



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS – UFGD
FACULDADE DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

BIOPROSPECÇÃO DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* A PARTIR
DE DIFERENTES ALAMBIQUES NO ESTADO DO MARANHÃO PARA
PRODUÇÃO DE CACHAÇA ARTESANAL

DIEGO SÂMIDE SILVA MADEIRA

Dourados/MS
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS – UFGD
FACULDADE DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

BIOPROSPECÇÃO DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* A PARTIR
DE DIFERENTES ALAMBIQUES NO ESTADO DO MARANHÃO PARA
PRODUÇÃO DE CACHAÇA ARTESANAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Grande Dourados, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre

Discente: Diego Sâmide Silva Madeira
Orientadora: Prof.^a Dra. Danielle
Marques Vilela

Dourados/MS
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

M181b Madeira, Diego Samide Silva
Bioprospecção de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de diferentes alambiques no Estado do Maranhão para produção de cachaça artesanal [recurso eletrônico] / Diego Samide Silva Madeira. -- 2023.
Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Dra. Danielle Marques Vilela.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-
Universidade Federal da Grande Dourados, 2023.
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Cachaça. 2. Artesanal. 3. Fermentação. 4. Levedura. 5.
Saccharomyces cerevisiae.
I. Vilela, Dra. Danielle Marques. II. Título.,

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado APRESENTADA POR DIEGO SÂMIDE SILVA MADEIRA, ALUNO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS".

Aos treze dias do mês de outubro do ano de dois mil e vinte e três, às nove horas, em sessão pública, realizou-se na Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "**Bioprospecção de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de diferentes alambiques no Estado do Maranhão para produção de cachaça artesanal**", apresentada pelo mestrando Diego Sâmide Silva Madeira, do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, à Banca Examinadora constituída pelos membros: Prof.^a Dr.^a Danielle Marques Vilela/UFGD (presidente/orientadora), Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira/UFGD (membro titular interno), Prof. Dr. Vitor Augusto dos Santos Garcia/UNESP (membro titular externo). Iniciados os trabalhos, a presidência deu a conhecer ao candidato e aos integrantes da banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após o candidato ter apresentado a sua Dissertação, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições. Terminada a Defesa, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo sido o candidato considerado APROVADO. A Presidente da Banca atesta a participação dos membros que estiveram presentes de forma remota, conforme declarações anexas. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Dourados/MS, 13 de outubro de 2023.

Documento assinado digitalmente
gov.br DANIELLE MARQUES VILELA
Data: 15/10/2023 21:38:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Danielle Marques
Vilela
Presidente/orientadora

Documento assinado digitalmente
gov.br RODRIGO MATHEUS PEREIRA
Data: 13/10/2023 18:42:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rodrigo Matheus
Pereira Membro Titular
Interno (Participação
Remota)

Documento assinado digitalmente
gov.br VITOR AUGUSTO DOS SANTOS GARCIA
Data: 13/10/2023 12:36:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Vitor Augusto dos Santos
Garcia Membro Titular Externo
(Participação Remota)

(PARA USO EXCLUSIVO DA PROPP)

ATA HOMOLOGADA EM: ____ / ____ / ____ , PELA PROPP/ UFGD.

*Este trabalho de dissertação de mestrado,
dedico aos meus pais,
Dorgival Madeira Santos e
Salvany Silva Madeira*

AGRADECIMENTOS

A vida é combate, e devemos sempre ultrapassar nossas barreiras para alcançar nossos objetivos. E por isso que agradeço fielmente a Deus por tudo que tenho alcançado, pois sem eles não teria chegado tão longe.

Agradeço de coração a minha orientadora professora Dra. Danielle Marques Vilela pela possibilidade de desenvolver este trabalho, pelos inúmeros socorros em diversos momentos difíceis, pelo seu incentivo e paciência. Carregarei comigo sua dedicação ao ensino e o amor ao trabalho.

A Dra. Adriana Crispim de Freitas, por seu entusiasmo, dedicação, profissionalismo e parceria, foi de grande importância com a contribuição da parceria entre as universidades.

A Dra. Virlane Kelly Lima Hunaldo, pelo apoio, disponibilidade e amizade, auxiliando em todos os momentos oportuno.

Ao Dr. Leonardo Hunaldo dos Santos, pela disponibilidade nos diversos momentos e pela parceria em conceder os laboratórios.

A minha esposa Adriana Neves Ribeiro Madeira, pelo amor, parceria e companheirismo, estando sempre ao meu lado dando forças.

A minha família pela confiança, parceria, acreditando que seria possível vencer todas as dificuldades até chegar ao final.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivo específico	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	Matéria-prima	16
3.2	Histórico das bebidas alcoólicas	16
3.2.1	Conceito econômico da cachaça	19
3.3A	Cachaça de Alambique	20
3.4	O Mercado da Cachaça	24
3.5	Compostos secundários na qualidade da cachaça	24
3.6	Aldeídos	24
3.6.1	Ésteres	25
3.6.2	Acidez Volátil	25
3.7	Produção de cachaça em alambique	26
3.7.1	Extração do caldo	28
3.7.2	Inóculo	28
3.7.3	Fermentação	29
3.7.4	Propagação do Fermento	30
3.7.5	Seleção de microrganismos	32
3.8	Fatores que atuam na fermentação	34
3.8.1	Temperatura	35
3.8.2	Condições de produção e formação do mosto	35
3.8.3	Agitação e aeração	36
3.9	Destilação	37
3.9.1	Destilação do vinho	39
3.9.2	Contribuição dos compostos secundários	40
3.10	Armazenamento e envelhecimento	42
4	MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1	Coleta das amostras	44
4.2	Meios de cultura	45
4.2.1	Isolamento das leveduras	45
4.3	Análises bioquímicos para caracterização taxonômica das leveduras	46
4.4	Análises de seleção das leveduras em escala piloto	46
4.4.1	Multiplificação das leveduras testadas em escala piloto	47
4.4.2	Etapa da fermentação em escala piloto	49
4.5	Análise de floculação	50
4.6	Análises de tolerância aos tipos de estresses	51
4.6.1	Análise de Tolerância à temperatura	51
4.6.2	Análise de tolerância ao álcool	51
4.6.3	Acidez total do mosto de fermentação e do vinho	51
4.7	Análises do destilado - Cachaça	51
5	RESULTADOS e DISCUSSÕES	52
5.1	Seleção das leveduras	52
5.2	Floculação	58
5.3	Tolerância a temperaturas elevadas e etanol	59
5.4	Análises do destilado - Cachaça	60
6	CONCLUSÕES	63
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

BIOPROSPECÇÃO DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* A PARTIR DE DIFERENTES ALAMBIQUES NO ESTADO DO MARANHÃO PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA ARTESANAL

RESUMO - A cachaça no Brasil tem sua história marcada pela sua produção artesanal. Tendo seu consumo em todas as regiões do país, estando em todos os segmentos e níveis da sociedade brasileira. Buscando a excelência na qualidade da cachaça por meio de diversos processos, para obter cachaça de qualidade. A qualidade do produto está intrinsecamente ligada à utilização de leveduras no processo fermentativo, podendo ser de origem selvagem ou adicionada intencionalmente, por meio de cepas selecionadas para a fermentação. Com o objetivo de obter uma cepa isolada e caracterizada, foram realizadas análises de caracterização e seleção de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* provenientes de diferentes regiões do Estado do Maranhão, com o objetivo de identificar compostos que conferem aromas e sabores característicos nas cachaças produzidas em regiões específicas do estado. Inicialmente, foram avaliadas seis amostras de mostos de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, coletadas diretamente das dornas fermentativas nas destilarias de cachaça de alambique. As amostras foram inoculadas e submetidas à diluição seriada obtendo, aproximadamente 200 colônias. Para a seleção das leveduras, os isolados passaram por quatro etapas de multiplicação celular (A1 a A4), sendo avaliado o °Brix. E por duas etapas fermentativas, FP1 e FP2, nas quais foi avaliado o tempo de redução do °Brix e término da fermentação. As cepas que apresentaram os melhores resultados foram consideradas adequadas para a produção de cachaça. O estudo evidenciou que as cepas analisadas das amostras de CA1, CA2, CA3, CA4, CA5 e CA6 de *Saccharomyces cerevisiae*, apenas as cepas CA5 e CA6 foram as que conseguiram finalizar a fermentação em seis dias, onde as cepas da amostra CA6, sendo as mais promissoras. Na etapa FP2 da fermentação, as cepas das amostras CA1, CA5 e CA6 reduziram o °Brix menor que 1% em 24h. Os outros isolados testados não reduziram o °Brix a zero na etapa FP2 após 24 horas. Após a etapa de multiplicação e fermentação os isolados das leveduras foram submetidos ao teste de floculação e tolerância a diferentes tipos de estresse. Com o excelente desempenho dos isolados das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* das amostras CA1, CA3, CA5 e CA6, apresentaram resultados satisfatórios, evidenciando características favoráveis na produção de cachaça de alambique em condições ambientais encontradas na região do Maranhão.

Palavras-chave: Cachaça, Artesanal, Fermentação, Levedura, *Saccharomyces cerevisiae*.

BIOPROSPECTION OF STRAINS OF *Saccharomyces cerevisiae* FROM DIFFERENT ALAMBIQUES IN THE STATE OF MARANHÃO FOR THE PRODUCTION OF ARTISAN CACHAÇA

ABSTRACT - Cachaça in Brazil has its history marked by its artisanal production. It is consumed in all regions of the country, being in all segments and levels of Brazilian society. Seeking excellence in the quality of cachaça through various processes, to obtain quality cachaça. The quality of the product is intrinsically linked to the use of yeast in the fermentation process, which can be of wild origin or added intentionally, through strains selected for fermentation. With the aim of obtaining an isolated and characterized strain, characterization and selection analyzes were carried out on strains of *Saccharomyces cerevisiae* from different regions of the State of Maranhão, with the aim of identifying compounds that impart characteristic aromas and flavors to cachaças produced in specific regions. of State. Initially, six samples of *Saccharomyces cerevisiae* yeast musts were evaluated, collected directly from the fermentation tanks in the still cachaça distilleries. The samples were inoculated and subjected to serial dilution, obtaining approximately 200 colonies. For the selection of yeasts, the isolates went through four stages of cell multiplication (A1 to A4), with the °Brix being evaluated. And through two fermentative stages, FP1 and FP2, in which the °Brix reduction time and completion of fermentation were evaluated. The strains that presented the best results were considered suitable for the production of cachaça. The study showed that the strains analyzed from the CA1, CA2, CA3, CA4, CA5 and CA6 samples of *Saccharomyces cerevisiae*, only the CA5 and CA6 strains were those that managed to complete fermentation in six days, whereas the strains from the CA6 sample, being the most promising. In the FP2 stage of fermentation, strains from samples CA1, CA5 and CA6 reduced °Brix by less than 1% in 24h. The other isolates tested did not reduce the °Brix to zero in the FP2 stage after 24 hours. After the multiplication and fermentation stage, the yeast isolates were subjected to flocculation and tolerance tests to different types of stress. With the excellent performance of the isolates of *Saccharomyces cerevisiae* strains from samples CA1, CA3, CA5 and CA6, they presented satisfactory results, showing favorable characteristics in the production of still cachaça in environmental conditions found in the Maranhão region.

