C e do detector de 190 °C; programação de temperatura da coluna: 40 °C (5 min), 20 °C/min até 120 °C (1 min), 30 °C/min até 180 °C (1 min), tempo total da corrida de 13 minutos; gás de arraste utilizado foi o nitrogênio e o ar; injeções com divisão de

fluxo (split) de 1:15; volume de amostra injetado de 1,0μL. Os compostos foram quantificados com técnica de padrão externo; os padrões foram preparados em solução de etanol a 40% v/v.

Os resultados foram analisados estatisticamente, submetidos à análise de variância (Teste F) e comparação de médias (Teste de Duncan).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A clarificação do caldo, geralmente visa a redução de formação de espuma nas dornas e é obtida pela coagulação de proteínas mediante o aquecimento. Os colóides coagulados tendem a flotar no caldo devido à presença de microbolhas de ar presas aos conglomerados de partículas coloidais. Essas impurezas flotadas são retiradas manualmente ou por transbordamento em um tanque de passagem.

A análise estatística foi aplicada individualmente para caldo natural e clarificado, uma vez que a clarificação alterou a concentração de açúcares. Os valores do coeficiente de variação dos diversos resultados mostram a pequena variabilidade dos resultados nas repetições e experimentos, permitindo um maior grau de confiabilidade na sua interpretação.

O teor de etanol no vinho mostrou que todos os tratamentos apresentaram teores entre 8,30 a 8,45%, em média. O rendimento da fermentação, isto é, a quantidade de açúcar do mosto transformada em etanol, não mostrou alteração estatisticamente significativa, e situou-se entre 81 a 82% em média (Tabela 1). Assim, não ocorreram diferenças válidas entre o caldo natural e o clarificado, nem tampouco para a adição de N protéico. Porém, Pulzatto (2000) verificou que a concentração de etanol no vinho aumentou com a adição de extrato de levedura.

Por outro lado, os resultados de eficiência da levedura e de conversão de açúcares mostram que a adição de N protéico atuou na atividade fermentativa da levedura. A eficiência diz respeito ao etanol formado em relação ao açúcar consumido do substrato. A eficiência nada mais é que o fator $Y_{p/s}$ transformado em porcentagem.

A adição de N protéico, em caldo natural e clarificado, reduziu a eficiência da levedura significativamente. Como os resultados de microbiologia da fermentação (Tabela 2) não mostram maior multiplicação em presença de extrato de levedura, a justificativa desse resultado é atribuída ao desvio do consumo de açúcar da produção de etanol para a assimilação em carboidratos de reserva. É reconhecido (FERREIRA, 1998) que a maior viabilidade das células é dependente do maior teor de carboidratos de reserva. Em concordância, a conversão de açúcares mostrou ser maior nos tratamentos com mais condições de crescimento celular, que são os de caldo natural e aqueles com fonte nitrogenada protéica. Pulzatto (2000) também constatou que a conversão de substrato é mais elevada em meios com maiores teores de extrato de levedura e que a quantidade (g) de células de leveduras produzidas por grama de ART consumido aumentou com o aumento da adição de extrato de levedura.

Em ausência de complementação com extrato de levedura, a viabilidade celular diminuiu drasticamente, tanto no caldo natural quanto no clarificado, podendo comprometer a sua reutilização como “fermento” ou inóculo para outras fermentações como é praticado na produção de aguardente.

Em caldo natural a adição de N protéico conduziu a uma redução no tempo de fermentação, o que eqüivale a um aumento na produtividade de 12,5%, além de propiciar um expressivo aumento na viabilidade da levedura (Tabela 2).

Os resultados de acidez e pH (Tabela 1) mostram que os mesmos aumentaram proporcionalmente à adição de extrato de levedura. Embora a acidez aumente, o pH não diminui, uma vez que o extrato tampona o efeito dos ácidos orgânicos.

A adição de extrato de levedura provoca dois efeitos distintos. Primeiro, a sua acidez intrínseca contribui para a elevação da acidez do meio. Por outro lado, o pH não mostrou diminuição em virtude do elevado poder tamponante do extrato de levedura, mostrando até mesmo pequena elevação. No vinho, os ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação, provocam elevação da acidez e redução proporcional do pH.

O N protéico original do caldo foi parcialmente consumido pela levedura na fermentação, resultando um consumo de cerca de 67% do mesmo (Tabela 3). A maior oferta de nitrogênio protéico conduziu a um relevante aumento no seu consumo pela levedura, conforme mostra a Tabela 3 e Figura 1.

A clarificação por simples aquecimento e eliminação de material flotado, não resultou na eliminação de proteínas (Tabela 3). Esta clarificação simulou aquela conduzida em alguns alambiques artesanais, mostrando que o material flotado nessas circunstâncias não contém proteínas. A adição de 5g/L de extrato de levedura foi equivalente a um aumento superior a 150% de proteína originalmente presente no caldo.

Pela Figura 1 observa-se que com a adição de teores próximos a 0,9% de extrato de levedura no mosto, o consumo de N protéico pela levedura tende a atingir um patamar máximo para caldo natural. A levedura mostrou uma demanda linear em caldo clarificado. Pulzatto (2000) também verificou que a presença de N protéico em quantidades adequadas é um fator de extrema importância para a multiplicação celular da levedura. Assim, durante a fase de crescimento da levedura, o nitrogênio é assimilado, dando suporte a altas taxas de crescimento e estimulando a atividade fermentativa.

TABELA 1 - Médias dos tratamentos, análise de variância (Teste F) e comparação de médias (Teste de Duncan), para os tratamentos com extrato de levedura (0, 5 e 10g/L), em Caldo Natural e Caldo Clarificado. Análise estatística individual para caldo natural e caldo clarificado.

Teste F: * significância ao nível de 5% de probabilidade; ** significância ao nível de 1% de probabilidade; Teste de Duncan: médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao

CALDO NATURAL (CN)			CALDO CLARIFI	
0g/L	5g/L	10g/L	0g/L	5g/L
Rendimento da fermentação (%)				
82,75 a	81,45 a	81,15 a	80,04 a	79,95
Teste F ns C.V. 1,12			Teste F ns C.V. 1,	
Conversão (%)				
90,05 b	92,73 a	92,64 a	82,60 b	90,62
Teste F ** C.V. 0,38			Teste F ** C.V. 0,	
Eficiência da levedura (%)				
91,90 a	87,82 b	87,10 b	96,91 a	88,39
Teste F ** C.V. 1,46			Teste F ** C.V. 1,	
Etanol no vinho (%)				
8,42 a	8,29 a	8,26 a	8,45 a	8,39
Teste F ns C.V. 1,40			Teste F ns C.V. 1,2	
Acidez no mosto (mg ác.acético/100g amostra)				
55,00 c	73,00 b	97,00 a	52,00 c	70,00
Teste F ** C.V. 0,08			Teste F ** C.V. 0,1	
pH no mosto				
5,53 c	5,90 b	6,00 a	5,53 c	5,81
Teste F ** C.V. 0,37			Teste F ** C.V. 0.	
Acidez no vinho (mg ác.acético/100g amostra)				
229,00 c	236,00 b	251,00 a	244,00 c	250,00
Teste F ** C.V. 1,01			Teste F ** C.V. 0,5	
pH no vinho				
3,89 c	4,22 b	4,51 a	3,88 c	4,22
Teste F ** C.V. 0,45			Teste F ** C.V. 0	
Tempo final(horas)				
8	7	7	8	8

nível de 5% de probabilidade; C.V.: coeficiente de variação.

TABELA 2 - Resultados de contagem de células e viabilidade celular no mosto inoculado e no vinho; crescimento celular no vinho em relação ao mosto, nos tratamentos de Caldo Natural e Clarificado, sem extrato de levedura (SE) e com 5 e 10g/L de extrato.

	MOSTO			VINHO			NOVAS CÉLULAS	
	cel. vivas x 10^8	cel. mortas x 10^8	viabilidade %	cel. vivas x 10^8	cel. mortas x 10^8	viabilidade %	mortas x 10^8	vivas x 10^8
				CALDO NATURAL (CN)				
SE	5,80	0,56	91,22	5,96	1,80	76,61 c	1,30	1,64
5	4,78	0,39	92,31	5,41	0,79	87,06 a	0,50	1,03
10	4,78	0,37	92,86	5,89	0,78	87,39 a	0,46	1,43
				CALDO CLARIFICADO (CC)				
SE	4,11	0,31	92,99	4,56	1,63	77,50 c	1,07	1,77
5	4,94	0,41	92,37	4,29	0,82	85,40 ab	0,17	-
10	3,86	0,29	93,11	3,64	0,77	82,16 b	0,40	0,26
Teste F						**		
C.V.						2,34		

Teste F: * significância ao nível de 5% de probabilidade; ** significância ao nível de 1% de probabilidade; Teste de Duncan: médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade; C.V.: coeficiente de variação.

TABELA 3 - Médias dos tratamentos, análise de variância (Teste F) e comparação de médias (Teste de Duncan), para proteína no mosto e no vinho, para os tratamentos com extrato de levedura (0, 5 e 10g/L), em Caldo Natural e Caldo Clarificado.

Teste F: * significância ao nível de 5% de probabilidade; ** significância ao nível de 1% de probabilidade; Teste de Duncan: médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao

CALDO NATURAL (CN)			CALDO CLARIFI	
EXTRATO DE LEVEDURA				
0g/L	5g/L	10g/L	0g/L	5g/L
Proteína no Caldo (%)				
0,21 f	0,54 c	0,87 b	0,22 e	0,50 d
Teste F **				C.V.

Proteína no Vinho (%)				
0,07 f	0,22 d	0,47 b	0,08 e	0,24 c
Teste F **				C.V.

nível de 5% de probabilidade; C.V.: coeficiente de variação.

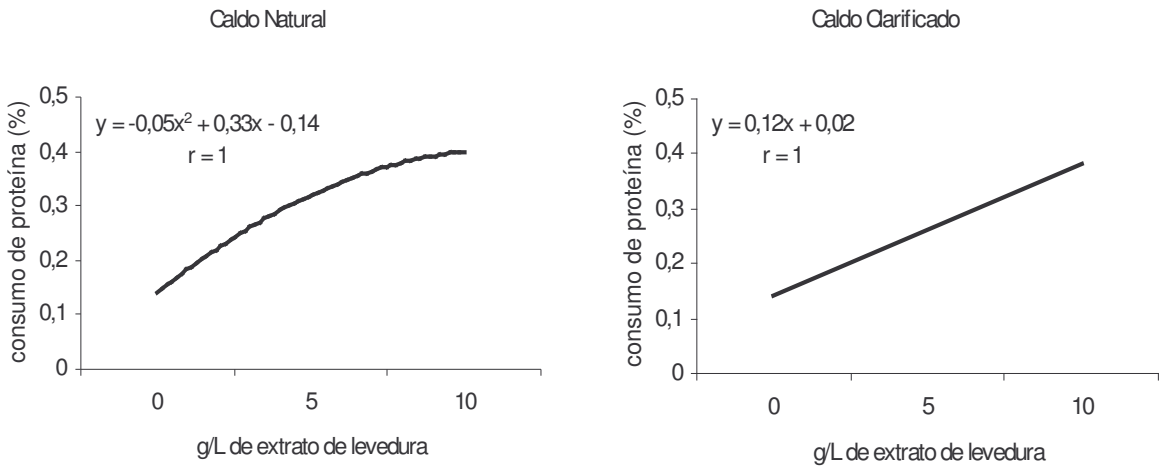


FIGURA 1. Consumo de proteína, nos tratamentos de Caldo Natural e Clarificado.

Os teores de aldeídos (Tabela 4) não foram elevados (32,74 a 49,49 mg/100 mL de álcool anidro) e não mostraram uma relação definida com a clarificação e com a adição de N protéico. Oliveira (2001) encontrou teores considerados mais baixos (16,00 mg/100 mL de álcool anidro) para aldeídos em vinhos de fermentações obtidas com a mesma linhagem de levedura, em meio sintético. Estes compostos desempenham um importante papel no desenvolvimento de sabores, possuem um "threshold" muito baixo, e tendem a ser considerados como "off-flavours" (BERRY, 1995). Trata-se da fração mais volátil das bebidas alcoólicas (NYKANEM, 1986), e que têm um odor pronunciado. Os aldeídos são formados durante a fermentação através da oxidação de álcoois, degradação oxidativa de Strecker de aminoácidos e auto-xidação de ácidos graxos insaturados (NYKANEN & SUOMALAINEN, 1983).

Os teores de ésteres (Tabela 4) não foram elevados (32,28 a 38,66 mg/100 mL de álcool anidro) e os resultados também não mostraram uma relação definida com o tratamento de clarificação e com o teor de N protéico. Oliveira (2001) encontrou níveis de produção deste composto mais baixos (7,60 mg/100 mL de álcool anidro), em vinhos de fermentações com a mesma linhagem de levedura UFMG-A905, em meio sintético. O acetato de etila é o mais abundante éster das bebidas alcoólicas; os ésteres apresentam odor agradável de frutas e são considerados compostos importantes de aroma nas bebidas alcoólicas (LEHTONEM & JOUNELA-ERIKSON, 1983). Em quantidades excessivas, conferem aroma indesejável e enjoativo (MAIA, 1994).

Os teores dos álcoois superiores, propanol, isobutanol e álcool isoamílico formam quantitativamente o maior grupo de compostos responsáveis pelo aroma e sabor das bebidas alcoólicas. Sabe-se que estes compostos fazem parte dos principais álcoois superiores produzidos pelas leveduras e são formados a partir de carboidratos e de aminoácidos, respectivamente na rota de biossíntese de aminoácidos e na de catabolismo dos mesmos (NIKANEM & SOUMALAINEM, 1983; PIGOTT et al., 1989). Verifica-se que os teores de propanol foram mais elevados nos caldos fermentados com a adição de extrato de levedura e que os

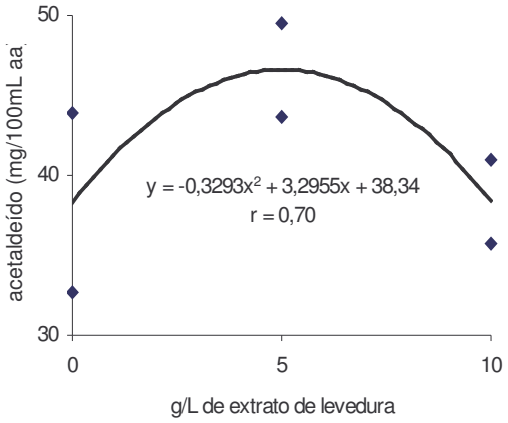
teores de álcool isoamílico e isobutanol foram menores nos caldos com extrato de levedura (Tabela 4). Vários pesquisadores envolvidos com o estudo de aguardente relatam que teores elevados de propanol estão correlacionados com aguardentes de qualidade inferior (ALMEIDA & BARRETO, 1971). A Figura 2 mostra a ação da adição de N protéico nos teores dos compostos secundários.