Keywords: Cachaça, Craft, Fermentation, Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AMPAQ	Associação Mineira dos Produtores de Cachaça de Qualidade
ATM	Pressão Atmosférica
ATP	Adenosina Trifosfato
CITAC	Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
GL	Grau Lussac
H ₂ S	Sulfeto de Hidrogênio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBRAC	Instituto Brasileiro da Cachaça
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia
KG	Quilograma
L	Litro
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MG	Miligrama
PBDAC	Programa Brasileiro de Desenvolvimento de Aguardente de Cana
PCR	Polymerase Chain Reaction ou Reação em Cadeia da Polimerase
PEE	Programa Especial de Exportações
PNPE	Programa dos Novos Polos para Exportação
PPM	Partes Por Milhão
RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	Rotações Por Minuto
RTMC	Rede Mineira de Tecnologia da Cachaça
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
YP	Yeast Peptone
YPD	Yeast Peptone Dextrose

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Parâmetros de padrão de qualidade com os limites físico-químicos da cachaça.....	22
TABELA 2: Parâmetros com os limites dos contaminantes orgânicos e inorgânicos da cachaça.....	23
TABELA 3: Produtos de várias fermentações microbianas.....	31
TABELA 4: Etapas de multiplicação (A1 a A4).....	48
TABELA 5: Etapas da fermentação (FP1 e FP2).....	50
TABELA 6: Análise do mosto fermentado em sólidos totais durante a etapa de A1 de multiplicação (30 °C, 150 rpm / 24h).....	52
TABELA 7: Análise do mosto fermentado em sólidos totais durante a etapa de A2 de multiplicação (30 °C, 150 rpm / 24h).....	53
TABELA 8: Análise do mosto fermentado em sólidos totais durante a etapa de A3 de multiplicação (30 °C, 150 rpm / 24h).....	53
TABELA 9: Análise do mosto fermentado em sólidos totais durante a etapa de A4 de multiplicação (30 °C, 150 rpm / 24h).....	54
TABELA 10: Valores médios de sólidos totais do mosto fermentado das leveduras ao longo das etapas de fermentação FP1 (caldo-de-cana pasteurizado por 24h à 13 °Brix,).....	55
TABELA 11: Valores médios de sólidos totais do mosto fermentado das leveduras ao longo das etapas de fermentação FP2 (caldo-de-cana pasteurizado por 24h à 15 °Brix,).....	55
Tabela 12. Resultado das análises de floculação em meio a YP 2% de glicose entre as amostras.....	58
Tabela 13. Resultado das análises os destilados de cachaças.....	61

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Fluxograma da produção de cachaça..... 27
- FIGURA 2:** Imagem do laboratório de pesquisa da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, em pesquisa em andamento..... 44
- FIGURA 3:** Método de plaqueamento em superfície..... 45
- FIGURA 4:** Incubadora Shaker de Laboratório com movimento orbital - NT712.....47
- FIGURA 5:** Análise de tolerância a etanol e a temperaturas elevadas, demonstrando crescimento de leveduras com 10% e 15% de etanol à 30 ° C..... 59
- FIGURA 6:** Análise de tolerância a etanol e a temperaturas elevadas, demonstrando crescimento de leveduras com 20% de etanol à 30 °C.....60

1 INTRODUÇÃO

A cachaça, sendo o destilado mais antigo das Américas, foi introduzida nos costumes brasileiros e atualmente é uma parte essencial da cultura e culinária do país. Ao longo dos anos, ganhou ampla popularidade, sendo produzida em praticamente todos os estados da Federação. Assim, a cachaça tornou-se integrante de diversos segmentos da sociedade brasileira. Tendo sua origem da cana-de-açúcar, originalmente utilizada para a produção de rapadura e açúcar mascavo. Inicialmente, a aguardente era obtida através da destilação do melaço não cristalizado, posteriormente passou a ser produzida diretamente a partir da cana-de-açúcar. (Gerk *et al.*, 2022).

A produção artesanal de cachaça é realizada por milhões de produtores em vários estados brasileiros, tendo experimentado um crescimento significativo nas últimas duas décadas. Os principais estados produtores são São Paulo (45%), Pernambuco (12%), Ceará (11%), Rio de Janeiro (8%), Goiás (8%), Paraná (4%), Paraíba (2%) e Bahia (2%), destacando-se como principais polos produtores no país. A produção de cachaça artesanal ou de alambique é mais especializada em Estados como Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia e São Paulo, representando cerca de 50% de toda a produção de cachaça no Brasil (EMBRAPA, 2022).

De acordo com Santos (2021), a produção de cachaça de alta qualidade requer a implementação de diversos procedimentos essenciais, incluindo o cultivo de cana-de-açúcar de qualidade, a utilização de alambiques apropriados e a adesão a um eficiente processo de fermentação. Os aromas e sabores da cachaça estão intrinsecamente ligados ao processo de produção da bebida, e esses métodos desempenham um papel crucial na garantia da qualidade da cachaça brasileira, viabilizando sua comercialização tanto no mercado interno quanto no internacional.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* destaca-se por suas diversas aplicações biotecnológicas, graças à sua fisiologia versátil, que encontra grande utilidade em variados processos de fermentação. Desempenhando um papel crucial na qualidade do produto ao longo do processo de produção, essa levedura é essencial para garantir resultados satisfatórios. Existem duas fontes predominantes de levedura: aquela que ocorre naturalmente, presente na

microbiota da cana-de-açúcar, e as cepas comerciais. O uso de cepas comerciais na produção de bebidas alcoólicas é amplamente difundido em todo o território (Alvarenga, 2019).

Na escolha de microrganismos para a produção de cachaça, é fundamental optar por aqueles capazes de converter os açúcares em álcool, permitindo a obtenção natural da bebida. As leveduras desempenham um papel crucial nesse processo, sendo responsáveis pela produção de compostos que conferem aroma e sabor à cachaça. A seleção cuidadosa das leveduras é de grande importância, pois pode influenciar significativamente a qualidade do produto. Muitos produtores buscam criar uma cachaça de excelência, levando em consideração fatores como boa adaptação a mostos com elevadas concentrações de açúcar e álcool, controle eficiente do processo de fermentação, minimização de espuma excessiva, rentabilidade positiva do etanol e completa fermentação dos açúcares (Alvarenga, 2019).

Estas linhagens cuidadosamente selecionadas são cepas concorrentes que possuem características favoráveis para a produção de cachaça. Os fermentos escolhidos em laboratório para a produção de bebidas fermentadas são selecionados com base em cepas que apresentaram bons resultados em fermentações anteriores (Santos, 2021).

Conforme mencionado por Fiore *et al.* (2005), a presença de uma diversidade biológica significativa nas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* ressalta a importância de investigar o potencial das leveduras selvagens na produção de cachaça. Essa avaliação abrange a identificação e o uso de leveduras desejáveis, com capacidade de promover o crescimento celular e assegurar a qualidade superior da bebida.

Neste estudo, buscou-se avaliar as cepas *Saccharomyces cerevisiae* dos mostos de fermentação de seis alambiques distribuídos pelo estado do Maranhão, a fim de determinar qual deles se adapta melhor aos processos de produção de cachaça e os efeitos desses processos na qualidade da mesma. O objetivo foi estimular o tempo da multiplicação celular e melhorar a qualidade da cachaça, além de determinar a viabilidade e a prevalência do inóculo na presença de microrganismos contaminantes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar e selecionar cepas de *Saccharomyces cerevisiae* provenientes de diferentes regiões do Estado do Maranhão, visando a obtenção de leveduras específicas para a produção de cachaça de alambique.

2.2 Objetivo específico

- Avaliar as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas das dornas fermentativas em seis agroindústrias localizadas em diferentes regiões do Estado do Maranhão, no contexto da fabricação de cachaça;
- Avaliar e identificar agentes que atribuem aroma e sabor específicos nas cachaças de determinadas regiões do Maranhão, através das cepas selecionadas;
- Avaliar as características das cepas isoladas aplicando diferentes níveis de estresses ao álcool, temperatura e acidez total;
- Obter cepas *Saccharomyces cerevisiae* capazes de produzirem uma cachaça de alambique, com excelente qualidade e características favoráveis, observando a região do Estado do Maranhão.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Matéria-prima

A cana-de-açúcar faz parte do gênero *Saccharum*, inserido na classe das monocotiledôneas, pertencente à família Poaceae (Gramíneas). Em termos gerais, é uma planta que se adapta favoravelmente a climas quentes, abrangendo tanto regiões tropicais quanto subtropicais (Silva Filho, 2014).

De acordo com a CONAB (Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar, 2023), o Brasil possui uma área plantada de cana-de-açúcar de cerca de 8.288,3 mil hectares, apresentando uma produtividade de 78.779 kg/ha. Na safra de 2023, observou-se um incremento na produção de cana-de-açúcar, com uma estimativa de crescimento de 6,9% em relação à safra anterior (CONAB, 2023).

O Brasil lidera como o principal produtor mundial de cana-de-açúcar, sendo esta matéria-prima crucial para a produção de dois itens de grande importância para a economia nacional: o etanol e o açúcar. Entre as regiões mais produtivas destacam-se São Paulo, com 301,38 milhões de toneladas, Goiás, com 74,54 milhões de toneladas, e Minas Gerais, com 67,03 milhões de toneladas (CONAB, 2023).

Conforme Rodrigues (2016), a cana-de-açúcar desempenha um papel significativo nas contribuições socioeconômicas, sendo amplamente cultivada nas regiões tropicais do mundo. Sua relevância se reflete diretamente na produção de açúcar, álcool e cachaça.

3.2 Histórico das bebidas alcoólicas

As bebidas alcoólicas têm sido elaboradas e consumidas desde os primórdios da humanidade. As descrições mais precisas do álcool surgiram a partir do século XIX, sendo os termos "álcool" e "alambique" provavelmente originados nesse período. Os árabes são amplamente considerados como os pioneiros na descoberta do álcool. No entanto, antes da era cristã, diversas civilizações antigas, como os egípcios, os caldeus, os gregos e os chineses, já tinham conhecimento da destilação. A primeira menção ao álcool na Europa

remonta ao século XI (Santos, 2006).

A evolução tecnológica na produção de bebidas alcoólicas tem ocorrido ao longo dos anos. Segundo Brunelli (2015), a fabricação de bebidas alcoólicas teve início em civilizações há milhares de anos, e as tecnologias associadas à elaboração dessas bebidas têm evoluído em paralelo ao desenvolvimento da sociedade.

Mesmo durante a Idade Média, as bebidas alcoólicas fermentadas foram substituídas por um método inovador conhecido como destilação, que envolvia a separação da maior parte da massa fermentada. A destilação teve sua origem em um processo desenvolvido pelos Árabes, contribuindo para aumentar a concentração alcoólica (Caetano, 2018).

Inicialmente, a produção de uma bebida alcoólica se dava a partir dos resíduos do melão, resultando em uma garapa com sabor azedo. Nessa garapa, já ocorria naturalmente a fermentação, permitindo a obtenção de uma bebida fermentada a partir da cana-de-açúcar. Ao longo do tempo, essa bebida passou a ser conhecida como "cagaça" e, posteriormente, como cachaça. Acredita-se que a produção da cachaça teve início nas regiões produtoras de vinho, onde também eram elaboradas bebidas fermentadas à base de produtos amiláceos (Prudencio, 2021).

Segundo informações de Sebastião (2023), a prática da destilação teve sua origem com os avanços promovidos pelos alquimistas alexandrinos. Nesse processo, a destilação envolvia o aquecimento do líquido até sua vaporização, seguido pela coleta seletiva dos vapores condensados por meio de resfriamento.

Os produtos resultantes da destilação podem ou não ser submetidos a outro processo, como o envelhecimento, que envolve armazenar a bebida em recipientes, como tonéis, fabricados com madeiras como carvalho, bálsamo, amburana, e jequitibá, conferindo à bebida sabores e aromas adicionais. Entre os destilados mais conhecidos estão o uísque, originado a partir de milho ou cevada; o conhaque, destilado do vinho; a tequila, derivada do agave; e o rum e a cachaça, provenientes da cana-de-açúcar (Caetano, 2018).

Conforme a legislação brasileira, as bebidas alcoólicas são líquidos destinados ao consumo humano, sem fins medicinais. Segundo essa definição legal, o produto resultante do mosto fermentado por destilação-retificação deve

ser álcool etílico. Os destilados alcoólicos abrangem o álcool etílico potável de origem agrícola, bem como os destilados simples e suas variantes. As destilarias são obrigadas a apresentar anualmente ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento declarações sobre a matéria-prima utilizada na produção de destilados alcoólicos, conforme indicado por Lima (2011).

Conforme observado por Viana (2017), o mercado de cachaça no Brasil tem vivenciado um impulso impulsionado pela crescente demanda dos consumidores por produtos de melhor qualidade, acompanhado da tendência de maior sofisticação. Destaca-se que, entre as bebidas alcoólicas, a cerveja ocupa uma posição proeminente, sendo responsável por cerca de 70% do consumo total dessas bebidas no país.

De acordo com Lima (2001), o aumento na produção de cachaça, envolve o cultivo da cana-de-açúcar passando pelo processo produtivo até chegar no engarrafamento da bebida, gerou uma demanda crescente por conhecimentos técnicos e científicos. Diversos estudos e pesquisas foram realizados na área de fermentação do caldo de cana-de-açúcar, resultando em avanços no processo da retirada do caldo, decantação, fermentação e, por fim, processos de destilação e estabelecimento de parâmetros adequados. Esses estudos foram fundamentais para aprimorar os aspectos técnicos da indústria de aguardente, especialmente quando a indústria brasileira de etanol foi convocada a aumentar sua produção para fornecer etanol como combustível alternativo.

Com o intuito de aumentar a eficiência e promover uma maior organização na atividade, têm sido observadas ações impulsionadas pelo crescimento do consumo. Historicamente, a produção de cachaça tem sido marcada pela pulverização e pela informalidade. No entanto, esforços estão sendo feitos para promover mudanças nesse cenário. Dentre as iniciativas destacadas estão a Rede Mineira de Tecnologia da Cachaça (RTMC), o Programa Especial de Exportações (PEE), o Programa Brasileiro de Desenvolvimento de Aguardente de Cana (PBDAC) e o Programa dos Novos Polos para Exportação (PNPE) (Malta, 2006).

Apesar da qualidade do produto final ser o objetivo principal, é fundamental dedicar-se a todas as fases do processo, desde a aquisição da matéria-prima até o produto acabado (Estanislau *et al.*, 2002).

3.2.1 Conceito econômico da cachaça

A cachaça é um produto brasileiro com sua denominação regulamentada pela Portaria nº 539, de 26 de dezembro de 2022, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Conforme essa regulamentação, a cachaça é uma bebida exclusivamente brasileira, com teor alcoólico controlado entre 38% e 48% v/v a uma temperatura de 20°C. É produzida por meio da destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar. A cachaça apresenta características sensoriais únicas e pode conter adição de açúcares (Brasil, 2022).

De acordo com o IBRAC (Instituto Brasileiro da Cachaça), o Brasil tem uma capacidade de industrialização anualmente de 1,2 bilhão de litros de cachaça, porém, produz, aproximadamente, 800 milhões de litros, por ano. Em 2021, apenas 0,876% de toda a produção de cachaça foi exportada, gerando um lucro de US\$ 13,17 milhões. Esses números representam um crescimento de aproximadamente 29,52% em volume e 38,39% em valor.

Conforme o Anuário da Cachaça (2021), o Brasil possuiu 1.131 produtores de cachaça e aguardente em 2020, representando um aumento de 4,14% em relação aos 1.086 registrados em 2019. No entanto, esse número ainda está abaixo do registrado em 2018, quando havia 1.318 produtores. Esses dados são oficiais, porém o setor apresenta um alto grau de informalidade, com 89% dos produtores não cadastrados no Ministério da Agricultura, segundo IBRAC. O Censo 2017 do IBGE indica uma existência de 11.023 produtores no país, e o IBRAC estima que a indústria da cachaça emprega direta e indiretamente mais de 600 milhões de pessoas (Brasil, 2022).

A busca por uma cachaça de alta qualidade, o crescente apoio governamental, principalmente pelo governo do estado de Minas Gerais, e as oportunidades de exportação, impulsionaram a indústria da cachaça a adotar cada vez melhores práticas de fabricação. Isso também resulta em um aumento da fiscalização e das exigências por parte do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. O objetivo é obter um produto regulamentado e comprovadamente de qualidade, levando em consideração aspectos físicos, químicos e sensoriais. Porém, como já mencionado, a maioria dos alambiques ainda produz cachaça de maneira clandestina, sem atender aos requisitos de

controle de qualidade estabelecidos pelo Ministério da Agricultura (Brasil, 2021).

Conforme indicado pela EMBRAPA (2022), a maioria expressiva da cachaça de alambique produzida no Brasil é destinada ao mercado interno, onde o consumo é difundido, especialmente entre aqueles com menor poder aquisitivo, devido ao preço relativamente acessível da bebida. No entanto, recentemente, temos testemunhado o surgimento de um novo segmento demográfico de consumidores pertencentes à classe média e a estratos socioeconômicos mais elevados, impulsionados pela melhoria da qualidade das bebidas. Essa elevação na qualidade da cachaça tem contribuído para o crescimento das exportações, que têm apresentado uma taxa média anual de expansão de 10%.

De acordo com estimativas dos produtores, espera-se um crescimento significativo das exportações de cachaça até o final desta década, podendo atingir cerca de 42 milhões de litros. Atualmente, as exportações de bebidas alcoólicas representam apenas 0,8% de toda a produção de cachaça, de acordo com os dados da AMPAQ - Associação Mineira dos Produtores de Cachaça de Qualidade. No entanto, a meta é aumentar essa parcela para 4% da produção nacional, conforme reportado pelo Estado de Minas (2008).

Assim, a indústria de produção prevê que a cachaça terá para Minas Gerais a mesma relevância que a tequila para o México, o conhaque para a França, uísque para a Escócia e para o Japão o saquê, impulsionada pelas oportunidades do mercado interno, das exportações e com o suporte de programas de reorganização da rede de produção.

3.3 A Cachaça de Alambique

Segundo informações de Rodrigues (2019), a cachaça de alambique é produzida em volumes menores em comparação com a aguardente industrial. No processo de fabricação da cachaça de alambique, utiliza-se a cana-de-açúcar cortada e moída, resultando em um caldo puro que é então colocado em dornas de fermentação.

Após a obtenção da matéria-prima, inicia-se o processo de extração do

líquido, seguido por uma série de etapas de limpeza, como filtragem, decantação e elevação. Durante essa fase, o líquido passa por ajustes em termos de Brix, visando otimizar o processo de fermentação, desempenhando um papel crucial na produção de álcool destilado de alta qualidade. A eficiência da extração do caldo da cana, um fator determinante para a quantidade de cachaça produzida por tonelada de cana processada, está diretamente relacionada ao número e tipo de máquinas esmagadoras utilizadas no processo (Françoso, 2013).

Conforme destacado por Rodrigues (2019), a composição química do mosto, as necessidades nutricionais das plantas e a disponibilidade e absorção de nutrientes durante a fermentação são elementos cruciais, pois podem influenciar o desenvolvimento de microrganismos contaminantes ou causar reações indesejáveis que impactam a qualidade da cachaça. Após o processo de fermentação, a maior parte da cana é transformada em "vinho", uma mistura de água, álcool etílico e outros compostos secundários responsáveis pelo sabor e aroma das aguardentes. Dois métodos de destilação são amplamente utilizados para obter o "vinho": o alambique de cobre e a coluna de aço inoxidável. Embora a coluna de aço inoxidável seja preferida devido à sua maior capacidade de separação de componentes, seu custo mais elevado em comparação com o alambique de cobre limita sua utilização. No Brasil, o alambique de cobre é o destilador mais popular para a produção de aguardente e cachaças.

A cachaça de alambique, recém destilada, é bastante robusta e não adequada para consumo imediato, uma vez que ainda não adquiriu os compostos característicos que se desenvolvem durante o envelhecimento ou armazenamento. Contudo, é possível aprimorar a aceitação do produto pelos consumidores por meio do armazenamento em recipientes de madeira. Durante esse processo de maturação, a cachaça absorve ao longo do tempo as características de aroma e sabor provenientes da madeira, resultando em uma bebida de qualidade superior (Santos et al., 2021).