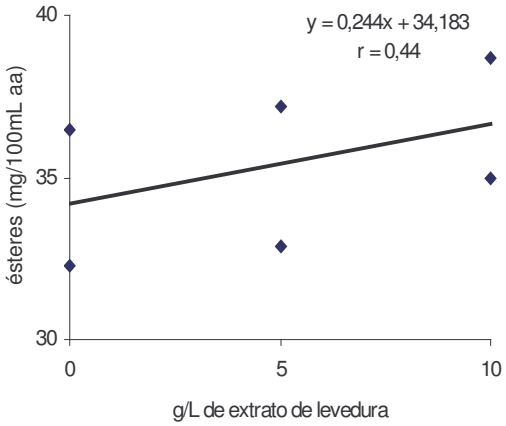
TABELA 4 - Médias dos tratamentos, análise de variância (Teste F) e comparação de médias (Teste de Duncan), para aldeídos, ésteres, propanol, isobutanol e álcool isoamílico e álcoois superiores totais presente no vinho.

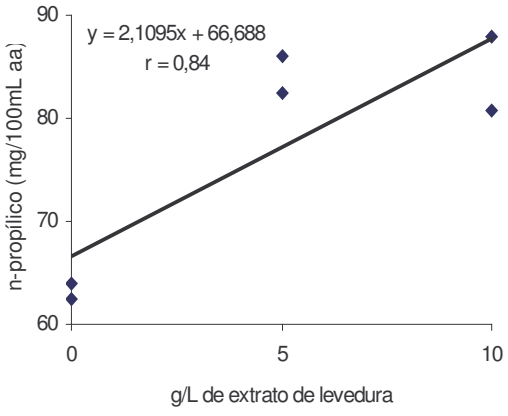
Teste F: * significância ao nível de 5% de probabilidade; ** significância ao nível de 1% de probabilidade; Teste de Duncan: médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao

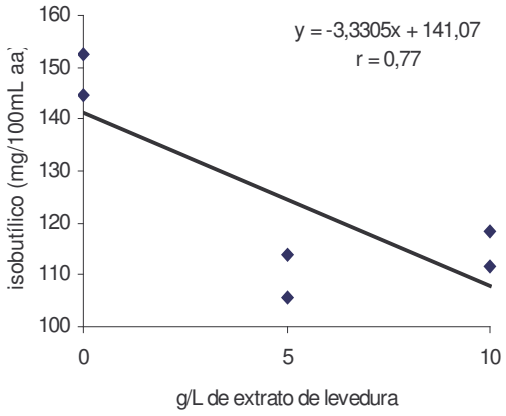
CALDO NATURAL (CN)			CALDO CLARIF	
0g/L	5g/L	10g/L	0g/L	5g/L
Aldeídos (mg/100mL álcool anidro, em acetaldeído)				
32,74 c	43,68 ab	41,02 abc	43,94 ab	49,49
Teste F *			C.V.	
Ésteres (mg/100mL álcool anidro, em acetato de etila)				
32,28 b	32,85 b	34,96 ab	36,46 ab	37,21
Teste F ns			C.V.	
Propanol (mg/100mL álcool anidro)				
63,95 c	86,01 ab	87,85 a	62,40 c	82,51
Teste F **			C.V.	
Isobutanol (mg/100mL álcool anidro)				
152,35 a	113,86 cd	118,47 c	144,51 b	105,5
Teste F **			C.V.	
Álcool Isoamílico (mg/100mL álcool anidro)				
354,57 a	337,17 b	320,83 c	357,59 a	331,2
Teste F **			C.V.	
Álcoois Superiores Totais (mg/100mL álcool anidro)				
570,87 a	537,04 b	527,15 bc	564,50 a	519,31
Teste F **			C.V.	

nível de 5% de probabilidade; C.V.: coeficiente de variação.


acetaldeído (mg/100mL aa)
50
40
30
0
5
10
y = -0,3293x² + 3,2955x + 38,34
r = 0,70
g/L de extrato de levedura


ésteres (mg/100mL aa)
40
35
30
0
5
10
y = 0,244x + 34,183
r = 0,44
g/L de extrato de levedura


n-propílico (mg/100mL aa)
90
80
70
60
0
5
10
y = 2,1095x + 66,688
r = 0,84
g/L de extrato de levedura


isobutílico (mg/100mL aa)
160
150
140
130
120
110
100
0
5
10
y = -3,3305x + 141,07
r = 0,77
g/L de extrato de levedura

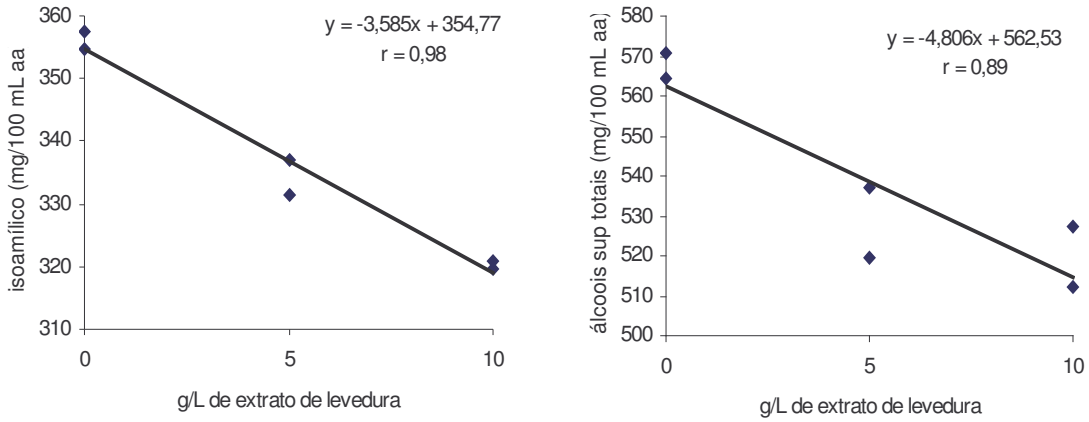


FIGURA 2. Equação e Coeficiente de correlação (r) entre os teores de N protéico e os diversos compostos secundários no vinho, nos tratamentos de Caldo Natural e Clarificado

4. CONCLUSÕES

A clarificação do caldo comprometeu a multiplicação celular, sem afetar a viabilidade. O uso de caldo não clarificado surge como mais indicado.

A adição de nitrogênio protéico influiu positivamente na manutenção da viabilidade celular, podendo assim propiciar melhor qualidade do fermento reciclado.

A adição de N protéico alterou a formação de álcoois superiores, aumentando a formação de propanol e reduzindo a de isobutanol e de álcool isoamílico.

A complementação do mosto de caldo de cana com N protéico que contenha formas assimiláveis é recomendada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. E. W., BARRETO, H. H. C. Álcoois superiores em aguardente de cana por cromatografia gasosa. **Revista do Instituto Adolfo Lutz,** São Paulo, v.31, p.117-123, 1971.

ALVES, D. M. G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica**. 1994. 251p. Dissertação (Mestrado em microbiologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G. **Processos de produção de álcool:** controle e monitoramento. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1996. 103p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS **NBR 13856** Acidez titulável total, volátil total e fixa. São Paulo, 1997.

BERRY, D. R. Alcoholic beverage fermentations. In: LEA, A. G. H., PIGGOTT, J. R. **Fermented Beverage Production** 1.ed. London: Blackie Academic & Professional, 1995. cap.2, p. 32-44.

BONNEU, M.; CROUZET, M.; URDACI, M.; AIGLE, M. Direct selection of yeast mutants with reduced viability on plates by erythrosine B. stainining. **Analytical Biochemistry,** v.193, p.225-230, 1991.

CALDAS, C. **Manual de análises selecionadas para indústrias sucroalcooleiras**. Sindicato da Indústria do Açúcar e do Álcool no Estado de Alagoas. Maceió. 1998. 423p.

FERREIRA, L. V. **Fermentação de trealose e glicogênio endógenos em *Saccharomyces cerevisiae***. 1998. 125 p. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba,1998.

FERREIRA, L. V. **Estudo da fermentação alcoólica em frascos agitados**. Campinas, 2002. 235 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2002.

HENSCHKE P. A. & JIRANEK V. Yeasts - Metabolism of nitrogen compounds. In: **Wine Microbiology and Biotechnology**. FLEET, G. H. ed. Suissa: Hardwood Academic Publishers, 1994, 510p.

HONIG, P. **Principios de Tecnologia azucarera.** México: Continental, 1974, v.1, 645p.

JENKINS, G. H. **Introduction to sugar cane technology.** Elsevier, 1966. 478p.

JONES, R. P.; PAMMENT N.; P. F. GREENFIELD. Alcohol fermentation by yeasts: The effect of environmental and other variables**. Process Biochemistry**, London, v. 16, p. 42-9, 1981.

JORGENSEN, A. **Microbiologia de las fermentaciones industriales**. Zaragoza: Acribia,1959. 591p.

KOMEN, J. P. Factors in clarifications. **Society of Sugar Cane Technology** Quensland, p.97-102, 1966.

LEHTONEN, M.; JOUNELA-ERIKSSON, P. Volatile and non-volatile compounds in the flavour of alcoholic beverages. In: PIGGOTT, J.R. **Flavour of distilled beverages**: Origin and Development. Flórida: Verlag Chemie International Inc., 1983. p. 64-78.

LIMA, U de A. Produção de etanol. In: LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgar Blucher, 1975. p. 48-69.

MAIA, A. B. R. Componentes voláteis da Aguardente. **STAB,** Piracicaba, v.12, n.6, p. 29-34, 1994.

MARIELLER, C. Traitemente des matières sucreès. In: MARIELLER, C. **Distillerie agricole e industrielle.** Paris: Baillière et fils, 1950. v.4, c.VII, p.336-487.

NOVAES, F. V. STUPIELLO, J. P.; OLIVEIRA, E. R. de; VALSECHI, O. **I Curso de extensão em tecnologia de aguardente de cana**. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 1974. 104p.

NOVAES, F. V. **Produção e qualidade da aguardente de cana**. Apostila. Piracicaba: ESALQ, 1995. 27p.

NYKÄNEN, L.; SUOMAILAINEN, H. **Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages**. Berlim: Akademic-Verlag, 1983, 413p..

NYKÄNEN, L. Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.37, n.1, p.84-96, 1986.

OLIVEIRA, E. S. **Características fermentativas, formação de compostos voláteis; e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas em destilarias artesanais.** 2001. 135p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2001.

OLIVEIRA, E. S. Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast**. World Journal of Microbiology & Biotechnology,** v.20, p.19-24, 2004.

PATARO, C.; GOMES, F. C. O.; ARAÚJO, R. A.C.; ROSA, C. A.; SCHWAN, R. F.; CAMPOS, C. R.; CLARET, A. S.; CASTRO, H. A. de. Utilização de leveduras selecionadas na fabricação de cachaça de alambique. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.23, n.217, p.37-43, 2002.

PIGGOTT, J. R. **Distilled beverage flavour: recent developments** Chinchester: E. Horwood, 1989 352p.

PULZATTO, M. E. **Fatores que Influem na Obtenção de Biomassa de Levedura Seca (*Saccharomyces cerevisiae*) da Fermentação alcoólica.** 2000. 112p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2000.

RIBEIRO, F. J.; LOPES, J. J.; FERRARI, S. E. Complementação de nitrogênio de forma contínua no processo de fermentação alcoólica. **Brasil Açucareiro**, v.1, n.105, p.26-30, 1987.

SALIK, F. L. M.; POVH, N. P. Método espectrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas. In: CONCRESSO NACIONAL DA STAB, 5, 1993, Águas de São Pedro. **Anais**. Piracicaba: STAB, 1993. p.262-266.

SHARMA, S. C.; JOHARY, P. C. Amino-acid removal during cane juice clarification. **International Sugar Journal**, v.86, n.1021, p.7-11, 1984.

STUPIELLO, J. P; HORII, J. Condução da fermentação alcoólica. **Saccharum**, v.4, n.17, p.43-46, 1981.

WATSON, K. Temperature relations. In.: ROSE, A. H. & HARRISON, J. S. **The Yeasts**. 2ª ed. Academic Press, London. 1987. v.2, c.3, p.41-71.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado e auxílio financeiro. Ao Prof. Dr. Carlos A. Rosa, da Universidade Federal de Minas Gerais, por ceder a linhagem de levedura para execução do trabalho.

PERFIL SENSORIAL DE AGUARDENTE DE CANA EM FUNÇÃO DA DILUIÇÃO E VARIAÇÃO DA ACIDEZ DA AMOSTRA

Elisangela Marques Jeronimo[1]; Helena Maria André Bolini Cardello[2]; Gil Eduardo Serra[3]

[1]Doutoranda do curso de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP; [2]Professora Dra. da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP; [3]Professor Dr. da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

RESUMO

Foi estudada a influência da concentração alcoólica e da acidez no perfil de percepção sensorial de aguardente de cana pelos provadores, detectando igualdades ou diferenças na avaliação sensorial de atributos típicos de aroma e sabor do produto. Foi utilizada uma aguardente recém-destilada, que foi submetida a diluição e acidificação com ácido succínico, originando quatro amostras para provas. Concluiu-se que a concentração alcoólica e a acidez não

influíram na avaliação sensorial dos atributos típicos da aguardente. A diluição da aguardente não contribui para a maximização da percepção de diferenças entre duas amostras, nem tampouco a variação da acidez mascara a expressão sensorial dos atributos devidos aos componentes secundários da aguardente representados principalmente por aldeídos, álcoois superiores, ésteres e ácidos orgânicos.