O surgimento das bebidas destiladas está diretamente ligado à invenção dos alambiques, que tinham como objetivo separar o vapor e os componentes líquidos de um produto quente para produção de álcool e extrair compostos aromáticos de vegetais fermentados (Lima, 2001).

Na destilação destaca-se intermediários indesejados na produção da bebida. No entanto, é possível evitar esse inconveniente através do controle rigoroso de variáveis como temperatura, °Brix, pH e higiene durante todo o processo, garantindo assim um produto de alta qualidade (Lima, 2001).

De acordo com Bosqueiro (2010), a fabricação de aguardentes envolve a destilação de líquidos que contêm álcool etílico, geralmente resultantes da fermentação do caldo de cana-de-açúcar. O teor alcoólico pode variar entre 38% e 54% em volume a 20°C. Durante o processo de destilação do destilado, há a separação das substâncias que acompanham o álcool, conhecidas como impurezas voláteis, as quais desempenham um papel significativo no aroma e sabor do produto final. O envelhecimento em barris de madeira apropriados pode acentuar essas impurezas.

Segundo Brasil (2005), a cachaça é o nome tradicional e exclusivo para a aguardente de cana-de-açúcar produzida no Brasil. É uma bebida que passa pelos processos de fermentação e destilação, possuindo um teor alcoólico que varia de 38% a 48% em volume, a uma temperatura de 20 °C, além de apresentar características sensoriais únicas. Além disso, pode ser produzida a partir do mosto da cana-de-açúcar destilado e pode conter até seis gramas de cana-de-açúcar por litro de sacarose.

A tabela 1 mostra a composição típica da cachaça, de acordo com o novo Regulamento Técnico que estabelece os padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e cachaça. No coeficiente de congêneres, são apresentados os valores correspondentes.

Tabela 1. Parâmetros de padrão de qualidade com os limites físico-químicos da cachaça e aguardente de cana.

Parâmetro	Min	Max
Graduação alcoólica, expressa em %, em v/v, a 20,0°C	38,0	48,0
Acidez volátil, expressa em ácido acético, em mg/100 mL de álcool anidro	-	150
Ésteres totais, expresso em acetato de etila, em mg/100 mL de álcool anidro	-	200
Aldeídos totais, em acetaldeído, em mg/100 mL de álcool anidro	-	30
Soma de Furfural e Hidroximetilfurfural, em mg/100 mL de álcool anidro	-	5

Soma dos álcoois isobutílico (2-metil propanol), isoamílicos (2- metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol) e n-propílico (1-propanol), em mg/100 mL de álcool anidro	-	360
Coefficiente de congêneres, em mg/100 mL de álcool anidro	200	650
Compostos fenólicos totais (para cachaça envelhecida)	Presente	
Açúcares totais (para cachaça), em g/L (expressos em glicose)	-	≤ 6,0
Açúcares totais (para cachaça adoçada), em g/L (expressos em glicose)	> 6,0	< 30

Fonte: BRASIL (2005)

A Tabela 2 apresenta os limites de contaminação orgânica e inorgânica, definidos pelo Regulamento Técnico que estabelece os Padrões de Identidade e Qualidade para aguardente de cana e cachaça. Esses parâmetros indicam os valores máximos permitidos para cada tipo de contaminação.

Tabela 2. Parâmetros com os limites dos contaminantes orgânicos e inorgânicos da cachaça e da aguardente de cana.

Parâmetro	Max
Álcool metílico (metanol), em mg/100 mL de álcool anidro	20,0
Carbamato de etila, em µg/L	210,0
Acroleína (2-propenal), em mg/100 mL de álcool anidro	5,0
Álcool sec-butílico (2-butanol), em mg/100 mL de álcool anidro	10,0
Álcool n-butílico (1-butanol), em mg/100 mL de álcool anidro	3,0
Cobre, em mg/L	5,0

Fonte: BRASIL (2005)

Foi implantado pelo governo o Programa de Incentivo à Produção de Aguardente de Qualidade (Pró-Cachaça), por meio da Lei nº 10.853/92, com o objetivo de promover a organização e cooperação entre os produtores de cachaça, incentivando a sua associação em entidades ou cooperativas. Essa iniciativa proporcionou aos pequenos produtores a oportunidade de comercializar seus produtos e ter acesso a conhecimentos para melhorar e elevar a qualidade da aguardente que produziam.

3.4 O Mercado da Cachaça

Segundo IBRAC (2022), a produção de cachaça tem ganhado cada vez mais relevância como um produto agrícola do Brasil. Embora ainda represente uma parcela pequena, o mercado internacional do país está em crescimento (Verdi, 2006). Atualmente, existem cerca de 180 empresas que estão exportando para 60 países.

Existem cerca de 40 milhões de produtores e 5 milhões de marcas de cachaça registradas, atualmente. A maioria desses produtores (99%) são microempresários que também se dedicam à produção de outros produtos agrícolas, como milho, feijão, café, leite, entre outros. A indústria do álcool é responsável por gerar cerca de 600 milhões de empregos a cada ano (IBRAC, 2022).

Um desafio relevante para aumentar a participação no mercado e garantir a sobrevivência dessas empresas é o alto nível de impostos aplicados às importações. Essa carga tributária excessiva tem um impacto negativo no setor, principalmente nas pequenas e microempresas, onde contribui para o aumento da informalidade (Alves, 2009).

3.5 Compostos secundários na qualidade da cachaça

Conforme explicado por Melo (2014), os compostos congêneres, também conhecidos como compostos secundários, são substâncias que se originam durante a fermentação simultânea do etanol e do ácido carboxílico, ou impurezas voláteis excluindo o álcool. Dentre esses compostos, destacam-se ácidos, ésteres, álcoois e aldeídos, sendo estes os principais compostos secundários. Em quantidades menores, podem também ser geradas cetonas e outros compostos fenólicos. Essas substâncias desempenham um papel crucial na definição da cor, sabor e aroma do destilado.

3.6 Aldeídos

Segundo Cardoso (2013), os aldeídos, responsáveis pela impressão geral da cachaça, são compostos carbonílicos altamente voláteis que se

formam durante a fermentação do mosto. Sendo altamente voláteis, esses compostos muitas vezes são considerados desagradáveis, contribuindo para a redução da qualidade do produto. Ao degustar a cachaça, a identificação dos aldeídos é facilitada devido às características indesejáveis que apresentam.

O acetaldeído é o aldeído formado durante a fermentação alcoólica, sendo produzido pelas leveduras, principalmente nos estágios iniciais desse processo fermentativo (Cardoso, 2013).

3.6.1 Ésteres

De acordo com Melo (2014), os ésteres representam quantitativamente a classe mais numerosa de compostos encontrados na cachaça e em outras bebidas, sendo formados durante o processo de fermentação pelas leveduras e também durante o envelhecimento, por meio da esterificação de ácidos graxos com etanol. Na cachaça, o éster primário é o acetato de etila, responsável por aproximadamente 80% do total de ésteres presentes. Em pequenas quantidades, esse éster confere um agradável aroma frutado, mas em quantidades maiores, contribui para um sabor satisfatório e agradável.

Assim, o elevado teor de ésteres, característico das bebidas alcoólicas de alta qualidade, pode impactar negativamente na qualidade da bebida.

3.6.2 Acidez Volátil

De acordo com Alcarde (2017), o ácido acético destaca-se como o componente mais significativo quando se aborda a acidez da cachaça. Este ácido orgânico é predominantemente encontrado nas aguardentes de cana.

A elevada acidez da cachaça pode estar associada à contaminação da cana-de-açúcar ou do mosto fermentado. O controle adequado da fermentação desempenha um papel crucial na regulação da acidez, visto que a presença de bactérias acéticas e outras pode conduzir à fermentação acética dos substratos, resultando em um aumento da acidez e uma diminuição do rendimento de etanol (Alcarde, 2017).

Segundo Oliveira (2012), realizar o fracionamento adequado das porções conhecidas como "cabeça", "coração" e "cauda" durante o processo de

destilação é fundamental para o controle dos níveis de ácido acético. A acidez desempenha um papel crucial na definição do sabor e aroma da cachaça, tornando essencial a produção e preparação de uma cachaça de alta qualidade. Cachaças com menor acidez tendem a ser mais agradáveis ao paladar.

3.7 Produção de cachaça em alambique

Segundo Parato *et. al.* (2002), na perspectiva biológica, a produção da cachaça de alambique passa por duas etapas fundamentais. A primeira etapa é a preparação do inóculo, também conhecido como pé-de-cuba. Durante essa fase, as cepas de leveduras são multiplicadas sob condições adequadas, garantindo um bom desenvolvimento da segunda etapa, onde consiste na conversão do açúcar em gás carbônico e álcool, conhecida como fermentação. Na segunda etapa, temos a fermentação, constituída como a etapa mais importante no processo na fabricação da cachaça. Durante essa fase, o açúcar e outros compostos presentes no mosto passam por uma conversão, resultando em produtos como etanol, CO₂ e outras substâncias que têm um papel fundamental na qualidade da cachaça. A etapa da fermentação é executada em recipientes específicos, chamados de dornas, projetados especialmente para essa finalidade (Janzantti, 2004).

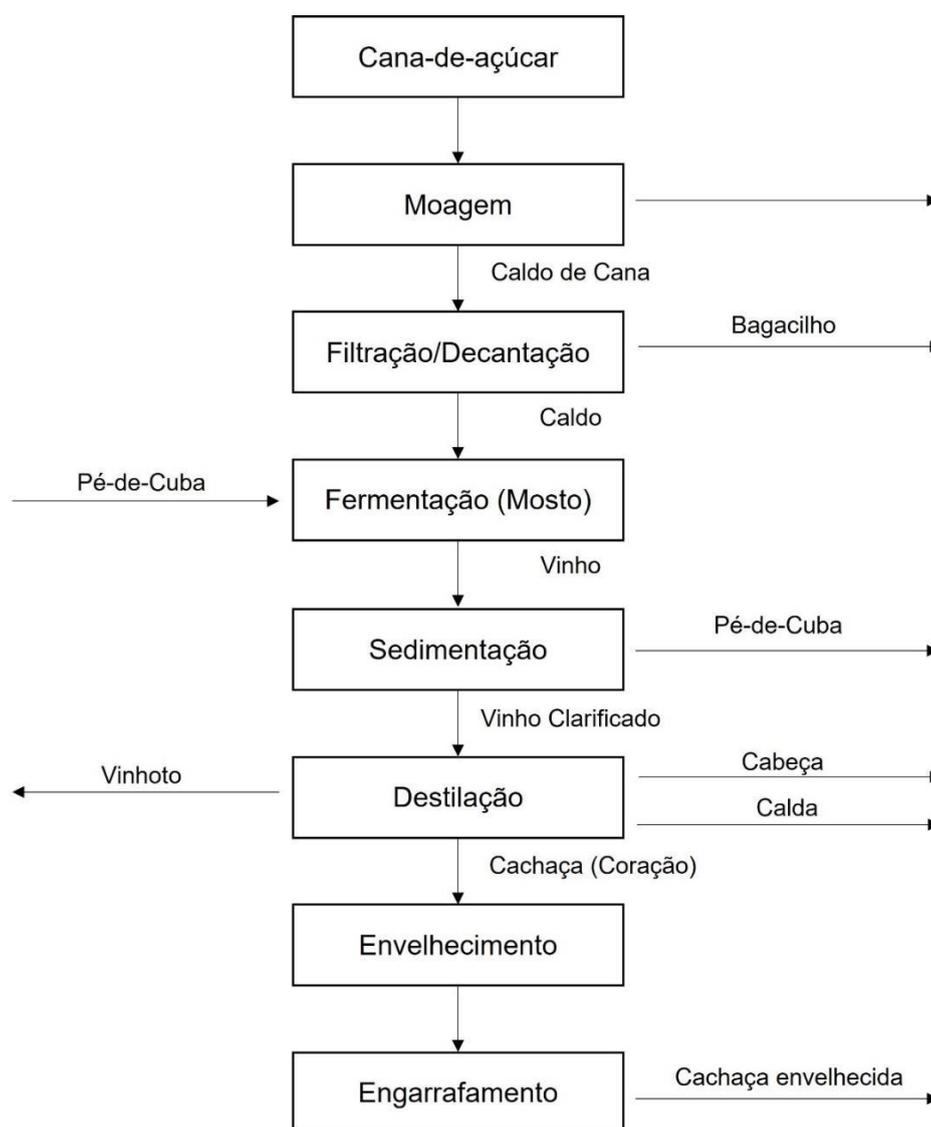
Um dos métodos amplamente utilizados pelas fabricas de cachaça de alambique é a técnica de batelada básica com reciclagem do inóculo. Nesse método, uma dorna é incubada com cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Quando a fermentação atinge um estágio adequado, indicado pela formação de bolhas, o conteúdo é transferido para uma fase vaporosa, conhecida como corte de dorna. O volume dos dois componentes é ajustado pela adição do caldo fermentado (Pataro *et al.*, 2002).

Na produção de cachaça, o fluxograma é mostrado na Figura 1. Depois de realizar a extração do caldo de cana-de-açúcar, é filtrado ou decantado para separar o bagacilho. Em seguida, o caldo é encaminhado para as dornas de fermentação, onde é incorporado com o “Pé-de-cuba”, denominação dada ao líquido denso composto por leveduras. Nesta etapa o caldo de cana filtrado, somado ao “pé-de-cuba” é denominado de Mosto, onde ocorrerá a fermentação,

com a produção de álcool e outros compostos (Lima, 2001).

Finalizada a fermentação do mosto, o líquido chama-se vinho e é depois destilado. Na etapa de destilação as frações da cabeça e da cauda são separadas durante a destilação, sendo a cachaça denominada de "coração". A bebida então tem a opção de envelhecer ou armazenada logo após a produção (Lima, 2001).

Figura 1. Fluxograma da produção da cachaça



Fonte: Lima, 2001

3.7.1 Extração do caldo

A etapa da moagem do caldo da cana-de-açúcar é realizada diretamente nos moinhos de engenho, cuja capacidade varia em função da capacidade de processamento da fábrica. A eficácia na extração do caldo é o que determina se o rendimento da cachaça será maior ou menor (Lima, 2001).

De acordo com os estudos das tecnologias de fermentação, qualquer líquido capaz de realizar a etapa de fermentação é chamado de mosto. Depois do processo de moagem, o caldo de cana-de-açúcar é submetido ao processo de clarificação e filtração por decantação, com o objetivo de remover impurezas presentes na suspensão. Segundo Lima (2001), o caldo resultante da extração da cana-de-açúcar é composto aproximadamente 78% a 86% de água, 11% a 18% de sacarose, 0,2% a 1,0% de açúcares redutores, 0,3% a 0,5% de cinzas e 0,5% a 1,0% de compostos nitrogenados.

A inclusão de fermento no caldo de cana-de-açúcar geralmente ocorre em uma faixa de pH entre 5,2 e 5,8. O caldo de cana é composto por diversos elementos orgânicos, como materiais de núcleo, pectinas e substâncias nitrogenadas, incluindo proteases e aminoácidos, além de conter clorofila, sacaretina e antocianina. No que diz respeito aos componentes químicos inorgânicos predominantes, destacam-se silício, potássio, fósforo, cálcio, sódio, magnésio, enxofre, ferro, alumínio, cloro, e outras substâncias, representadas pelas cinzas (Corrêa, 2015).

3.7.2 Inóculo

A cachaça é fabricada por meio de uma fase de fermentação espontânea do caldo de cana-de-açúcar fresco em conjunto com leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Os substratos e materiais empregados na preparação do inóculo, também conhecido como pé-de-cuba, funcionam como fonte de microrganismos necrófagos para a inoculação. Essa inoculação natural é comumente realizada misturando o caldo de cana sem diluição com ingredientes como arroz, milho, sal, suco de limão ou suco de laranja azeda. Segundo Schwan *et al.*, (2001), esse procedimento cria as condições necessárias para o crescimento das leveduras selvagens, garantindo sua

dominação durante a fermentação. No período de 7 dias, o caldo de cana-de-açúcar é gradualmente adicionado até atingir 20% do volume do mosto principal. Nesse momento, o inóculo é introduzido ao caldo até atingir sua capacidade total.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* predomina na microbiota que se desenvolveu no fermento silvestre. Diferentes variedades de leveduras já foram descobertas em concentrações baixas. A cachaça produzida pode apresentar mudanças de qualidade durante a safra e entre várias safras como resultado da variação da microbiota. Usando linhagens *Saccharomyces cerevisiae* especialmente escolhidas e estudadas da fermentação da cachaça para preparar o fermento inicial, o processo de fermentação é possível evitando problemas de contaminação (Pataro *et al.* 2002).

Segundo Pataro *et al.*, (2002), as leveduras que apresentaram alta eficiência estão sendo atualmente avaliadas em laboratórios. Nesse processo, elas são diluídas, adicionadas a uma água quente e, após três dias, o produtor terá o volume necessário para a fermentação primária do pé-de-cuba. Utilizando um fermento específico, a probabilidade de contaminação por bactérias ou outros competidores de substratos é reduzida. As leveduras usadas nesse tipo de inoculação são cepas que já demonstraram sucesso em fermentações anteriores e são coletadas em laboratório.

3.7.3 Fermentação

Uma fermentação ideal acontece quando o caldo de cana-de-açúcar possui uma quantidade de 14 a 16 °Brix. Níveis acima de 16 °Brix podem resultar em fermentações incompleta e mais lentas (Pataro *et al.*, 2002). De acordo com Oliveira e Magalhães (2002), a quantidade do caldo na mistura deve ser diluída para obter uma quantidade total de sólidos solúveis entre 12 e 16 °Brix.

Na fermentação, utiliza-se o termo "descontínua" para se referir à "fermentação em batelada" ou ao "processo de fermentação contínuo". Sua característica principal é que, no início, o mosto é inoculado com microrganismos e incubado sob condições ideais. Após o início do processo de fermentação, nenhum componente adicionado após o início. Em processos microbiológicos,

uma técnica chamada de "fermentação descontínua" é utilizada, na qual um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo, e os produtos permanecem no recipiente até a conclusão da fermentação. A adição de mais nutrientes pode ocorrer de forma contínua ou intermitente (Carvalho e Sato, 2001).

Um processo típico de fermentação tem uma duração de 24 horas. Geralmente, emprega-se o sistema de batelada convencional, no qual o inóculo e todo o material a ser fermentado são colocados na dorna de fermentação (Pataro *et al.*, 2002). A fermentação tem início assim que as leveduras entram em contato com o mosto e consiste em três fases distintas: a fase preliminar ou pré-fermentativa, em que ocorre a adaptação das leveduras celulares; a fase principal, marcada por uma turbulência com a liberação abundante de gás e produção de álcool; e a fase complementar ou pós-fermentativa, na qual a atividade diminui (Janzantti, 2004).

As leveduras produzem uma quantidade maior de etanol em comparação com outras substâncias secretadas (Silva, 2003). No entanto, é comum que uma pequena porcentagem seja convertida em outros produtos. Durante a fermentação, são formados compostos como glicerol, ácidos orgânicos (como succínico, acético, láctico e butírico), amônia, isoamônia, ácido butírico, aldeídos e ésteres (Janzantti, 2004).

3.7.4 Propagação do Fermento

De acordo com Lima (2001), na produção de bebidas alcoólicas, é comum usar leveduras do tipo *Saccharomyces cerevisiae*. Diferentes espécies de leveduras podem estar presentes em fermentações espontâneas. É essencial que as células das leveduras sejam viáveis para o sucesso do processo de fermentação, e a capacidade de tolerância ao álcool é um fator importante na produção de bebidas alcoólicas em larga escala.

Segundo Gerra *et al.*, (2001), o "fermento caipira", é um inóculo natural utilizado na produção de bebidas alcoólicas. Trata-se de uma mistura que inclui caldo de cana-de-açúcar, farelo de arroz, farinha de soja ou milho e outros cereais, os quais são adicionados com suco. O inóculo é gerado por meio da fermentação espontânea do líquido, realizada por microrganismos necrófagos

presentes na cana-de-açúcar, equipamentos e dornas de fermentação.

Nas grandes destilarias brasileiras de álcool, assim como nas pequenas fábricas, é frequente o uso de fermentos selecionados no início da safra. Ao longo dos ciclos de fermentação, que geralmente têm duração de 20 a 24 horas, microrganismos indesejáveis contaminam o caldo de cana-de-açúcar. Essa situação é observada em todas as regiões do país, onde predominam os microrganismos adaptados à região e/ou ao ambiente (Lima, 2001). De modo geral, verifica-se que *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura predominante nas fermentações, tanto espontâneas como controladas (Schwan *et al.*, 2001).