Palavras chave: aguardente; análise sensorial, cachaça;

SUGARCANE LIQUOR SENSORY PROFILE IN FUNCTION DILUTION SAMPLE AND ACIDITY VARIATION

SUMMARY

The present study goal was going to investigate the alcoholic concentration influence and of the acidity in the sugarcane liquor sensory perception profile by the provers, about the equalities or differences detection in the product aroma and flavor typical attributes sensory evaluation. It was going used a sugarcane spirit recently-distillate, which was going submitted at dilution and acidification with succinic acid, originating four samples for proofs. It concluded that the alcoholic concentration and the acidity didn't influence the brandy typical attributes sensory evaluation. The sugar cane spirit dilution doesn't contribute for greatest of the differences perception between two samples, neither at acidity variation masked the attributes sensory expression due to the represented sugarcane liquor secondary components mostly for aldehyde, superior alcohols, esters and organics acid.

Key Words: sugar cane spirit; sensory analysis, cachaça

1. INTRODUÇÃO

A Aguardente de cana tem sua composição normatizada pelo Decreto Federal nº 2314 de 04/09/97, e pela Portaria nº 371 do Ministério da Agricultura, de 18/09/1974, como sendo uma bebida com graduação alcoólica de 38-54% de etanol em volume, a 20°C, obtida da destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar (BRASIL, 1997). Deve se enquadrar no Padrão de Identidade e Qualidade, com base na legislação brasileira (BRASIL, 1997), que especifica que os componentes secundários voláteis (soma de aldeídos, ácidos voláteis, ésteres, furfural e álcoois superiores) não podem ser inferiores a 200mg/100mL de álcool anidro. Qualitativamente, os principais componentes do sabor da aguardente são os mesmos encontrados nas demais bebidas alcoólicas (MAIA, 1994).

Uma boa aguardente não deve possuir em sua composição teores não permitidos de substâncias que possam ser nocivas ao consumidor mesmo quando estas não prejudiquem as propriedades sensoriais da bebida (cor, aroma, sabor). Assim, a cachaça deve ser submetida aos controles de qualidade químico e sensorial. Uma bebida quimicamente aprovada, mas cujos atributos sensoriais não agradem ao consumidor, estará fadada ao insucesso. Por outro lado, uma bebida de excelente qualidade sensorial pode apresentar em sua composição substâncias indesejáveis, em teores elevados, e não serem detectados pelo apreciador (ISIQUE et al., 2002).

O sabor das bebidas alcoólicas é formado por inúmeros compostos orgânicos voláteis, que conferem à bebida seu odor e gosto típico. Esses compostos podem ser divididos em vários grupos de acordo com sua natureza química. Álcoois superiores, ácidos graxos e ésteres formam quantitativa e qualitativamente os grupos mais importantes presentes nas bebidas alcoólicas, sendo os álcoois superiores os mais abundantes (LEHTONEN & JOUNELA-ERIKSSON, 1983; BERRY, 1995).

Em aguardentes produzidas por diferentes linhagens de leveduras Oliveira (2001) verificou variações nos teores e nas relações entre os principais compostos voláteis, mas estas não resultaram em diferenças perceptíveis em relação à aceitação do aroma, sabor e impressão global das aguardentes.

O sabor perceptível é aquele resultante da combinação de vários componentes; apesar das diferentes bebidas destiladas serem distinguidas uma das outras por suas características sensoriais, não se verifica grande diferença na sua composição química (COLE & NOBLE ,1995).

Cardello & Faria (1998), pesquisadores envolvidos com estudos de produção e qualidade da aguardente, destacam que apesar da importância econômica e social da aguardente brasileira, são ainda muito escassos os estudos sobre sua qualidade sensorial. Porém, as crescentes exigências do mercado têm feito crescer a preocupação com a qualidade dessa bebida.

Estudos em alimentos e bebidas, visando relacionar os componentes responsáveis pelo aroma e sabor com sua qualidade, são monitorados com análise sensorial que continua sendo, ainda, a única forma de avaliar a aceitação dos mesmos diretamente através da percepção humana (STONE & SIDEL, 1993).

Quando pessoas são usadas como instrumento de medida, é necessário controlar cada uma das condições e métodos de avaliação, para reduzir erros, podendo-se considerar como erro toda influência estranha que prejudique o bom resultado do teste sensorial (TEIXEIRA, 1995).

Os testes sensoriais são incluídos como uma garantia de qualidade na indústria de alimentos e bebidas, devido a representarem uma medida multidimensional integrada, com importantes vantagens, como: ser capaz de identificar a presença ou ausência de diferenças perceptíveis, definir características sensoriais importantes de um produto de forma rápida, ser capaz de detectar particularidades que não podem ser detectadas com outros procedimentos analíticos, e ainda ser capaz de avaliar a aceitação de produtos (MUÑOZ et al., 1992).

A analise descritiva quantitativa, metodologia bastante aplicada para caracterização dos atributos sensoriais de alimentos e bebidas, foi utilizada por Cardello & Faria (1998) para estudar o perfil sensorial da aguardente de cana envelhecida em tonéis de carvalho. Marcellini (2000) também utilizou a metodologia de análise sensorial descritiva quantitativa para traçar o perfil sensorial de amostras de aguardentes comerciais, envelhecidas e tradicionais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Uma vez que certos grupos que industrializam aguardente utilizam a prática da diluição do produto para realização de análise sensorial, com o intuito de salientar características sensoriais negativas, o presente estudo foi realizado para verificar se esta prática pode ser útil às técnicas tradicionais, e investigar tanto a influência da concentração alcoólica como da acidez no perfil de percepção sensorial de aguardente de cana pelos provadores, sobre a detecção de igualdades ou diferenças na avaliação sensorial de atributos típicos de aroma e sabor do produto, caracterizando-se (qualitativa e quantitativamente) estes atributos.

Foi utilizada uma aguardente de cana produzida com uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* (UFMG - A1605), isolada de fermentação de um produtor de cachaça artesanal.

Essa aguardente foi produzida na Planta Piloto de Processamento do Departamento de Tecnologia de Alimentos (FEA - UNICAMP), tendo sido destilada em alambique de cobre. Essa aguardente foi selecionada, dentre outras, com base nos padrões de qualidade e identidade da bebida e considerando apresentar baixa acidez e álcoois superiores em teores adequados (Tabela 1).

TABELA 1 - Teor alcoólico (%v/v), compostos voláteis (mg/100 mL álcool anidro) e pH na aguardente produzida por Oliveira (2001).

Aguardente	ºGL[1]	AcVol[2]	Actald[3]	AcEtil[4]	Prop[5]	AlSup[6]	CVT[7]	pH
UFMG A1605	39,2	38,52	14,39	14,53	11,36	316,63	384,07	4,67

[1] Grau Alcoólico (%v/v); [2] Acidez volátil em ácido acético; [3] Acetaldeído; [4] Acetato de Etila; [5] Propanol; [6] Álcoois superiores; [7] Compostos Voláteis Totais.
Fonte: (OLIVEIRA 2001).

À partir dessa aguardente foram preparadas quatro amostras para o estudo sensorial. As amostras preparadas (Tabela 2) diferem quanto à concentração alcoólica mediante sua diluição com água desmineralizada, como também na sua

acidez mediante a adição de ácido succínico. As quatro amostras diferem, portanto, na concentração alcoólica e acidez:

TABELA 2 - Amostras de aguardente preparadas para o estudo sensorial, variando o teor alcoólico e a acidez.

Amostras	GN/SA	GD/SA	GN/CA	GD/CA[1]
% etanol v/v, a 20°C	39	20	39	20
mg ácido acético/100mL etanol	48	24	90	48
mg ácido acético/100mL aguardente	18,5	10	35	19

[1] GN/SA = Grau Alcoólico Normal/Sem Acidificação; GD/SA = Grau Alcoólico Diluído/Sem Acidificação; GN/CA = Grau Alcoólico Normal/Com Acidificação; GD/CA = Grau Alcoólico Diluído/Com Acidificação;

Pré-seleção da Equipe

Para pré-selecionar provadores com base em seu poder discriminativo, foram realizados testes triangulares.

Inicialmente, conforme a metodologia, 30 provadores foram avaliados por sua capacidade em reconhecer diferenças entre duas amostras. Considerando que foram conduzidos oito testes triangulares, foram selecionados aqueles que obtiveram mais de 70% de acertos nos oito testes aplicados. Para a análise dos dados do teste triangular, foi utilizado o teste χ^2 (qui-quadrado), conforme Roessler & Alder (1972). As amostras contaram com a adição de sacarose e a diferenciação ao nível de significância desejado (0,1%) ocorreu com a adição de 4% de açúcar, em uma outra aguardente, também produzida por Oliveira (2001). Este nível de significância de 0,1% entre as duas amostras foi avaliado através de um teste triangular realizado com 30 provadores, preliminarmente.

Dentre os candidatos aprovados, foi priorizado escolher os provadores que mostraram disposição, dedicação e disponibilidade de tempo para participar da equipe sensorial na etapa de análise descritiva quantitativa das aguardentes e se submeterem a um treinamento adequado.

Levantamento da Percepção de Atributos

Doze provadores foram utilizados para o levantamento dos termos descritivos, através do método de rede de Kelly (Kelly's Repertory Grid Method"), descrito em Moskowitz (1983). Os provadores receberam as amostras aos pares, em todas as combinações, e descreveram termos descritores do aroma e sabor

segundo sua percepção (por exemplo, salgado, capim, garapa, etc.) em ficha apropriada.

Depois do levantamento dos termos, a equipe se reuniu várias vezes, e através de um debate, foram escolhidos os termos mais apropriados e importantes, que realmente descrevessem os atributos das amostras.

A partir dos atributos escolhidos, foi elaborada uma Ficha de Avaliação com uma escala não estruturada, de 9 centímetros, ancorada nos pontos extremos, tendo à esquerda o termo "fraco" ou "nenhum", e à direita "forte" para cada atributo.

Definição e referências dos atributos selecionados

Com os 12 provadores pré-selecionados, foram realizadas várias sessões de treinamento, para padronização das notas dos provadores, de forma que se situassem na mesma região da escala. Essa padronização é realizada com a apresentação das amostras referências dos extremos das escalas.

As referências foram escolhidas em função dos termos descritivos escolhidos e por sugestões da equipe.

Seleção dos provadores

Foram realizados os testes para a seleção da equipe definitiva para a análise descritiva quantitativa, já utilizando a ficha elaborada com as escalas de intensidade para os termos definidos.

Os provadores foram selecionados com base nas seguintes características: poder de discriminação entre as amostras, repetibilidade e concordância com a equipe.

Para isto foi realizada análise de variância (ANOVA) com duas fontes de variação (amostra e repetição) para cada atributo e para cada provador. Foram avaliados os valores para $F_{amostra}$ e $F_{repetição}$ de cada provador.

Foram selecionados os provadores com valores de $F_{amostra}$ significativo ($p \leq 0,50$) e $F_{repetição}$ não significativo para ($p > 0,05$) e concordância com as médias da equipe.

Avaliação das Amostras

As amostras foram servidas a cada provador da equipe, selecionada e treinada, em laboratório com cabines individuais, em cálices incolores de vidro transparente e codificados. Os cálices eram cobertos com vidro de relógio, que eram retirados no momento do teste.

Todas as amostras foram apresentadas de forma monádica, com três repetições aleatórias, num total de 12 sessões por provador.

Análise dos dados

Com os dados coletados, foi realizada análise de variância (ANOVA) de dois fatores (amostra e provadores) com interação para cada atributo. Foi aplicado o teste de Tukey para comparação das médias das amostras. Foi realizada também a Análise de Componentes Principais.

As análises estatísticas foram realizadas através dos programas do pacote estatístico SAS (SAS, 1993).

As médias foram apresentadas de forma tabular e gráfica, e a análise de componentes principais através de gráficos bidimensionais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil sensorial das amostras de aguardente foi traçado aplicando-se Análise Descritiva Quantitativa (STONE & SIDEL, 1993). Dezesseis candidatos foram utilizados para o levantamento dos termos descritores.

Através de reuniões realizadas com a equipe pré-selecionada de provadores, foram escolhidos os termos mais apropriados e importantes, que realmente descrevessem os atributos de aroma e sabor das amostras, para a elaboração da ficha de avaliação definitiva. Também foram estabelecidas as definições para cada termo e as referências para os pontos extremos da escala, para cada atributo, visando a fase de treinamento dos provadores.

A partir da lista obtida através do método de rede, os atributos escolhidos pelos membros da equipe sensorial (pré-selecionada anteriormente), foram: aroma alcoólico, aroma agressivo, sabor alcoólico, sabor agressivo, sabor adocicado, gosto amargo e gosto ácido.

Com o termos descritores gerados foi elaborada a ficha de avaliação para traçar o perfil sensorial das amostras.

No treinamento para os testes, os provadores participaram de várias sessões, nas quais eles tomavam contato com as referências e amostras, para determinação de uma memória sensorial do que representaram os pontos extremos da escala para cada termo descritor.

As referências, abreviaturas e definições dos termos descritores gerados para as amostras de aguardente encontram-se na Tabela 3.

TABELA 3 - Definições e referências para os termos descritores levantados pelos provadores.

Termo Descritor	Definição	Referências
Aroma Alcoólico (AAL)	É o aroma característico de etanol	"Fraco": etanol 20% "Forte": etanol 45%
Aroma Agressivo (AAG)	É o impacto agressivo do aroma inicial	"Fraco": aguardente envelhecida 20% "Forte": etanol 45%
Sabor Alcoólico (SAL)	Sabor característico de soluções alcoólicas	"Fraco": etanol 18% "Forte": etanol 44%
Sabor Agressivo (SAG)	É o impacto agressivo do sabor inicial	"Fraco": aguardente envelhecida 18% "Forte": etanol 45%
Sabor Adocicado (SAD)	É o gosto doce percebido no instante em que uma determinada substância entra em contato com os botões gustativos	"Fraco": etanol 20% "Forte": etanol 20% contendo 4% de agente adoçante
Gosto Amargo (GAM)	É o gosto amargo, característico de cafeína	"Nenhum": água destilada "Forte": etanol 38% com cafeína a 0,5%
Gosto Ácido (GAC)	É o gosto ácido, característico de frutas cítricas	"Fraco": etanol 20% "Forte": etanol 20% contendo 0,15% de ácido cítrico

Seleção dos provadores para a análise descritiva quantitativa

Na Tabela 4 estão expressos os resultados dos níveis de significância (p) de $F_{amostra}$ para cada provador, em relação a cada atributo. Foi observada uma maior variação de poder de discriminação entre os provadores. Porém, de um modo geral, 11 dos 12 provadores apresentaram valores de $F_{amostra}$ significativos ao nível de 50%, em pelo menos seis dos sete atributos avaliados, ou seja, capacidade para discriminar as amostras a esse nível de significância em 86% dos parâmetros, o que representa um nível de discriminação aceitável (Tabela 4). De acordo com estes critérios, os doze candidatos pré-selecionados foram selecionados, mas onze provadores compuseram a equipe sensorial definitiva.