Segundo Caldwell (1995), na área da biotecnologia, a principal característica da fermentação está relacionada aos produtos que podem ser obtidos por meio desse processo. A fermentação ocorre devido à ação de enzimas de microrganismos específicos, como as leveduras, que modificam as substâncias ácidas presentes nos mostos submetidos à fermentação. Esses microrganismos têm a capacidade de produzir substâncias como etanol, metanol, gás carbônico, glicerina, ácido succínico, além de outros compostos em quantidades mínimas, como alcoóis alifáticos, ésteres, aldeídos e hidrocarbonetos superiores.

A fermentação resulta em diversos produtos, que variam de acordo com os microrganismos, substratos e enzimas utilizados. A tabela 3 mostra a relação entre os microrganismos e os produtos resultantes da fermentação.

Tabela 3. Produtos de várias fermentações microbianas.

Microrganismos	Produtos da fermentação
<i>Streptococcus, Lactobacillus</i>	Ácido Láctico
<i>Saccharomyces</i>	Etanol e CO ₂
<i>Propionibacterium</i>	Ácido propiônico, ácido acético, CO ₂ e H ₂ O
<i>Clostridium</i>	Ácido butírico, butanol, acetona, álcool isopropílico e CO ₂
<i>Escherichia, Salmonella</i>	Etanol, ácido láctico, ácido succínico, ácido acético, CO ₂ e H ₂ O
<i>Enterobacter</i>	Etanol, ácido láctico, ácido fórmico, butanodiol, acetoína, CO ₂ e H ₂ O

Fonte: Tortura (2000).

3.7.5 Seleção de microrganismos

Ao escolher um microrganismo para a fermentação de um substrato específico, com o objetivo de produzir comercialmente um determinado produto, vários fatores são levados em consideração. Esses fatores incluem a taxa de crescimento celular, que está relacionada à produção de biomassa, a viabilidade do microrganismo ao longo do processo, a estabilidade do organismo em diferentes meios de fermentação e o rendimento de compostos valiosos obtidos a partir da matéria-prima através do microrganismo (Dias, 2001).

É essencial selecionar níveis adequados para aprimorar a qualidade da cachaça e aumentar a eficiência do processo produtivo. Para compreender o funcionamento dos microrganismos durante as etapas da fermentação, é crucial entender o papel dos fermentos na produção da cachaça. Isso pode ser realizado por meio da caracterização tecnológica necessária para desenvolver linhagens iniciadoras. As leveduras, especialmente dos gêneros *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces*, são responsáveis pela fermentação alcoólica do mosto e têm sido identificadas com uma ampla variedade de características em produtos naturais de Minas Gerais (Schwan *et al.*, 2001).

A presença de diferentes microrganismos durante os processos de fermentação e destilação tem um impacto significativo na qualidade da bebida, uma vez que esses microrganismos influenciam a formação e proporção de compostos secundários. Para tomar decisões informadas, é crucial conhecer as características desses microrganismos, o que pode ser obtido por meio de vários testes que identificam tais propriedades. Isso permite a criação de uma coleção de cepas com características desejáveis, favorecendo a obtenção de uma produção de melhor qualidade (Schwan *et al.*, 2001).

De acordo com Pataro *et al.* (2002), alguns produtores de cachaça optam por utilizar fermento de panificação para acelerar a formação do iniciador do fermento. No entanto, essa prática não é recomendada, uma vez que a levedura utilizada no fermento de panificação foi selecionada para panificação, não para a produção de cachaça. Foi constatado que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* permanece ativa por um período máximo de 20 dias após a preparação do fermento (pé-de-cuba) em fermentações com fermento de panificação. Isso ocorre devido ao uso diário de leveduras selvagem,

juntamente com o caldo de cana, para controlar o processo.

As linhagens selecionadas devem apresentar alta tolerância ao etanol, garantindo um desempenho final satisfatório. O etanol pode se tornar prejudicial em concentrações elevadas, por isso a tolerância a níveis altos desse metabólito primário é um fator crucial na produção (Fialho, 2000).

Outro aspecto extremamente importante, se refere ao ambiente onde encontra-se o microorganismo, sujeito à variação na etapa de fermentação é a temperatura, que influencia a formação dos metabólitos a partir dos materiais iniciais. A quantidade de nutrientes consumidos por um determinado microrganismo pode variar drasticamente em um determinado período de tempo, dependendo da temperatura. Onde, a fermentação durante a produção de cachaça, ocorre em um período de 24 horas a uma temperatura média de 32 °C (Fialho, 2000).

Segundo a pesquisa realizada por Gomes *et al.* (2002), durante um período de até 30 dias consecutivos, as leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* são capazes de manter o controle da fermentação. No entanto, após esse período, leveduras selvagens podem apresentar resultados semelhantes ou até superiores às linhagens iniciadoras testadas. Portanto, é possível continuar com o padrão de qualidade da cachaça ao longo de várias safras e períodos de entressafra, trocando periodicamente o fermento e utilizando linhagens cuidadosamente selecionadas. A seleção de microrganismos em laboratório envolve um processo em que as leveduras são isoladas e submetidas a uma série de testes genéticos, morfológicos e bioquímicos.

De acordo com Schwan *et al.* (2001), os isolados previamente identificados como *Saccharomyces cerevisiae* por meio de testes convencionais foram subsequentemente submetidas as análises de caracterização molecular usando a técnica de PCR. Segundo esses autores, as cepas selecionadas de *S. cerevisiae*, tanto as comumente encontradas em laboratórios quanto as coletadas de um alambique comercial, mostraram-se altamente competitivas em relação a cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e outros microrganismos. Isso resultou no aumento da produção de alambiques e melhorias nos produtos, especialmente em termos de teor alcoólico e acidez.

Após aproximadamente 24 horas, as leveduras sedimentam no fundo do caldo de cana, indicando o fim da fermentação. Nesse momento, o sedimento é

removido e as leveduras são reativadas através da adição de caldo de cana fresco, previamente diluído em uma solução de 16 °Brix, com uma temperatura de 30 °C, onde é necessária para evitar altos níveis de °Brix, que podem ser prejudiciais às células e causar uma conversão excessiva de açúcar para etanol. Essa diluição ajuda a reduzir o estresse nas células na etapa de fermentação. Nesta etapa do processo é importante controlar a redução de 1 °Brix por hora, até que o nível de °Brix atinja zero ao final da fermentação, indicando uma fermentação bem-sucedida (Schwan *et al*, 2001).

A fase inicial da fermentação requer uma quantidade de oxigênio no produto, que é crucial para o crescimento inicial das leveduras. Nessa fase, observamos apenas o desenvolvimento da colônia de levedura. Quando o fornecimento de oxigênio no mosto é interrompido, o processo principal de fermentação tem início. Nessa etapa, ocorre a produção de uma enzima pelas leveduras que converte os açúcares em gás carbônico e álcool, interrompendo a produção de vegetais (Schwan *et al*, 2001).

Da mesma forma que o controle do pH e da temperatura é fundamental, o controle da fermentação é fundamental para evitar o crescimento de microrganismos contaminantes. Conforme apontado por Schwan *et al.* (2001), as contaminações são mais prováveis com pH próximo de 4 e em temperaturas mais elevadas que 32 °C. Portanto, é necessário monitorar e ajustar tanto o pH quanto a temperatura durante a fermentação, a fim de prevenir a ocorrência de contaminações indesejadas.

Segundo Schwan *et al.* (2001), estudos cromatográficos revelaram que não há presença de sacarose nas dornas de fermentação, pois esse açúcar passa por uma hidrólise permanente, transformando-se em glicose e frutose à medida que a temperatura do mosto aumenta. Além disso, foi observada uma quantidade significativa de invertase no fundo da dorna de fermentação, o que auxilia na hidrólise lenta do substrato à medida que ele se move.

3.8 Fatores que atuam na fermentação

Segundo Stanley *et al.* (2010), altas concentrações de etanol aceleram o processo de morte celular e diminuem a produção dele, resultando em estresse. Níveis elevados de etanol no fígado podem levar ao desenvolvimento vários

problemas, como redução do volume celular, diminuição dos níveis de RNA e proteínas sintetizadas, desnaturação de proteínas, alteração da atividade glicolítica, indução de resposta ao estresse, acúmulo de trealose intracelular, disfunção endócrina e aumento de ácidos graxos.

De acordo com Ding *et al.* (2009), estudos revelaram modificações nas propriedades funcionais e cinéticas das enzimas, resultando em um aumento da sua atividade no ponto de verificação da atividade proteica. Essas descobertas ressaltam a importância da obtenção de espécies que possa suportar elevados teores de etanol na indústria, como enfatizado por Stanley *et al.* (2010).

3.8.1 Temperatura

De acordo com Ortiz (2017), a necessidade de controlar a temperatura é de grande importância, As variações na temperatura do mosto afetam o metabolismo das leveduras, resultando em alterações na cinética química da formação e degradação dos subprodutos da fermentação. São esses subprodutos que conferirão a identidade única ao sabor de cada cachaça.

A fermentação ideal da levedura demanda um ambiente propício. Onde, é essencial manter uma faixa específica de temperatura para garantir a consistência do processo fermentativo. Se a temperatura tiver um aumento significativo, a atividade da levedura pode ser prejudicada, resultando na degradação de outros compostos orgânicos no vinho (Saerens *et al.*, 2008). Na qual a temperatura ideal para a fermentação da cachaça situa-se entre 28 e 34 °C Souza (2008).

3.8.2 Condições de produção e formação do mosto

É importante ressaltar que nas condições ideais de produção para o crescimento celular máximo podem não ser as mesmas para a produção de um produto metabólico específico em maior quantidade, como observado por Aiba *et al.* (1973). No caso do metabolismo das plantas, é conhecido que ele é predominantemente anaeróbico facultativo, ou seja, capaz de crescer tanto na ausência de oxigênio (fermentação) quanto na presença de oxigênio (respiração ou metabolismo oxidativo). Quando há a presença de oxigênio molecular devido

à aeração, ocorre uma mudança no metabolismo energético, da fermentação para a respiração aeróbica, como indicado por Reed e Pepler (1973).

As leveduras possuem compartimentos adaptados para diferentes atividades metabólicas. Enquanto a respiração, processo de metabolização do açúcar, ocorre nas mitocôndrias, a fermentação alcoólica, processo de glicólise anaeróbica, acontece no citoplasma. É importante observar que uma substância metabolizada de forma aeróbica promove um crescimento celular significativamente maior em comparação a uma substância metabolizada de forma anaeróbica, quando os microrganismos possuem a capacidade de prosperar em ambas as condições (aerobiose/anaerobiose) (Aiba *et al.*, 1973).