Na Tabela 5 estão expressos os resultados dos níveis de significância (p) de $F_{repetição}$ para cada provador, em relação a cada atributo. Foram selecionados os provadores com os valores de p de $F_{repetição}$ não significativo ($p>0,05$). Provadores com p de $F_{repetição}$ $\leq 0,05$ não devem ser selecionados por possuírem baixo nível de repetibilidade. Porém, de maneira geral, os resultados revelaram uma alta reprodutibilidade dos provadores, pois apenas um dos provadores apresentou valor de $F_{repetição}$ significativo ($p \leq 0,05$) para mais de um atributo.

TABELA 4 - Resultados dos níveis de significância (p) de $f_{amostra}$ para cada provador, em relação a cada atributo.

Provador	AAL	AAG	SAL	SAG	SAD	GAM	GAC[1]
P1	0,0006	0,0494	0,0194	0,1282	0,0002	0,7171	0,0114
P2	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	0,0265	0,0186
P3	0,0057	0,0074	<,0001	0,0002	0,0187	0,2146	0,1783
P4	0,0068	0,0190	<,0001	0,0002	0,0056	0,0170	0,3581
P5	0,0001	<,0001	<,0001	<,0001	0,9015	0,5259	0,0284
P6	0,0037	0,0195	<,0001	0,0025	0,1858	0,4065	0,0014

P7	0,0057	0,0004	<,0001	<,0001	0,0515	0,2586	0,1441
P8	0,1046	0,0018	0,0153	0,0243	0,1040	<,0001	0,0081
P9	0,0391	0,0002	<,0001	<,0001	0,0640	0,0139	0,0238
P10	0,0001	<,0001	0,0012	<,0001	0,1523	0,0017	0,3942
P11	<,0001	<,0001	0,0028	<,0001	0,1184	<,0001	0,0005
P12	0,0003	0,0102	<,0001	0,0059	0,1714	0,0855	0,5538

(1)AAL = Aroma Alcoólico; AGG = Aroma Agressivo; AS = Sabor Alcoólico; SAG = Sabor Agressivo; SAD = Sabor Adocicado; GAM = Gosto Amargo; GAC = Gosto Ácido.

TABELA 5 - Resultados dos níveis de significância (p) de $f_{repetição}$ para cada provador, em relação a cada atributo.

Provador	AAL	AAG	SAL	SAG	SAD	GAM	GAC(1)
P1	0,0394	0,5120	0,6439	0,9947	0,1774	0,8801	0,4637
P2	0,9929	0,3904	0,0360	1,0000	0,0085	0,9489	0,3585
P3	0,0183	0,0070	0,0415	0,1535	0,2103	0,6420	0,4363
P4	0,7965	0,5936	0,9884	0,9512	0,1717	0,7108	0,5753
P5	0,5344	0,0298	0,6975	0,0889	0,9998	0,6054	0,3497
P6	0,3421	0,2174	0,5846	0,4287	0,2874	0,0974	0,2144
P7	0,5827	0,1512	0,8237	0,3423	0,6499	0,9880	0,4435
P8	0,9997	0,9370	0,7825	0,9600	0,2194	0,9677	0,8017
P9	0,9981	0,5532	0,3732	0,2424	0,9996	0,7297	0,5181
P10	0,1275	0,7301	0,5041	0,9090	0,3161	0,2102	0,0214
P11	0,1503	0,2594	0,2109	0,0032	0,9152	0,9535	0,0529
P12	0,7012	0,2617	0,1600	0,2390	0,0960	0,0096	0,3661

(1)AAL = Aroma Alcoólico; AGG = Aroma Agressivo; AS = Sabor Alcoólico; SAG = Sabor Agressivo; SAD = Sabor Adocicado; GAM = Gosto Amargo; GAC = Gosto Ácido.

Análise Descritiva Quantitativa

A Tabela 6 contém os resultados das médias. Através da diferença mínima significativa (DMS) obtida através do teste de médias de Tukey ($p \leq 0,05$), foi

realizada a comparação entre as médias. Numa mesma coluna, as médias marcadas com letras em comum não diferem entre si.

A análise de variância dos resultados (fontes de variação: provador, amostra e interação entre amostra e provador), mostrou que houve diferença significativa entre as amostras 1 e 3 (Aguardentes a 39% de etanol) e as amostras 2 e 4 (Aguardentes a 20% de etanol) em relação aos atributos: aroma alcoólico (AAL), aroma agressivo (AAG), sabor alcoólico (SAL), sabor agressivo (SAG).

Para o atributo gosto ácido (GAC), a amostra 3 (Aguardente Acidificada a 39% de etanol) obteve média significativamente maior ($p \leq 0,05$) em relação as amostras não acidificadas (Aguardente a 39% e 20% de etanol, 1 e 2, respectivamente). A amostra 4 (Aguardente Acidificada a 20% de etanol) também obteve média significativamente maior em relação à amostra 2 (Aguardente a 20% etanol). Porém, as amostras de Aguardente Acidificadas a 39% e 20% de etanol (3 e 4, respectivamente), não diferiram significativamente em relação ao gosto ácido.

Não houve diferença significativa entre as quatro amostras em relação ao atributo sabor adocicado (SAD).

Para o atributo gosto amargo (GAM) a amostra 3 (Aguardente Acidificada a 39% de etanol) obteve média significativamente maior ($p \leq 0,05$) em relação à amostra 4 (Aguardente Acidificada a 20% de etanol) e às amostras não acidificadas (Aguardente a 39% e 20% de etanol, 1 e 2, respectivamente). A amostra 4 (Aguardente Acidificada a 20% de etanol) diferiu significativamente em relação à amostra 3 (Aguardente a 39% de etanol).

TABELA 6 - Média dos atributos para as aguardentes e comparação pelo teste de tukey[(1)], para aguardentes com graduação normal e diluída, e sem ou com acidificação.

Amostra	AAL	AAG	SAL	SAG	SAD	GAM	GAC[(2)]

GN/SA	7,17 a	7,22 a	7,37 a	7,50 a	2,73 a	3,75 b	3,94 bc
GD/SA	1,73 b	1,37 b	1,86 b	1,42 b	2,85 a	2,56 c	3,21 c
GN/CA	7,38 a	7,32 a	7,34 a	7,67 a	2,66 a	4,71 a	5,05 a
GD/CA	2,06 b	1,61 b	2,43 b	2,42 b	3,33 a	3,63 b	4,25 ab
DMS[3]	0,5258	0,5925	0,5980	0,5214	0,9058	1,0619	0,8731

[1] médias seguidas pela mesma letra numa mesma coluna não diferem entre si estatisticamente ($p \leq 0,05$); [2] diferença mínima significativa entre as médias; [3] AAL = Aroma Alcoólico; AGG = Aroma Agressivo; AS = Sabor Alcoólico; SAG = Sabor Agressivo; SAD = Sabor Adocicado; GAM = Gosto Amargo; GAC = Gosto Ácido.

O perfil sensorial das amostras encontra-se registrado na Figura 1, e para uma melhor visualização, foram construídos quatro gráficos, cada um com o perfil sensorial de cada aguardente, separadamente.

No "gráfico estrela" é representada a intensidade média de cada atributo em um eixo de dimensão igual à escala utilizada pelos provadores na avaliação do produto, tomando-se o ponto central como zero e apenas sugere similaridades e diferenças entre as amostras.

A Figura 1 evidencia que as aguardentes com 39ºGL (amostras 1 e 3) apresentaram aroma alcoólico, aroma agressivo, sabor alcoólico e sabor agressivo de forma mais pronunciada que as demais amostras. Todas as aguardentes apresentaram praticamente a mesma intensidade dos atributos sabor adocicado. O gosto ácido foi percebido com a mesma intensidade nas aguardentes acidificadas a 39% e a 20% de etanol (amostras 3 e 4).

A análise multivariada dos dados sensoriais, realizada através de Análise de Componentes Principais (ACP), foi efetuada empregando-se o valor de cada atributo obtido por cada provador a cada amostra, em cada repetição.

Na representação gráfica da ACP (Figura 2), onde as configurações dos atributos sensoriais das aguardentes e a distribuição bidimensional dos mesmos foram representadas, cada eixo explica uma porcentagem da variação total que existe entre as amostras.

Verifica-se que 77,77% da variação ocorrida entre as amostras foi explicada pelo primeiro eixo (Componente Principal 1). Os Componentes Principais 1 e 2 explicaram juntos 92,97% da variação ocorrida entre as amostras. Isto demonstra que os descritores empregados discriminam satisfatoriamente as amostras analisadas.

Nesta análise, vetores de tamanho reduzido indicam atributos nas quais as amostras pouco diferem entre si. A Figura 2 mostra vetores que possuem tamanhos equivalentes entre si, portanto são atributos que têm importância semelhante para explicar as variações entre as amostras.

De acordo com Muñoz et al (1992), em uma figura que represente a ACP, vetores com medidas mais distantes de zero, correspondem a variações com maior influência sobre o valor do Componente Principal, enquanto que, vetores mais próximos de zero, indicam que correspondem a uma variável com pequena influência sobre o Componente Principal. Portanto, nem todos os atributos gerados para as amostras de aguardentes correspondem a variações de grande influência.

Os atributos GAC, GAM, SAG, SAM, AAG, AAL (positivamente) e SAD (negativamente) contribuíram com maior peso sobre a variabilidade associada ao primeiro eixo.

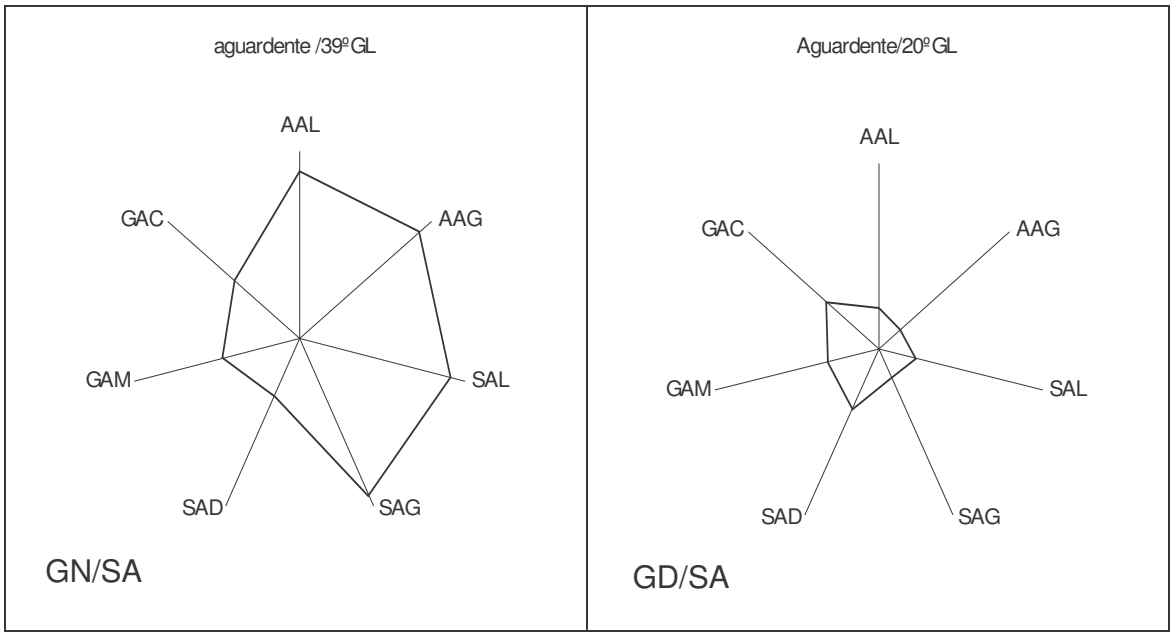
As amostras 1 e 3 ficaram bem distintas das amostras 2 e 4, marcadas pelas localizações bem definidas de cada uma no gráfico bidimensional.

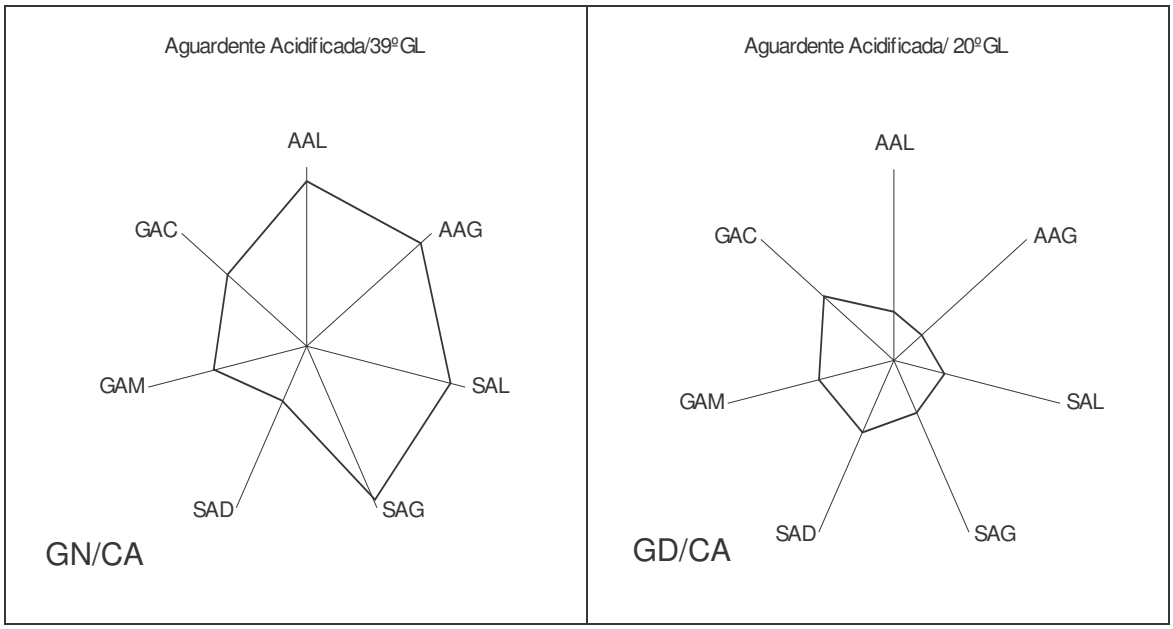
O experimento apresentou repetibilidade razoável, evidenciada pelo agrupamento dos pontos representativos de cada amostra.

Na ACP, as amostras localizaram-se próximas dos vetores (atributos) que as caracterizam. Portanto, as amostras 1 e 3 ficaram caracterizadas por SAG, SAL, AAL, AAG, GAM e GAC. A amostra 3 ficou caracterizada pelo GAM, GAC e SAD e a amostra 2, apenas pelo SAD.

A análise conjunta dos resultados das médias dos atributos, da representação do "gráfico estrela" e da análise de componentes principais, mostram que a concentração alcoólica e a acidificação das aguardentes não resultaram na atribuição de qualidade diferenciada para as aguardentes. Ou seja, os resultados coletados com a ADQ concluem que a diferente diluição da aguardente, embora detectada pela equipe sensorial, não contribui para a percepção de outros atributos possíveis na aguardente. E com relação à acidez, acrescentada pela adição de ácido succínico (não volátil, com características de sabor descrito como amargo/salgado, sem participação significativa no aroma), também não resulta para a percepção de outros atributos de qualidade da aguardente. Isto é, o aumento da concentração hidrogeniônica (H^+) não é um fator de modificação da percepção de outros possíveis atributos de qualidade da aguardente; assim, a presença de ácidos orgânicos que são componentes normais de uma aguardente (ácido acético e outros) influenciam a qualidade e percepção por suas características próprias de aroma e sabor.

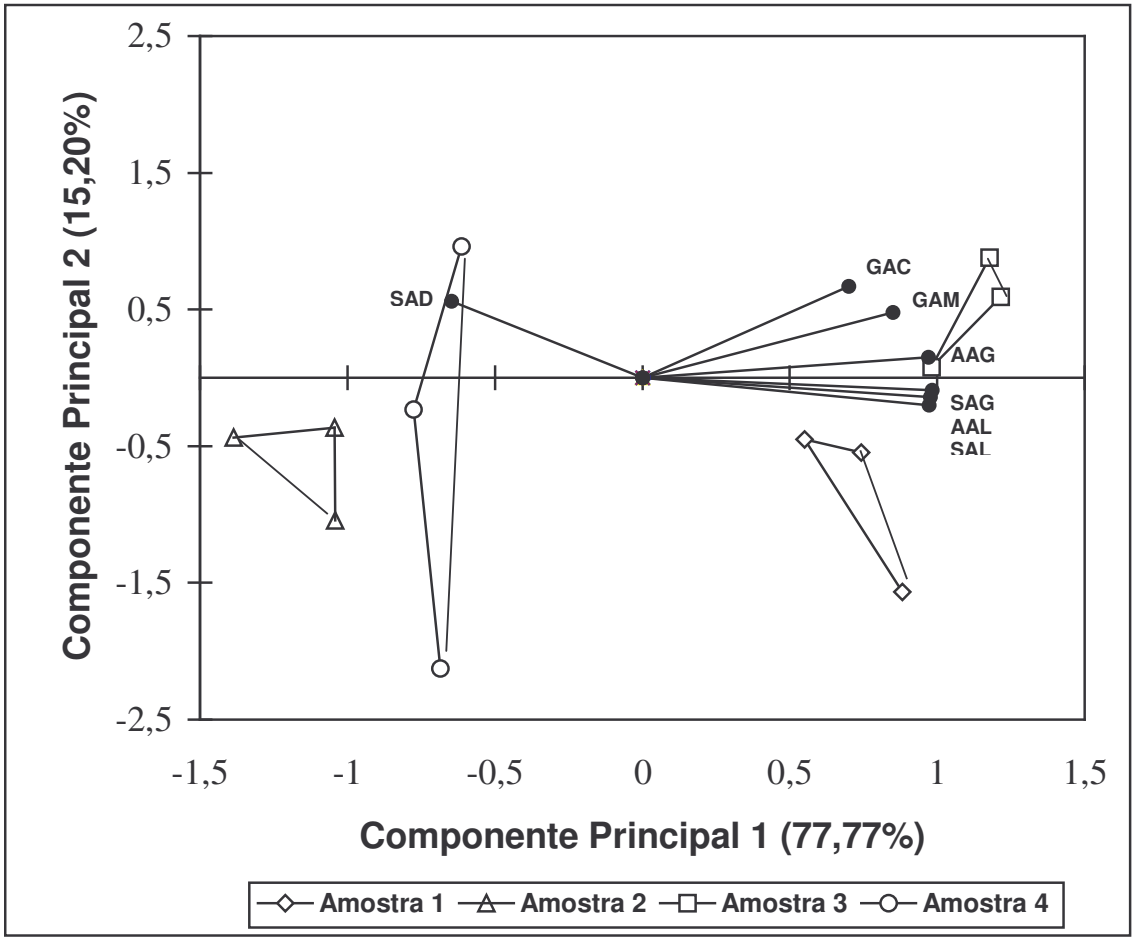
FIGURA 1 Perfil sensorial em gráfico estrela com as médias dos atributos das aguardentes com diferentes graduações alcoólicas e acidez





1 = aguardente 39ºGL; 2 = aguardente 20ºGL; 3 = aguardente acidificada 39ºGL; 4 = aguardente acidificada 20ºGL.;
AAL = Aroma Alcoólico; AGG = Aroma Agressivo; AS = Sabor Alcoólico; SAG = Sabor Agressivo; SAD = Sabor Adocicado; GAM = Gosto Amargo; GAC = Gosto Ácido.

FIGURA 2 - Figura bidimensional da análise de componentes principais das aguardentes.



1 = aguardente 39ºGL; 2 = aguardente 20ºGL; 3 = aguardente acidificada 39ºGL; 4 = aguardente acidificada 20ºGL.;
AAL = Aroma Alcoólico; AGG = Aroma Agressivo; AS = Sabor Alcoólico; SAG = Sabor Agressivo; SAD = Sabor Adocicado; GAM = Gosto Amargo; GAC = Gosto Ácido.

4. CONCLUSÕES

A concentração alcoólica e a acidez não influenciaram a detecção de igualdades ou diferenças na avaliação sensorial da aguardente.

A diluição da aguardente não contribui para a percepção de outros atributos possíveis na aguardente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERRY, D.R. Alcoholic beverage fermentations. In: LEA, A.G.H.; PIGGOTT, J.R. **Fermented Beverage Production.**1.ed. London: Blackie Academic & Professional, 1995, p. 32-44.

BRASIL. Decreto n° 2.314, de 04 de setembro de 1997. Dispõe sobre o registro, classificação, padronização, produção e fiscalização das bebidas. **Diário Oficial da União,** Brasilia, 05 de set. 1997.

CARDELLO, H. M. A. B. & FARIA, J. B. Análise descritiva quantitativa da aguardente de cana durante o envelhecimento em tonel de carvalho (Quercus alba L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** v.18, n.2, p.169-175, maio-jul, 1998.

COLE, V. C.; NOBLE, A. C. Flavor chemistry and assessment. In: LEA, A. G. H.; PIGGOTT, J. R. **Fermented Beverage Production**: 1ª ed. London: Blackie Academic & Professional, 1995, p. 361-385.

ISIQUE, W. D.; LIMA-NETO, B. S.; FRANCO, D. W. A qualidade da cachaça, uma opinião para discussão. **O Engarrafador Moderno**, p.32-36, julho. 2002.

LEHTONEN, M. & JOUNELA-ERIKSSON, P. Volatile and non-volatile compounds in the flavour of alcoholic beverages. In: PIGGOTT, J.R. **Flavour of distilled beverages**: Origin and Development. Flórida: Verlag Chemie International Inc., 1983. p. 64-78.

MAIA, A. B. R. Componentes voláteis da Aguardente. **STAB,** Piracicaba, v.12, n.6, p. 29-34, 1994.

MARCELLINI; P., S. **Análise Descritiva Quantitativa de aguardentes de cana (*Saccharum spp*) comerciais e destiladas em alambiques de cobre e aço-inoxidável**. 2000. 77p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2000.

MOSKOWITZ, H. R. **Product testing and snsory evaluation of foods: marketing and R & D approaches**. Westport, Food & Nutrition Press, 1983, 605 p.

MUÑOZ, A. M.; CIVILLE, G. V., CARR, B. T. **Sensory evaluation in quality control**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1992. 240p.

OLIVEIRA, E. S. **Características fermentativas, formação de compostos voláteis; e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas em destilarias artesanais.** 2001. 135p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2001.

ROESSLER, E. B.; ALDER, H. L. **Introduction to probabiity and statistics.** 5 ed. San Francisco: W. C. Freeman, 1972. p. 195-220.

SAS Institute **SAS User's Guide: statistics**. Cary, USA: SAS Inst., 1993.

STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation pratices**. 2.ed. San Diego: Academic Press Inc., 1993, 336p.

TEIXEIRA, E. **Apostila de análise físico-sensorial.** Florianópolis, 1995. 105p.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro e pela bolsa de doutoramento concedida ao primeiro autor.

ADIÇÃO DE NITROGÊNIO PROTÉICO NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE CALDO DE CANA PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA

Elisangela Marques Jeronimo[1]; Elson Luíz Rocha Souza[2]; Gil Eduardo Serra[3]

[1]Doutoranda do curso de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP; [2]Laboratório de Análise de Bebidas e Vinagres de Andradas, Ministério da Agricultura e do Abastecimento; [3]Professor Dr. da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

RESUMO

Para a produção de cachaça em processo artesanal não há estudos específicos sobre as caraterísticas fermentativas da levedura assim como sobre a qualidade da bebida, envolvendo a complementação nitrogenada e em específico a aplicação de N protéico. Os resultados obtidos de trabalhos anteriores, em escala de laboratório, indicaram que em destilarias artesanais de aguardente a complementação nitrogenada protéica do mosto pode constituir uma prática benéfica na multiplicação e no crescimento celular do fermento, e consequentemente para a melhoria dos índices de eficiência, rendimento e produtividade do processo. Neste trabalho, em escala piloto, a adição de nitrogênio protéico influiu positivamente na manutenção da viabilidade celular, podendo assim propiciar melhor qualidade do fermento reciclado. Também se observou redução no tempo de fermentação. A adição de nitrogênio protéico ao mosto para a produção de cachaça não interferiu na aceitação sensorial da bebida. A análise dos componentes secundários não mostrou alteração

consistente como resposta à aplicação de N protéico. A complementação do mosto de caldo de cana com N protéico em formas assimiláveis pela levedura, pode ser uma prática útil na otimização do processo de fermentação alcoólica para produção de cachaça.
Palavras-chave: fermentação alcoólica; cachaça; nitrogênio protéico; levedura; *Saccharomyces*; compostos voláteis; análise sensorial.

THE ADDITION OF PROTEIC NITROGEN ON FERMENTATION FOR THE PRODUCTION OF SUGARCANE LIQUOR

SUMMARY

For artisanal process of sugarcane liquor production there are no studies related about nitrogen addition nor beverage quality, involving nitrogen complementation and in specific N proteic addition. The results of previous studies in laboratory scale showed that sugarcane juice complementation with proteic nitrogen can constitute a benefical practice in yeast multiplication and cellular growth, and also for the improvement of fermentation yield and liquor productivity. In this study the proteic nitrogen influenced positively the cell viability, and can ensure yeast recycling operation. It was also observed a reduction in fermentation time. The proteic nitrogen addition in the juice didn't affect the sensory acceptance of sugarcane liquor, and also didn't result in different levels of volatile compounds. Assimilable forms of proteic nitrogen can be helpfull on the optimization of alcoholic fermentation.

Key words: ethanol fermentation; sugarcane liquor; proteic nitrogen; yeast; *Saccharomyces*, volatile compounds; sensory analysis.

1. INTRODUÇÃO

A produção de cachaça no Brasil está buscando uma imagem fortemente vinculada à qualidade da bebida e investindo no desenvolvimento de um mercado consumidor mais exigente, de modo a diversificar e desvincular-se parcialmente de sua linha tradicional de bebida popular.

Segundo Oliveira (2001) a adequação de procedimentos tecnológicos de processo é um passo preliminar importante para alterar a microbiota e a(s) levedura(s) com condições de dominância no processo de fermentação para produção de aguardente. As leveduras não são dominantes *per si*, mas em determinadas condições ou processos.

A produção de aguardentes em escala piloto foi estudada por Oliveira (2001), com diferentes linhagens de leveduras, e as aguardentes obtidas apresentaram variação nos teores de compostos secundários, que todavia não ocasionaram diferenças significativas em relação aos atributos sensoriais de aroma, sabor e impressão global.

A população responsável pela fermentação do caldo-de-cana é constituída normalmente por leveduras e bactérias (PATARO et al., 2002). Durante a multiplicação do fermento natural e no decorrer da fermentação, há uma sucessão de linhagens de leveduras, sendo a espécie predominante *Saccharomyces cerevisiae*. Ocorrem também leveduras apiculadas *Kloeckera japonica* e espécies de *Candida*, *Kluyveromyces* e *Pichia*, cuja presença já é detectada no caldo de cana extraído (MORAIS et al., 1997; PATARO et al., 1998; PATARO et.al., 2000).

O processo de fermentação mais utilizado por produtores de cachaça artesanal é o de batelada simples com reciclagem do inóculo sedimentado. O volume do inóculo sedimentado equivale normalmente a 20% do volume da dorna de fermentação. Segundo Schwan et al. (2001) este inóculo consiste de uma população mista de leveduras em torno de $3,6 \times 10^9$ UFC/mL, e de $3,6 \times 10^4$ UFC/mL de bactérias.

Nas destilarias artesanais de cachaça a qualidade do fermento reciclado é comprometida e a complementação nitrogenada do mosto pode constituir uma prática benéfica na multiplicação e no crescimento celular do fermento, e

consequentemente para a melhoria dos índices de eficiência, rendimento e produtividade do processo, conforme opina Ribeiro, Lopes e Ferrari (1987). Fontes nitrogenadas minerais, bastante empregadas, mostram resultados muitas vezes controversos (VASCONCELOS, 1987; RIBEIRO, LOPES E FERRARI, 1987; PINOTTI, 1991). Pulzatto (2000) verificou que a produção específica de células de levedura (Yx/s) aumentou linearmente com o aumento do nitrogênio protéico no meio de fermentação sintético, assim como foram positivamente influenciados o teor de etanol no vinho e o rendimento da fermentação.