De fato, apenas algumas espécies, como a *Saccharomyces cerevisiae*, conhecida como uma levedura anaeróbia facultativa, são capazes de se proliferar em ritmo acelerado nessas condições. Geralmente se aceita que os anaeróbios facultativos possuem a capacidade de crescer em ambientes tanto anaeróbicos quanto aeróbicos, utilizando oxigênio ou outros compostos redutores derivado de processos anaeróbicos (Rodrigues *et al.*, 2006).

3.8.3 Agitação e aeração

Segundo Henick-Kling (1988), é necessário considerar o papel do oxigênio na regulação do metabolismo e crescimento das leveduras é crucial durante a preparação das culturas iniciais e no controle da fermentação alcoólica. Quando o oxigênio está presente, ocorre uma mudança no metabolismo das leveduras para a respiração aeróbica, resultando na produção de aproximadamente 38 moles de ATP por molécula de glicose. Isso possibilita um crescimento celular mais rápido, maior produção de biomassa e síntese de compostos de reserva, como ésteres e acetatos de graxo. Portanto, a aeração é utilizada na preparação das culturas iniciais quando se necessita de uma maior quantidade de biomassa.

De acordo com Aiba *et al.* (1973), os objetivos da aeração e agitação na fermentação são, primeiramente, fornecer oxigênio aos microrganismos e garantir a dispersão uniforme dos microrganismos por todo o meio fermentativo. Para evitar a formação de bolhas de ar e aumentar a turbulência do líquido, muitos fermentadores são equipados com dispositivos mecânicos de agitação,

enquanto outros fermentadores sem tais dispositivos também são utilizados.

De acordo com Schmidell (2001), uma cultura altamente eficiente é caracterizada por altas taxas de crescimento celular. Isso significa que há uma alta taxa de fixação de carbono, proporcionando uma abundância de elétrons para serem transportados ao longo da cadeia respiratória, resultando na produção de ATP. No entanto, é essencial manter um suprimento adequado de oxigênio para garantir que esses elétrons sejam devidamente oxidados no final da cadeia respiratória.

Contudo, conforme mencionado pelo mesmo autor, a situação é diferente quando se trata do oxigênio, uma vez que esse elemento apresenta baixa solubilidade em água. Quando o ar atmosférico é injetado até atingir a saturação, a uma pressão de 1 ATM e temperatura de 35 °C, a quantidade de oxigênio dissolvido é apenas cerca de 7 mg O₂/L (ou 7 ppm). Devido a essa limitação, é amplamente reconhecido que a capacidade de transferir oxigênio para a fase líquida é crucial para o sucesso de um processo aeróbico, especialmente em fases posteriores do processo, quando a concentração celular pode ser alta e altas concentrações de produto são necessárias (Schmidell e Facciotti, 2001).

É importante destacar que as soluções nutritivas utilizadas na fermentação sempre contêm diversas substâncias dissolvidas, o que faz com que a concentração de oxigênio no final da fermentação seja diferente daquela observada na água (Schmidell e Facciotti, 2001).

3.9 Destilação

Segundo Maia e Campelo (2005), depois do processo de fermentação, o líquido resultante, conhecido como mosto fermentado, é enviado para ser destilado em um alambique. Durante esse processo, o mosto é aquecido, o que gera vapores contendo uma maior concentração de componentes voláteis em relação ao restante do líquido. Esse procedimento resulta em um produto com um teor alcoólico entre 38% e 48%.

De acordo com Maia (1994), o processo de destilação, os compostos obtidos através da fermentação são separados no alambique com base em seus pontos de ebulição característicos. Durante essa separação, é importante ressaltar que as primeiras porções destiladas, chamadas de "cabeça", possuem

compostos mais voláteis que o álcool, incluindo uma maior concentração de metanol, que são desejados para a obtenção dos metabólitos adequados.

Durante a segunda etapa da destilação, chamada de "coração", é obtido o álcool etílico, onde possui uma ebulição de 78,5 °C. Essa fase é responsável por produzir a cachaça contendo um teor alcoólico de 38% e 48%. Na etapa final da destilação, conhecida como "cauda", são obtidos os compostos com menor valor volátil que o álcool etílico, incluindo os álcoois superiores. Essas substâncias devem continuar no vinho ou serem adicionadas em quantidades perceptíveis o suficiente para atribuir características distintas à bebida (Maia, 1994).

Durante o processo de aeração do vinho no alambique, os compostos sulfurados e os açúcares residuais presentes podem sofrer alterações químicas que afetam as características ideais da cachaça. Contendo açúcares residuais, também conhecidos como bagacilho, o vinho pode resultar na formação de compostos orgânicos devido ao aumento da temperatura e ao pH ácido do líquido. Esses compostos incluem celulose, hemicelulose e pectina, juntamente com outros açúcares do bagacilho. Conseqüentemente, ocorre a desidratação desses compostos, levando à formação de hidroximetilfurfural e furfural, respectivamente (Maia e Campelo, 2005).

Os compostos de enxofre presentes no vinho é decorrente da degradação de aminoácidos como metionina, cistina e citrulina, entre outros. A grande maioria desses compostos contém enxofre na forma de dissulfetos ou sulfato, sendo não voláteis. Por outro lado, uma pequena porção é representada pelo dióxido de enxofre e mercaptanos, que são voláteis. Durante o processo de destilação, o sulfatado é removido. A presença de cobre no alambique é satisfatória, estando dentro das concentrações ideais estipuladas pelas legislações brasileiras, pois catalisa a decomposição dos mercaptanos, líquidos voláteis que conferem à cachaça um odor aceitável, mesmo em baixas concentrações, além de reduzir sua presença na bebida destilada (Soratto *et al.*, 2007).

O etanol é o principal componente orgânico que fornece energia nas bebidas destiladas. Porém, durante a etapa de destilação, outros compostos secundários podem se formar quando o etanol reage com outras substâncias presentes. Esses compostos secundários são responsáveis pelos sabores distintos encontrados em diferentes tipos de bebidas destiladas, sendo

conhecidos como "sabor". As características da matéria-prima utilizada na fermentação desempenham um papel fundamental na natureza e proporção dos compostos secundários formados (Maia e Campelo, 2005)

3.9.1 Destilação do vinho

De acordo com Soratto (2007), A destilação é um processo que envolve o aquecimento do vinho fermentado, gerando vapores que são posteriormente condensados por resfriamento, resultando em etanol com elevado teor de purificação e concentração.

A destilação desempenha um papel crucial ao separar os compostos voláteis, como etanol, água, ácidos acéticos, metanol, ésteres, aldeídos e gás carboidrato, dos componentes voláteis ou não voláteis, como células de levedura, minerais orgânicos e inorgânicos. Um alambique adequado para a destilação de aguardente deve ser projetado especificamente para essa finalidade, podendo ser feito de cobre ou alumínio. Durante a etapa de destilação, é de extrema importância que o produtor monitore variáveis como pressão, temperatura e teor alcoólico do álcool destilado, pois esses fatores têm influência direta na evaporação dos compostos encontrados no mosto (Soratto, 2007).

Os pequenos produtores de cachaça e aguardente no Brasil utilizam principalmente alambiques para realizar o processo de destilação. Esse método produz diferentes frações, que podem ser categorizadas em "cabeça", "coração" e "cauda", de acordo com as definições propostas por Cardoso (2006):

- A cabeça é o destilado obtido nos primeiros segundos da destilação, representando aproximadamente 1% do volume total do vinho de alambique. Geralmente, possui um teor alcoólico superior a 65° GL;
- O coração é a destilação desejada, também conhecida como cachaça. Corresponde a cerca de 16% do volume total do vinho de alambique;
- A cauda, também conhecida como "água fraca", é a parte final mais fraca da destilação e corresponde a cerca de 3% do volume total do vinho.

De acordo com Pereira *et al.* (2003), os grandes produtores costumam utilizar colunas de destilação tradicionais para realizar a destilação contínua. Já

os pequenos e médios produtores optam por alambiques para realizar o processo de destilação. Observa-se que esses produtores geralmente não separam os parágrafos individuais do estilo. Alguns deles retiram uma pequena porção do processo de destilação, conhecida como "cabeça", enquanto uma minoria realiza uma destilação dupla.

Entretanto, o método de destilação dupla utilizado por esses produtores não é considerado o mais adequado em termos de qualidade do produto destilado. O processo inicia-se com a destilação dupla do vinho, como é comumente realizado nessas pequenas produções, para recuperar o etanol restante. Posteriormente, na segunda destilação, são realizados automaticamente os cortes seguintes: "cabeça", correspondente a 10% do volume destilado; "coração" ou aguardente, correspondente a 80% do volume destilado; e "cauda", correspondente a 10% do volume final do destilado (Pereira *et al.*, 2003).

A definição precisa do ponto do destilado é um requisito fundamental para uma produção de alta qualidade da cachaça. Nesse sentido, a experiência do °Brix do mosto e do teor alcoólico do vinho desempenham um papel extremamente relevante (Soratto, 2007).

3.9.2 Contribuição dos compostos secundários

Durante a destilação, o estágio da cauda é determinado pela temperatura dentro do alambique, que é influenciada pelos teores dos principais componentes presentes no mosto, como o etanol, com ponto de ebulição de 78,5 °C, e a água, com ponto de ebulição de 100 °C. A fervura do mosto inicia em torno de 90 °C e alcança 100°C apenas na fase final da destilação, indicando que o álcool etílico já foi separado e agora prevalece a temperatura de ebulição da água. No entanto, é importante mencionar que o gin recém-destilado contém componentes secundários com pontos de evaporação que variam de 20 a 300 °C em sua forma pura (Maia e Campelo, 2005).

De acordo com Maia e Campelo (2005), é importante observar que nem todos os componentes secundários da cachaça são voláteis, apesar de serem substâncias líquidas. Diversos componentes possuem pontos de evaporação mais elevados que os do etanol e da água. No entanto, alguns desses

componentes podem ser volatilizados junto com os primeiros vapores produzidos pelo mosto, mesmo quando a temperatura ainda está abaixo de seus pontos de evaporação.

Devido à sua baixa concentração, os componentes secundários da cachaça não interagem diretamente entre si, mas sim com a água e o etanol, que estão presentes em concentrações mais elevadas. Isso faz com que suas energias de ligação não predominem sobre as energias da água e do etanol, que são responsáveis pelos pontos individuais de evaporação de cada componente secundário. Substâncias oleosas, como álcoois de alto teor alcoólico, tendem a se comportar de maneira semelhante ao etanol devido às suas características similares (Maia e Campelo, 2005).