O objetivo deste estudo foi avaliar a adição de nitrogênio protéico no caldo de cana sobre o crescimento da levedura, tempo e características da fermentação, e qualidade química e sensorial da cachaça. Outro aspecto foi avaliar o efeito da adição de N protéico em fermentações conduzidas com duas linhagens de levedura isoladas de destilarias de cachaça artesanal, e a condução de fermentações com reciclo da levedura decantada, em escala piloto simulando o processo artesanal de produção de cachaça.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizada cana-de-açúcar da variedade RB 72454 e a extração do caldo foi efetuada em moenda de um único terno, sendo coado em tela de aço inoxidável e pano de algodão, e diluído a 14 °Brix.

Como fonte de nitrogênio protéico utilizou-se o extrato de levedura Merk®. Para avaliar preliminarmente outras fontes de nitrogênio protéico, foi conduzido um experimento com isolado protéico de soja (Samprosoy 90 LH produzido pela Bunge Alimentos) e com um extrato protéico artesanal preparado em laboratório, a partir de grãos de soja (EPA).

Para a condução das fermentações em escala piloto foram utilizadas duas linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, UFMG-A905 e UFMG-A1676, provenientes da coleção da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, isoladas de alambique artesanal, e estudadas por Oliveira (2001).

Cada cepa foi mantida em "slants" em meio GYMP. Para o preparo do inóculo, a partir dos "slants" de manutenção, a cepa foi inoculada em meio de ativação (PDA – Potato Agar Dextrose), isto é, estriada em “slants” 24h antes da inoculação em meio para propagação. Após 24 horas o inóculo de cada “slant” foi assepticamente transferido para seis frascos de 250 mL contendo 100 mL de meio sintético estéril composto de: glicose 40g/L; fosfato diácido de potássio 5g/L; cloreto de amônio 5g/L; sulfato de magnésio heptahidratado 1,0g/L; cloreto de potássio 1,0g/L; extrato de levedura 9,0g/L, pH 6,0. Os frascos foram incubados à temperatura de 32ºC, a 150 rpm, por 10 horas. O conteúdo de cada frasco foi assepticamente transferido para seis frascos de 2 L contendo 1200 mL do mesmo meio de cultivo estéril; estes foram incubados nas mesmas condições anteriores. A massa celular foi separada por centrifugação, ressuspensa em água destilada, lavada duas vezes, e usada como inóculo, com assepsia adequada. Este procedimento completo foi repetido por 3 vezes para obtenção de massa celular suficiente.

A massa celular produzida em cultura pura (cerca de 800 mL de suspensão com 10^9 células/mL) era suficiente para inocular cerca de 15 L do mosto da primeira batelada e obter uma concentração de 10^8 células/mL, não somente para assegurar uma fermentação mais rápida como simular o que ocorre nas fermentações em unidades produtoras de aguardente.

As fermentações foram efetuadas em sistema de batelada simples, com reaproveitamento das células de levedura por sedimentação (reciclo do pé-de-cuba). Foram conduzidas em tanque cilíndrico de aço inoxidável encamisado (diâmetro 50 cm e altura 54 cm), com 40 L de mosto. A temperatura média de 37ºC do mosto, foi controlada através de um banho-maria dotado de bomba de circulação e conectado à camisa do tanque de fermentação. Para agitação do mosto foi utilizado um agitador mecânico, a 20 rpm. Foi estabelecida a realização de até 7 fermentações consecutivas (1 fermentação inicial inoculada com a suspensão de cultura pura de fermento e até 6 ciclos de reaproveitamento do pé-de-cuba).

Para a condução de cada batelada de fermentação o tanque era alimentado com cerca de 15 litros de mosto (cerca de 1/3 do volume total de mosto), que era inoculado com o fermento; na primeira batelada o fermento era proveniente de cultura pura. Nas demais bateladas o fermento provinha do reciclo das células da fermentação anterior. Quando o teor de açúcares do mosto era reduzido de 14ºBrix para cerca de 10 a 8ºBrix, pela atividade fermentativa, o volume de mosto era completado para 40 L. O mesmo procedimento foi adotado para as fermentações seguintes com reciclo do fermento. O final de cada fermentação foi determinado pela estabilização da leitura de ºBrix, isto é, com a leitura de dois valores iguais e consecutivos, em período de 1 hora entre as amostragens. Ao final das fermentações uma amostra do vinho foi coletada para a determinação do teor de etanol e viabilidade celular. A contaminação bacteriana foi monitorada apenas para fins de controle de processo (SILVA, 1995) . Em seguida, o vinho foi deixado em repouso por duas a três horas, para decantar a maior parte das células de levedura. Um volume de 35 L do sobrenadante foi retirado do tanque de fermentação, dos quais 30 L foram conduzidos para destilação. As destilações foram realizadas com os vinhos obtidos nas fermentações 1, 3, 5 e 7.

Aos 5 litros de fermento decantado restante na dorna era adicionado cerca de 3 L de água potável para diluir o vinho, e propiciar melhor decantação. Após, era separado o sobrenadante e recolhido o pé-de-cuba para dar seqüência a uma próxima batelada, com o reciclo do fermento. Este fermento decantado era tratado com ácido sulfúrico 50%, com redução do pH para 2,0 - 2,5, com um tempo de residência de 1 hora e meia, com o objetivo de controlar possível contaminação bacteriana presente. Quando não era possível iniciar uma nova batelada no mesmo dia, o pé-de-cuba recolhido era guardado em geladeira, sem o tratamento ácido, até o dia seguinte.

A destilação do caldo fermentado foi realizada em um alambique de cobre de capacidade útil de 30 litros, com condensador/resfriador. O aquecimento foi conduzido com bicos a gás, e a temperatura do vinho foi controlada entre cerca de 91-97ºC, para manter a vazão do destilado em torno de 1 litro/hora.

A aguardente destilada foi coletada em recipientes de vidro de 700 mL. A seguir as frações nos recipientes foram sendo misturadas, na ordem de sua obtenção, até atingir a concentração média de 43,5 ºGL que foi estabelecida como padrão. A incorporação da fração cabeça teve como critério o fato de que as aguardentes representadas apenas pela fração coração tornar-se-iam mais similares em sua composição, podendo mascarar diferenças entre os tratamentos.

As aguardentes foram produzidas em dois ensaios, descritos a seguir e constaram de uma fermentação em batelada inoculada com cultura pura e até mais seis fermentações com fermento reciclado:

A) Ensaios com aplicação de nitrogênio protéico na forma de extrato de levedura (5g de extrato/L, que representam 3,28g de proteína/L), com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* linhagens UFMG-A905 e UFMG-A1676. Os tratamentos para cada levedura foram: SE - sem adição de extrato de levedura; CE - com adição de extrato de levedura;

B) Ensaios com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem UFMG-A905 e aplicação de nitrogênio protéico nas formas de isolado protéico de soja Samprosoy® LH 90, (3,6g de Samprosoy/L, que representam 3,31g de proteína/L), e outro ensaio com adição de extrato protéico artesanal (EPA) obtido em laboratório, (CAMARA, 1982;TANABE & ROSA, 1982; ASAKURA et al., 1983), a partir de grãos de soja (50g/L de EPA, que representam 2,05g de proteína/L).

No experimento com EPA a complementação com N protéico foi reduzida de 40 ppm para 25%, em média, em relação ao N total do mosto. Esta redução na complementação teve o objetivo de adequar a proteína consumida em cerca de 90% daquela presente no mosto complementado, uma vez que este foi aproximadamente o consumo máximo na fermentação inicial e primeiros reciclos, em alguns experimentos anteriores.

A contagem de células e sua viabilidade celular foram determinadas em câmara de Neubauer com corante eritrosina, segundo Bonneu et al. (1991). O nitrogênio total no mosto e no vinho foi determinado pelo método de Kjeldahl, conforme descrito em Caldas (1998). A acidez total foi determinada por

titulometria, com NaOH 0,025N, segundo ABNT (1997) e o pH foi lido em aparelho digital. Amostras do vinho foram destiladas em microdestilador de álcool para as determinações de etanol, pelo método espectrofotométrico do dicromato de potássio modificado (SALIK & POVOH, 1993). A determinação de açúcares redutores totais no mosto foi realizada pelo método de Lane & Eynon (AMORIM, 1996), e no vinho pelo método de Somogy & Nelson (AMORIM, 1996).

Nas cachaças obtidas foram determinados o teor de etanol, compostos voláteis e acidez. A determinação do grau alcoólico foi realizada em densímetro Anton Paar. As determinações de aldeídos, ésteres, propanol, isobutanol e álcool isoamílico, foram realizadas em cromatógrafo a gás.

Oito cachaças, dentre um total de 14 produzidas, foram submetidas à análise de aceitação através de testes sensoriais, utilizando-se escala hedônica estruturada de nove pontos (STONE & SIDEL, 1993). Optou-se pela análise das cachaças obtidas da primeira e quinta fermentação (4º reciclo).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho em escala piloto foi delineado para condução de fermentações em batelada e com reciclo do fermento, visando avaliar a manutenção da viabilidade da levedura, simulando a prática nas unidades artesanais produtoras de aguardente.

Na presença de extrato de levedura a viabilidade da linhagem UFMG-A905 é maior do que na sua ausência (Tabela 1), sendo que mesmo na ausência de complementação de N protéico a multiplicação deficiente originou massa celular insuficiente já para o primeiro reciclo. No tratamento com a complementação a viabilidade manteve-se elevada até o final do experimento (6 reciclos), e a massa celular produzida também. Os tempos de fermentação foram notavelmente reduzidos nos tratamentos com maior quantidade de células totais de levedura que por sua vez são função da complementação com fontes de nitrogênio protéico (Tabela 1 e Figura 1). Estes resultados positivos estão de acordo com os

resultados verificados por Pulzatto (2000). Jeronimo (2004) constatou que adição de nitrogênio protéico influiu positivamente na manutenção da viabilidade celular, podendo assim propiciar melhor qualidade do fermento reciclado.

A levedura UFMG-A1676 mostrou-se flotante, com intensa flotação a partir da terceira fermentação. A massa de células flotadas, certamente com atividade fermentativa reduzida, mostrava uma parte imersa e outra elevando-se sobre a superfície do vinho, como uma crosta. Como essa massa se formava e se mantinha mesmo sob a agitação da dorna, e também não se desfazia por meios próprios, o procedimento adotado foi de desprezá-la na recuperação do fermento. Parte das células também formavam grumos que se aderiam firmemente à superfície interna da dorna, não sendo recuperadas com o vinho. A contagem e observação microscópica mostra a tendência das células permanecerem unidas em grupos de 4 a 6 assim como um colar. Todavia, o que se observa é que mesmo com a perda de grande massa celular e com redução da quantidade de fermento, a adição de extrato manteve a viabilidade e permitiu a continuidade até o 6^{0} reciclo, como planejado (Tabela 1). Nessas condições, o tempo de fermentação elevou-se.

Na Tabela 1 verifica-se que para a linhagem UFMG-A905 a concentração de células no inóculo manteve-se ao redor de 10^9 células/mL, porém considerando que o volume de inóculo decantado foi variável, a quantidade de células totais reduziu-se de valores próximos a 10^{12} para 10^{11} na ausência de adição de extrato de levedura. Nas fermentações com a levedura UFMG-A1676 flotada nos últimos reciclos, observou-se nestes também uma redução das células totais de levedura.

Os resultados indicam que para a linhagem de levedura flotante deve ser atribuída maior atenção ao seu comportamento na fermentação, contrapondo-se à possível vantagem de decantar rapidamente.

Na ausência de extrato de levedura a massa de fermento foi bastante reduzida e o tempo de fermentação ultrapassou 70 horas já no primeiro reciclo, tanto para a levedura UFMG-A905, como para a UFMG-A1676 (Tabela 1). Este resultado inviabilizou a continuidade dos reciclos e do próprio experimento, na ausência de complementação com N protéico.

O teste com o uso de Samprosoy® (Tabela 2) mostrou que este pode ser uma alternativa para o extrato de levedura, uma vez que tem um custo cerca de 20 vezes menor por unidade de peso de N protéico. A adição de Samprosoy®, que é um isolado protéico de soja, mostrou também uma boa multiplicação e viabilidade da levedura. Todavia, o tempo de fermentação praticamente dobrou em relação ao extrato de levedura.

O extrato protéico artesanal de soja (EPA) foi preparado com o objetivo de ser uma outra alternativa de menor custo. O seu uso também mostrou efeito similar (Tabela 3) ao Samprosoy®.

O teor de etanol no vinho variou entre um mínimo de 3,40 e máximo de 7,68%, sempre mais elevado nos tratamentos com adição de extrato de levedura (Tabela 4). Com adição de extrato de levedura a variação limitou-se à faixa de 5,90 a 7,68, excluindo as fermentações da UFMG-A1676 onde ocorreu flotação intensa. Os teores de etanol no vinho também foram mais elevados nos tratamentos com adição de Samprosoy® e EPA. Com Samprosoy® variaram de 6,00 a 7,80% e com EPA entre 7,06 a 7,50% (Tabelas 5 e 6). Os teores de ART no mosto foram mantidos em torno de 14% em todas as fermentações, o que foi planejado para obter uma melhor padronização nos experimentos em relação às condições de fermentação.

O rendimento da fermentação, isto é, a quantidade de açúcar do mosto transformada em etanol, situou-se entre 38 a 92%, aproximadamente (Tabelas 4, 5 e 6). Com a adição de N protéico (extrato de levedura, Samprosoy® e EPA) os rendimentos variaram entre 65 a 92% aproximadamente, excluindo as fermentações com flotação intensa de UFMG-A1676. Novaes (1995) relata que o rendimento da produção de álcool na maioria das destilarias de aguardente varia de 60 a 75% em relação aos açúcares presentes no mosto.

As Tabelas 4 e 5 também apresentam o volume total das aguardentes, obtidas com a destilação de 30 litros de vinho das fermentações 1, 3, 5 e 7. Os vinhos obtidos com as fermentações do tratamento com extrato protéico artesanal de soja (EPA) não foram destilados para a obtenção de aguardente. Com a linhagem UFMG-A905, em geral, os maiores volumes foram obtidos com a

fermentações realizadas com a adição de N protéico, tanto na forma de extrato de levedura quanto de Samprosoy®. Para a UFMG-A1676 a floculação intensa interferiu no rendimento da fermentação e consequentemente na produção da aguardente.

Segundo Pulzatto (2000) a presença de N protéico em quantidades adequadas é um fator de extrema importância para a multiplicação celular da levedura; durante a fase de crescimento da levedura, o nitrogênio é assimilado, dando suporte a altas taxas de crescimento e estimulando a atividade fermentativa.

No mosto o teor de N protéico original da cana variou entre 55 a 67% do N protéico total no mosto complementado, lembrando que essa variação é devida ao uso de cana coletada em diferentes períodos para a condução dos ensaios. O teor de N protéico monitorado nos mostos preparados ainda sem adição de N protéico, variou entre 406 a 685 mg/L. A quantidade adicionada foi de 328 mg/L de N protéico, na forma de extrato de levedura, de 331 mg/L de Samprosoy® e de 205 mg/L de EPA. As Tabelas 7, 8, e 9 apresentam o teor de proteína nos mostos a serem fermentados, nos vinhos e a percentagem de proteína consumida.

Na complementação com extrato de levedura o consumo médio foi 74% do N disponível. Com adição de Samprosoy® e de EPA o consumo médio foi de cerca de 84 e 89%, respectivamente. O que se observou é o N protéico original no caldo de cana é praticamente totalmente consumido, o que significa que está em forma assimilável pela levedura. Do ponto de vista nutricional da levedura, os resultados mostram que o N protéico presente no caldo é insuficiente para suprir a nutrição da levedura em fermentação. Assim, ajustes nos níveis dos nutrientes disponíveis para a levedura, de modo a equilibrar seus efeitos benéficos sobre a viabilidade celular e o metabolismo fermentativo com níveis adequados de compostos secundários da fermentação são necessários (VASCONCELOS, 1987; RIBEIRO et al., 1987; ABRAMOV et al., 1994; DOMÍNGUEZ et al., 1997;).

O consumo mais elevado de N protéico nas primeiras fermentações, de experimentos com adição de extrato de levedura e de Samprosoy®, indicam que a levedura após consumir maior quantidade de N protéico, atinge um estado

nutricional adequado e reduzindo a sua demanda por N protéico nas fermentações subsequentes.

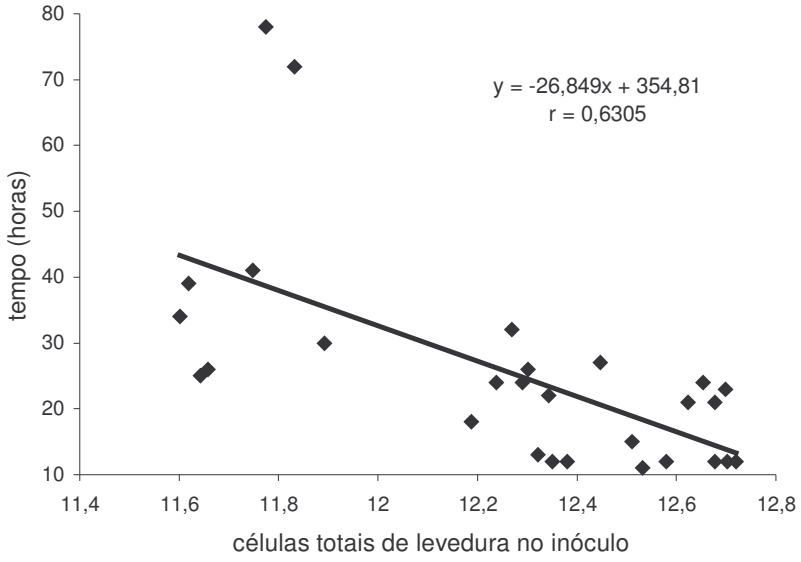


FIGURA 1 - Dispersão dos resultados de quantidade de células totais de levedura (vivas e mortas) no inóculo e o tempo de fermentação em caldo de cana, englobando todos os resultados obtidos nos experimentos sem adição de extrato, com extrato de levedura, Samprosoy® e Extrato Protéico Artesanal de Soja (EPA).

TABELA 1 - Resultados microbiológicos da levedura nos inóculos e tempo de fermentação, com e sem a adição de N protéico na forma de extrato de levedura .

		nº cel/mL log	viabilidade (%)	nº cel total log	tempo (horas)
Fermentação*	Levedura	SEM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA			
1	905	9,6990	83,0	12,6990	23
2**		9,3424	85,0	11,7738	78
1	1676	9,6021	95,0	12,4472	27
2**		9,2304	92,5	11,8325	72
		COM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA			
1	905	9,8157	84,0	12,7202	12
2		9,4771	90,0	12,3802	12
3		9,4472	95,5	12,3502	12
4		9,5563	98,4	12,7024	12
5		9,4472	97,0	12,6776	12
6		9,3010	99,7	12,5315	11
7		9,4771	98,2	12,6232	21
1	1676	9,5563	93,0	12,5105	15
2		9,2788	93,0	12,5798	12
3		9,1461	90,0	12,3222	13
4***		9,1139	87,0	11,8921	30
5		9,3010	93,0	11,7482	41
6		9,0414	83,0	11,6435	25
7		9,1139	93,3	11,6580	26

*fermentação 1 (inicial): inóculo preparado em laboratório; fermentação 2 a 7: inóculo obtido do reaproveitamento das células da fermentação anterior.
** fermento em condições não adequadas para proceder a continuidade dos reciclos.
*** flotação intensa da levedura.

TABELA 2 - Resultados microbiológicos da levedura nos inóculos e tempo de fermentação, com a adição de N protéico na forma de isolado protéico de soja (Samprosoy®).

		nº cel/mL log	viabilidade (%)	nº cel total log	tempo (horas)
Fermentação*	Levedura		COM ADIÇÃO DE SAMPROSOY®		
1	905	9,3424	92,8	12,1875	18
2		8,7160	94,6	11,6191	39
3		8,6021	95,5	11,6021	34
4		8,8977	93,7	12,2380	24
5		9,0414	96,0	12,3424	22
6		8,8129	95,0	12,2900	24
7		9,1761	90,6	12,6532	24

*fermentação 1 (inicial): inóculo preparado em laboratório; fermentação 2 a 7: inóculo obtido do reaproveitamento das células da fermentação anterior.

TABELA 3 - Resultados microbiológicos da levedura nos inóculos e tempo de fermentação, com a adição de N protéico na forma de Extrato Protéico Artesanal de Soja (EPA).

		nº cel/mL log	viabilidade (%)	nº cel total log	tempo (horas)
Fermentação*	Levedura		COM ADIÇÃO DE EPA		
1	905	9,8325	87,0	12,6776	21
2		9,0000	98,0	12,3010	26
3**		8,9685	93,4	12,2695	32

*fermentação 1 (inicial): inóculo preparado em laboratório; fermentação 2 a 3: inóculo obtido do reaproveitamento das células da fermentação anterior.
** experimento conduzido até a 3ª fermentação, conforme planejado.

TABELA 4 - Resultados da fermentação em etanol no vinho e rendimento, com e sem a adição de N protéico na forma de extrato de levedura.

		etanol no vinho (v/v)	rendimento (%)	cachaça**** (mL)
Fermentação*	Levedura	SEM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA		
1	905	5,98	67,81	2.795
2**		3,40	37,86	
1	1676	6,91	78,48	3.730
2**		4,57	50,50	
		COM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA		
1	905	6,53	69,58	3.064
2		6,56	65,35	
3		6,83	76,23	3.715
4		7,68	91,66	
5		7,00	78,14	3.960
6		5,90	65,86	
7		6,86	77,69	3.770
1	1676	6,81	76,20	3.630
2		6,92	81,22	
3		6,50	71,41	3.410
4***		4,74	53,22	
5		5,30	59,03	2.010
6		4,94	58,71	
7		4,60	54,60	1.466

*fermentação 1 (inicial): inóculo preparado em laboratório; fermentação 2 a 7: inóculo obtido do reaproveitamento das células da fermentação anterior.

** fermento em condições não adequadas para proceder continuidade dos reciclos.

*** flotação intensa da levedura.

****resultado referente a cachaça com 40% de álcool (v/v).

TABELA 5 - Resultados da fermentação em etanol no vinho e rendimento, com a adição de N protéico na forma de isolado protéico de soja (Samprosoy®).

		etanol no vinho (v/v)	rendimento (%)	aguardente** (mL)
Fermentação*	Levedura	COM ADIÇÃO DE SAMPROSOY®		
1	905	7,19	83,92	3.205
2		6,00	69,85	
3		6,03	75,90	2.151
4		6,33	75,43	
5		7,65	85,05	3.790
6		7,80	88,79	
7		7,60	87,48	4.123

*fermentação 1 (inicial): inóculo preparado em laboratório; fermentação 2 a 7: inóculo obtido do reaproveitamento das células da fermentação anterior.
** resultado referente a aguardente com 40% de álcool (v/v).

TABELA 6 - Resultados da fermentação em etanol no vinho e rendimento, com a adição de Extrato Protéico Artesanal de Soja (EPA).

		etanol no vinho (v/v)	rendimento (%)
Fermentação*	Levedura	COM ADIÇÃO DE EPA	
1	905	7,16	84,00
2		7,50	87,56
3		7,30	81,17

*fermentação 1 (inicial): inóculo preparado em laboratório; fermentação 2 a 3: inóculo obtido do reaproveitamento das células da fermentação anterior.

TABELA 7 - Resultados para proteína no mosto, vinho e consumida, com e sem a adição de N protéico na forma de extrato de levedura.

		proteína		
Fermentação*	Levedura	SEM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA		
		mosto (mg/L)	Vinho (mg/L)	Proteína Consumida (%)
1	905	533	41	92,3
2**		558	50	91,0
1	1676	659	20	97,0
2**		533	18	96,6
		COM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA		
1	905	911	106	88,4
2		1013	259	74,4
3		810	327	59,6
4		784	206	73,7
5		810	245	69,8
6		987	304	69,2
7		784	248	68,4
1	1676	734	141	80,8
2		962	127	86,8
3		784	180	77,0
4***		861	192	77,7
5		886	195	78,0
6		734	195	73,4
7		810	253	68,8

*fermentação 1 (inicial): inóculo preparado em laboratório; fermentação 2 a 7: inóculo obtido do reaproveitamento das células da fermentação anterior.

** fermento em condições não adequadas para proceder continuidade dos reciclos.

*** flotação intensa da levedura

TABELA 8 - Resultados para proteína no mosto, vinho e consumida, com a adição de N protéico na forma de isolado protéico de soja (Samprosoy).

		proteína		
Fermentação*	Levedura	COM ADIÇÃO DE SAMPROSOY®		
		mosto (mg/L)	Vinho (mg/L)	Proteína Consumida (%)
1	905	813	53	93,5
2		864	50	94,2
3		813	100	87,7
4		990	206	79,2
5		737	130	82,4
6		813	136	83,3
7		889	265	70,2

*fermentação 1 (inicial): inóculo preparado em laboratório; fermentação 2 a 7: inóculo obtido do reaproveitamento das células da fermentação anterior.

TABELA 9 - Resultados dos tratamentos para proteína com a adição de N protéico na forma de Extrato Protéico de Soja Artesanal (EPA).

		proteína		
Fermentação*	Levedura	COM ADIÇÃO DE EPA		
		mosto (mg/L)	Vinho (mg/L)	Proteína Consumida (%)
1	905	839	88	89,5
2		611	68	88,9
3		763	74	90,3

*fermentação 1 (inicial): inóculo preparado em laboratório; fermentação 2 a 3: inóculo obtido do reaproveitamento das células da fermentação anterior.

O grau alcoólico (% em volume) das cachaças destiladas em alambique de cobre foi mantido entre 43,0 a 44,20, excetuando-se a aguardente CE/1676, com 39,1. Assim, todas as cachaças apresentaram teor alcoólico dentro dos limites exigidos pela legislação (Tabelas 10 e 11).

A acidez volátil foi o atributo que apresentou a maior amplitude de variação, de cerca de 7 a 365 mg/L em ácido acético. As cachaças que mostraram elevada acidez também apresentaram elevação no teor de acetato de etila e redução no de propanol. Para a levedura UFMG-A905 a adição de extrato de levedura, as aguardentes produzidas mostraram teores de compostos voláteis individuais dentro do padrão de identidade da bebida (Tabela 10), sem alterações evidentes em relação ao tratamento sem adição. A última fermentação apresentou uma aguardente com um teor de acidez cerca de 5 a 7 vezes maior que as demais, acetato de etila cerca de 5 a 6 vezes maior e propanol cerca de 2 vezes menor. Embora as diferenças sejam bastante notáveis, o modelo estudado não permite comprovar que este efeito está associado ao uso de extrato de levedura. Dentro desta análise, pode-se verificar (Tabela 10) que o uso de Samprosoy® não causou elevação da acidez nem alteração nos teores de acetato de etila e propanol. Para a levedura UFMG-A1676 a adição de extrato de levedura está associada (Tabela 11) a uma elevação da acidez e acetato de etila, e redução do propanol. Todavia, esta levedura mostrou-se flotante conforme já comentado, podendo esta característica estar também associada às alterações nos compostos voláteis. A acidez de uma cachaça é de grande importância, constituindo um fator de qualidade, uma vez que durante sua produção os ácidos reagem com os álcoois presentes, aumentando a formação dos ésteres, que são um dos constituintes responsáveis pelo aroma. O excesso de acidez promove sabor indesejado e ligeiramente “agressivo” em aguardente de cana, depreciando a qualidade da bebida (CHERUBIN, 1998). Valores elevados de acidez volátil e

consequentemente de não álcoois são atribuídos à destilação com maior extração de compostos de cauda.

As alterações na acidez, acetato de etila e propanol causam variações significativas nas relações Álcoois Superiores/Não Álcoois e Propanol/Isobutanol, que são relações descritas por diversos autores como relacionadas à qualidade da bebida (SINGER, 1966)

Os teores de acetato de etila ficaram entre 10,46 e 134,01 mg/100mL de álcool anidro. Oliveira (2001) encontrou níveis de produção deste composto considerados mais baixos (cerca de 9,00 a 36,00 mg/100 mL de álcool anidro), em aguardentes produzidas com diferentes cepas de levedura, em batelada única. O acetato de etila é o mais abundante éster das bebidas alcoólicas; os ésteres apresentam odor agradável de frutas e são considerados compostos importantes de aroma nas bebidas alcoólicas (LEHTONEM & JOUNELA-ERIKSON, 1983). Em quantidades excessivas, conferem aroma indesejável e enjoativo (MAIA, 1994).

Os teores dos álcoois superiores, propanol, isobutanol e álcool isoamílico formam quantitativamente o maior grupo de compostos responsáveis pelo aroma e sabor das bebidas alcoólicas. Sabe-se que estes compostos fazem parte dos principais álcoois superiores produzidos pelas leveduras e são formados a partir de carboidratos e de aminoácidos, respectivamente na rota de biossíntese de aminoácidos e na de catabolismo dos mesmos (NIKANEM & SOUMALAINEM, 1983; PIGOTT et al., 1989). Verifica-se que os teores de propanol são mais elevados nos tratamentos com adição de N orgânico, principalmente para as cachaças produzidas com a linhagem UFMG-A905 (Tabelas 10 e 11). Teores elevados de propanol são relatados como correlacionados com aguardentes de qualidade inferior (ALMEIDA & BARRETO, 1971), o que é contraposto por resultados que mostram uma correlação positiva para sabor e impressão global de cachaças artesanais (OLIVEIRA, 2001; SILVA, 2003)

Embora algumas alterações expressivas no teor de compostos voláteis estejam presentes em tratamentos com adição de N protéico, não se pode atribuir uma relação de causa e efeito entre estas variáveis.

Para a aceitação sensorial foram pré-selecionadas as cachaças da primeira e quinta fermentação (4º reciclo), dos ensaios com extrato de levedura e com Samprosoy®. A análise sensorial das cachaças produzidas com a levedura UFMG-A905, para todos os atributos, mostra que a aguardente obtida na 5ª fermentação (4º reciclo) não diferiu da primeira que foi inoculada com a levedura de cultura pura. Para a levedura UFMG-A1676 a aguardente proveniente do 5º reciclo obteve avaliação estatisticamente inferior àquela da primeira fermentação e também em relação às cachaças produzidas com a levedura UFMG-A905 (Tabela 12).

A levedura UFMG-A1676 que já havia mostrado resultados pouco favoráveis de suas características fermentativas, mostra também na análise sensorial resultados igualmente desfavoráveis. Esses resultados podem ser atribuídos à sua condição de levedura flotante, que é um atributo diferenciador da UFMG-A905. Assim, leveduras flotantes para aplicação principalmente em bebidas alcoólicas devem ser devidamente avaliadas.

A cachaça do 5º reciclo com adição de extrato de levedura produzida com a UFMG-A1676, apresentou uma acidez e teor de acetato de etila bastante elevados (Tabela 11), bem como teores reduzidos de álcool. A acidez elevada desta cachaça certamente é a característica que se relacionou com a baixa aceitação.

TABELA 10 - Teor alcoólico (%v/v) e compostos voláteis (mg/100mL álcool anidro) nas cachaças obtidas em fermentação em batelada com reciclo de células, com e sem a adição de extrato de levedura e com a adição de Samprosoy®; levedura UFMG-A905.

Fermentação	Levedura	ºGL[1]	AcVol[2]	Actald[3]	AcEtil[4]	Prop[5]	Isob[6]	Isoam[7]
			SEM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA					
1	905	43,50	27,60	23,40	14,33	35,36	91,78	253,54
			COM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA					
1	905	43,00	31,46	23,24	11,27	46,22	60,99	201,62
3		43,70	32,67	16,87	12,40	41,03	45,49	159,29
5		44,00	44,41	4,74	10,46	44,65	61,34	196,14
7		43,00	213,22	8,52	61,06	25,81	55,99	140,72
			COM ADIÇÃO DE SAMPROSOY®					
1	905	44,20	13,6	23,48	22,44	51,92	65,70	214,73
3		43,90	13,7	12,76	19,91	51,84	113,87	128,22
5		43,30	6,94	12,84	17,18	64,62	63,75	124,04
7		43,40	17,32	19,46	21,56	73,65	47,52	93,55

[1]Grau alcoólico (%v/v); [2]Acidez volátil em ácido acético; [3]Acetaldeído; [4]Acetato de Etila; [5]Propanol; [6]Isobutanol; [7]Álcool Isoamílico.

TABELA 11 - Teor alcoólico (%v/v) e compostos voláteis (mg/100mL álcool anidro) nas cachaças obtidas em fermentação em batelada com reciclo de células, com e sem a adição de extrato de levedura e com a adição de Samprosoy®; levedura UFMG-A1676.

Fermentação	Levedura	ºGL[1]	AcVol[2]	Actald[3]	AcEtil[4]	Prop[5]	Isob[6]	Isoam[7]
			SEM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA					
1	1676	44,10	34,49	50,19	31,87	28,47	140,31	432,98
			COM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA					

1	1676	44,00	34,16	13,28	26,18	54,32	67,24	250,53
3		44,00	211,79	10,76	67,55	24,25	71,63	189,34
5		43,70	364,58	13,69	134,01	15,56	66,00	174,95
7		39,10	361,34	20,81	56,53	19,95	76,44	224,41

[1]Grau alcoólico (%v/v); [2]Acidez volátil em ácido acético; [3]Acetaldeído; [4]Acetato de Etila; [5]Propanol; [6]Isobutanol; [7]Álcool Isoamílico.

TABELA 12 - Médias das notas[1] atribuídas pelos provadores para aroma, sabor e impressão global das amostras de cachaças produzidas em escala piloto.

Fermentação	Levedura	Aroma[2]	Sabor[3]	Impressão Global[2]
		SEM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA		
1	905	6,07 ab	5,72 a	5,74 ab
		COM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA		
1	905	6,59 a	5,52 ab	5,83 a
5		6,07 ab	5,41 ab	5,61 ab
		COM ADIÇÃO DE SAMPROSOY®		
1	905	5,87 b	5,69 a	5,85 a
5		6,22 ab	5,46 ab	5,41 ab
		SEM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA		
1	1676	5,85 b	5,15 ab	5,44 ab
		COM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA		
1	1676	5,80 b	5,33 ab	5,46 ab
5		5,15 c	5,02 b	5,17 b

[1]escala hedônica estruturada de 1 a 9; [2]Teste de Duncan: 10% ; [3]Teste de Duncan: 15%.

4. CONCLUSÕES

A adição de nitrogênio protéico ao mosto influiu positivamente na manutenção da viabilidade celular, podendo assim propiciar melhor qualidade do fermento reciclado. Também se observou redução no tempo de fermentação.

Todas as cachaças avaliadas sensorialmente foram aceitas.

A adição de N protéico ao mosto para a produção de cachaça não permite atribuir influência negativa nos teores de compostos voláteis formados e aceitação sensorial das cachaças.

A complementação do mosto de caldo de cana com N protéico com formas assimiláveis pela levedura, pode ser uma prática útil na otimização do processo de fermentação alcoólica para produção de cachaça.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOV, S. A; ÉFENDIEVA, D. A; KOTENTO, S. T. Effect of the growth medium on the protein content of the yeast Saccharomyces cerevisiae. **Applied Biochemistry and Microbiology,** v.30, n.2, p.225-227, 1994.

ALMEIDA, M. E. W., BARRETO, H. H. C. Álcoois superiores em aguardente de cana por cromatografia gasosa. **Revista do Instituto Adolfo Lutz,** São Paulo, v.31, p.117-123, 1971.

AMORIM, H. V. **Processos de produção de álcool.** Piracicaba: ESALQ/USP, 1996.

ASAKURA, Y.; COLOMBO, A. J.; CUNHA, B. C. A. Hidrólise de proteínas e carne bovina pela ação da papaína, bromelina e ficina. **Revista de Farmácia e Bioquímica da USP,** São Paulo, v.19, n. 1, p.1-67, jan./jun,1983.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS **NBR 13856** Acidez titulável total, volátil total e fixa. São Paulo, 1997.

BONNEU, M.; CROUZET, M.; URDACI, M.; AIGLE, M. Direct selection of yeast mutants with reduced viability on plates by erythrosine B. stainining. **Analytical Biochemistry,** v.193, p.225-230, 1991.

CALDAS, C. **Manual de análises selecionadas para indústrias sucroalcooleiras**. Sindicato da Indústria do Açúcar e do Álcool no Estado de Alagoas. Maceió. 1998. 423p.

CAMARA, G. M. S. Soja: produção, pré-processamento e transformação agroindustrial. **Série Extensão Agroindustrial 7**, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1982, 99p.

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da adição de benzoato de sódio na fermentação alcoólica para produção de aguardente de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp).** 1998. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba,1998.

DOMÍNGUEZ, V. E. L.; NELSON, D. L.; MAIA, A. B. R.; Influência do fubá e do farelo de arroz sobre a formação de produtos secundários da fermentação alcoólica. **STAB**, Piracicaba, v.15, n.4, p. 28-31, 1997.

JERONIMO, E. M. **O nitrogênio protéico na fermentação alcoólica e sua influência na qualidade da cachaça.** Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2004.

LEHTONEN, M. & JOUNELA-ERIKSSON, P. Volatile and non-volatile compounds in the flavour of alcoholic beverages. In: PIGGOTT, J.R. **Flavour of distilled beverages**: Origin and Development. Flórida: Verlag Chemie International Inc., 1983. p. 64-78.

MAIA, A. B. R. Componentes voláteis da Aguardente. **STAB,** Piracicaba, v.12, n.6, p. 29-34, 1994.

MORAIS, P. B.; ROSA, C. A., LINARDI, V. R.; PATARO, C.; MAIA, A. B. R. A. Short communication: characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of brazilian sugar-cane aguardente. **World Journal of Microbiology & Biotechnology,** v.13, p.241-243, 1997.

NOVAES, F. V. **Produção e qualidade da aguardente de cana**. Apostila. Piracicaba: ESALQ, 1995. 27p.

NYKÄNEN, L.; SUOMAILAINEN, H. Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages. **Acad. Verl**., 413 p., 1983.

OLIVEIRA, E. S. **Características fermentativas, formação de compostos voláteis; e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas em destilarias artesanais.** 2001. 135p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2001.

PATARO, C.; SANTOS, A.; CORREIA, S. R.; MORAIS, P. B.; LINARDI, V. R.; ROSA, C. A. Physiological caracterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in an aguardente distillery. **Revista de microbiologia**, São Paulo, n. 29, p.69-73, 1998.

PATARO, C.; GUERRA, J. B.; PETRILLO-PEIXOTO, M. L.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; LINARDI, V. R.; ROSA, C. A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.24-31, 2000.

PATARO, C.; GOMES, F. C. O.; ARAÚJO, R. A.C.; ROSA, C. A.; SCHWAN, R. F.; CAMPOS, C. R.; CLARET, A. S.; CASTRO, H. A. de. Utilização de leveduras selecionadas na fabricação de cachaça de alambique. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.23, n.217, p.37-43, 2002.

PIGGOTT, J. R. **Distilled beverage flavour: recent developments** Chinchester: E. Horwood, 1989 352p.

PINOTTI, R. F. Quantificação do nível de nitrogênio nas etapas do processo de produção de álcool. **STAB**, v.10, n.1, p.34-35, 1991.

PULZATTO, M. E. **Fatores que Influem na Obtenção de Biomassa de Levedura Seca (*Saccharomyces cerevisiae*) da Fermentação alcoólica.** 2000. 112p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campins, 2000.

RIBEIRO, F. J.; LOPES, J. J.; FERRARI, S. E. Complementação de nitrogênio de forma contínua no processo de fermentação alcoólica. **Brasil Açucareiro**, v.1, n.105, p.26-30, 1987.

SALIK, F. L. M.; POVH, N. P. Método espectrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas. In: CONCRESSO NACIONAL DA STAB, 5, 1993, Águas de São Pedro. **Anais**. Piracicaba: STAB, 1993. p.262-266.

SCHWAN, R. F.; CASTRO, H. A. Fermentação alcoólica. In: CARDOSO, M. das G. (Ed.). **Produção de Aguardente de cana-de-açúcar.** Lavras: UFLA, 2001. p. 45-47.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A. **Métodos de análise microbiológica de alimentos**, Campinas, 1995. cap.2, p.21-29.

SILVA, C. L. C. **Seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* floculantes e linhagens não produtoras de H_2S e sua influência na qualidade da cachaça.** 2003. 99p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, 2003.

SINGER, D. D. The analysis and composition of potable spirits: Determination of C_3, C_4 and C_5 alcohols in whisky and brandy by direct gas chromatography. **Analyst**, London, v.91, p.127-134, 1966.

STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation pratices**. 2.ed. San Diego: Academic Press Inc., 1993, 336 p.

TANABE, I. H.; ROSA, J. **Soja na indústria caseira.** Lavras: Esal, 1982, 103p.

VASCONCELOS, J. N. Influência da complementação de nutrientes nitrogenados e fosfatados sobre o processo de fermentação alcoólica industrial. **Brasil Açucareiro**, v.4, 5 e 6, n.105, p.41-48, 1987.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado e auxílio financeiro. Ao Prof. Dr. Carlos A. Rosa, da Universidade Federal de Minas Gerais, por ceder as linhagens de levedura para execução do trabalho.

3. CONCLUSÕES GERAIS

No estudo em escala laboratorial:

- A clarificação do caldo comprometeu a multiplicação celular, sem afetar a viabilidade. O uso de caldo não clarificado surge como mais indicado.
- A adição de nitrogênio protéico influiu positivamente na manutenção da viabilidade celular, podendo assim propiciar melhor qualidade do fermento reciclado.
- A adição de N protéico alterou a formação de álcoois superiores, aumentando a formação de propanol e reduzindo a de isobutílico e isoamílico.
- A complementação do mosto de caldo de cana com N protéico que contenha formas assimiláveis é recomendada.

No estudo sensorial:

No estudo em escala piloto:

- A concentração alcoólica e a acidez não influenciaram a detecção de igualdades ou diferenças na avaliação sensorial da aguardente.
- A diluição da aguardente não contribui para a percepção de outros atributos possíveis na aguardente.

- A adição de nitrogênio protéico ao mosto influiu positivamente na manutenção da viabilidade celular, podendo assim propiciar melhor qualidade do fermento reciclado. Também se observou redução no tempo de fermentação.
- Todas as cachaças avaliadas sensorialmente foram aceitas.
- A adição de N protéico ao mosto para a produção de cachaça não permite atribuir influência negativa nos teores de compostos voláteis formados e aceitação sensorial das cachaças.
- A complementação do mosto de caldo de cana com N protéico com formas assimiláveis pela levedura, pode ser uma prática útil na otimização do processo de fermentação alcoólica para produção de cachaça.