Segundo Bortoletto (2013), a presença dos componentes secundários nas frações conhecidas como "cabeça", "coração" e "cauda" é determinada pela temperatura de ebulição e pela compatibilidade com etanol e água, ou ambos. O autor classifica os compostos voláteis do vinho em cinco categorias durante a primeira destilação do vinho:

- Grupo 1: Composto por substâncias de baixo ponto de evaporação e solúveis em álcool, esses compostos são destilados primeiro. A maioria deles é separada no início da destilação e é encontrada em maior concentração nas frações iniciais de "cabeça" e "coração". Nesse grupo, estão incluídos o acetaldeído com ponto de ebulição de 21 °C e o acetato de etila com ponto de ebulição de 77 °C.
- Grupo 2: Composto por substâncias que são destiladas desde o início do processo, pois, mesmo possuindo um ponto de evaporação relativamente alto, são totalmente ou parcialmente solúveis em álcool. Esses compostos são separados desde o início da destilação até a parte intermediária do "coração". Entre os compostos desse grupo, estão o caprilato de etila com ponto de ebulição de 208 °C, o caprato de etila com ponto de ebulição de 244 °C, o laurato de etila com ponto de ebulição de 269 °C, o caproato de etila com ponto de ebulição de 166,5 °C e o acetato de isoamila com ponto de ebulição de 137,5 °C, que são considerados ésteres gordurosos.
- Grupo 3: Os compostos pertencentes a esse grupo são encontrados nas frações "cabeça" e "coração" devido ao seu baixo ponto de evaporação (inferior a 200°C) e solubilidade em álcool e, ao mesmo tempo, em água.

Exemplos desses compostos incluem os álcoois superiores 1-propanol, isobutanol, 2-metilbutanol e 3-metilbutanol, bem como o metanol com ponto de ebulição de 65,5 °C.

- Grupo 4: Os compostos desse grupo são destilados durante a extração da parte intermediária do "coração", pois possuem pontos de evaporação mais elevados que o da água e são totalmente ou parcialmente solúveis nela. Exemplos desses compostos incluem o ácido acético, 2-fenil-etanol, etil lactato e dietila sacarose, com ponto de ebulição de 110 °C.
- Grupo 5: Esses componentes possuem alto ponto de evaporação e são altamente solúveis em água, iniciando a destilação na metade da fase do "coração". Nesse grupo, inclui-se o furfural com ponto de ebulição de 167 °C, cuja concentração aumenta nessa parte do processo de destilação.

Segundo Bortoletto (2013), enfatiza que essa classificação em cinco grupos se aplica à destilação primária, mas o comportamento dos compostos secundários se modifica na segunda destilação, conhecida como brouillis ou vinhos baixos, devido à concentração mais elevada de álcool no líquido a ser destilado.

De acordo com Maia e Campelo (2005), os compostos secundários, possuem afinidades semelhantes tanto com o etanol quanto com a água, o que resulta em uma volatilização equilibrada ao longo de todo o processo de destilação, gerando um perfil de evaporação semelhante ao do etanol. No entanto, certos compostos úteis, como o ácido acético, que é um dos principais responsáveis pela acidez volátil, são volatilizados principalmente na etapa final da destilação. Isso ocorre devido à maior afinidade do ácido acético com a água, devido à sua natureza hidrofílica. Como resultado, apenas 1% da acidez volátil do vinho fica na cachaça, enquanto a maior parte permanece no vinhoto.

3.10 Armazenamento e envelhecimento

De acordo com o INMETRO (2005), a fim de impedir a contaminação, é necessário armazenar a cachaça em recipientes feitos de madeira, metal inerte ou alumínio carbono que se encontre internamente vedado. Além disso, as áreas de armazenamento devem estar em conformidade com a legislação atual, que estabelece regulamentos quanto aos padrões de temperatura e umidade, entre

outros aspectos.

De acordo com Maia e Campelo (2005), o processo de maturação da cachaça consiste em armazená-la em barris de madeira por um período de três meses a 1 ano. Durante esse intervalo, ocorre a liberação dos álcoois resultantes da fermentação, os quais são os principais responsáveis pelo aroma intenso que podem provocar irritação na mucosa nasal, mesmo quando dentro dos limites legais.

De acordo com Maia e Campelo (2005), as características da cachaça podem sofrer modificações ao longo do tempo devido às condições de armazenamento e a composição dos tonéis ou barris utilizados. Os recipientes de armazenamento têm o poder de influenciar a bebida de diversas formas: removendo substâncias por meio de evaporação, adsorção ou interação com a madeira; acrescentando elementos provenientes da madeira à cachaça. Para se obter o resultado desejado, geralmente são necessários longos períodos de armazenamento, variando de um a três anos.

Segundo Parazzi *et al.* (2008), a umidade e a temperatura do local de armazenamento exercem um forte impacto no processo de maturação da cachaça, uma vez que os tonéis envelhecem como uma membrana semipermeável, permitindo a passagem de água e álcool. Essa condição afeta o volume, cor, aroma, teor alcoólico e compostos secundários da bebida destilada.

Segundo Maia e Campelo (2005), durante o processo de envelhecimento da cachaça, ocorrem diversas transformações químicas, físicas e sensoriais. Isso inclui interações entre os componentes do processo de destilação, como o etanol e o oxigênio atmosférico, a oxidação dos álcoois, a quebra de lignina, hemicelulose e celulose em monômeros solúveis conhecidos como compostos fenólicos, e interações entre os produtores de cachaça. O tempo de armazenamento desempenha um papel crucial na qualidade final do destilado, podendo melhorar sua qualidade e aceitação (Parazzi *et al.*, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta das amostras

Inicialmente, avaliou-se seis amostras de cepas de leveduras fermentativas de *Saccharomyces cerevisiae*, retiradas das dornas fermentativas nas agroindústrias de cachaça de alambique. Sendo uma localizada, em uma cidade da região norte do estado, uma ao centro-oeste, duas ao sul e duas ao leste do estado do Maranhão.

Para este estudo, foram obtidas amostras de mosto em recipientes de vidro esterilizados e devidamente identificados, denominados CA1, CA2, CA3, CA4, CA5 e CA6, respectivamente, uma amostra de cada agroindústria. Os recipientes foram submersos nas dornas, onde foram coletados aproximadamente 250 ml de mosto. Posteriormente, os frascos foram mantidos em gelo, transportados para o laboratório e posteriormente processados.

Os produtores forneceram amostras de cachaça destiladas nos alambiques, provenientes dos mostos fermentativos, inicialmente coletados das dornas de fermentação das amostras CA1, CA2, CA3, CA4, CA5 e CA6, e devidamente identificados, correspondetes, aqui nesse estudo de MC1, MC2, MC3, MC4, MC5 e MC6. As análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Cereais e Bebidas do Centro de Ciências Sociais, Saúde e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, situado na cidade de Imperatriz – MA (Figura 2).

Figura 2. Imagem do laboratório de pesquisa da Universidade Federal do Maranhão – UFMA, em pesquisa em andamento



Fonte: Autoria própria, 2023

4.2 Meios de cultura

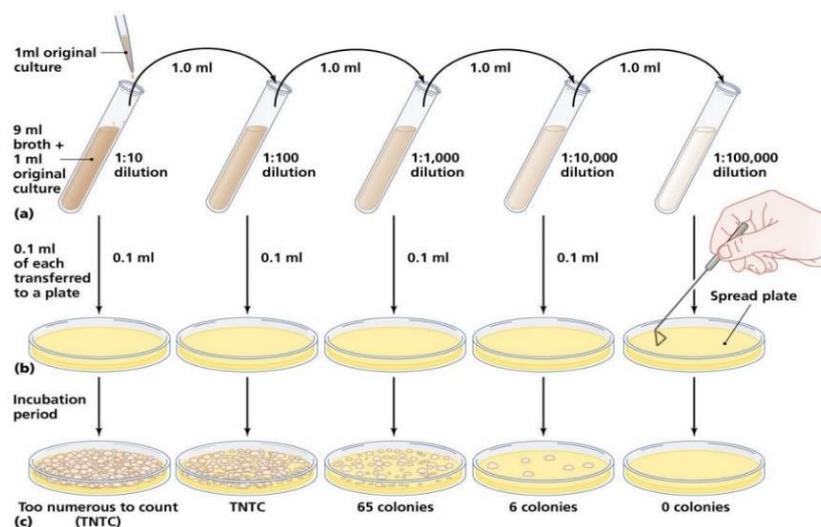
Para a realização dos experimentos, foi utilizado o meio de cultura Yeast Peptone Dextrose (YPD), extrato de levedura 0,1%, peptona 0,5%, ágar 2%, glicose 2%. Durante o processo de plaqueamento, adicionou-se 100 µg/ml do antibiótico ampicilina, no intuito de evitar contaminação bacteriana, conforme descrito por Pacheco (2010). Na realização dos experimentos, foi utilizado reagentes de grau analítico.

Na produção de cachaça de alambique, as agroindústrias onde foram recolhidas as amostras, utilizam um bactericida comercializado, colocando uma vez por semana, no Pé-de-Cuba, 5g para cada dorna de 1000L, em seguida lavam as paredes das dornas e esperam o fermento decantar, para em seguida retirarem a água da dorna.

4.2.1 Isolamento das leveduras

Conforme metodologia aplicada por Oliveira *et al.* (2005), o isolamento das leveduras foi realizado, colocando as amostras de mosto em uma diluição seriada em água peptonada (1:100; 1:1000; 1:10000; 1:100000), conforme Figura 3. Utilizando alíquotas de 250 µl para inocular, em triplicata, placas de Petri grandes contendo o meio de cultura Yeast Peptone Dextrose (YPD) 2% e ampicilina.

Figura 3. Método de plaqueamento em superfície



Fonte: Guidini (2013)

No total, foram encontradas cerca de 200 colônias de leveduras em todas as amostras. Essas colônias foram então transferidas para placas contendo YPD usando o método "replica plating" e incubadas a 30°C por 48 horas.

4.3 Análises bioquímicas para caracterização taxonômica das leveduras

Nas análises bioquímicas para identificação das leveduras, foi utilizada a metodologia aplicada por Oliveira *et al.* (2005), onde as leveduras isoladas passaram por análises bioquímicas para avaliar a reprodução em diversas fontes de carbono e a assimilação de nitrogênio. Depois da etapa de crescimento em YPD 2%, as leveduras foram colocadas no meio de cultura Yeast Carbon Base (DIFCO Laboratories) que continha a fonte de nitrogênio para realização do teste, além do meio YPD 2% para manter o meio, e incubadas por 48 horas a 30°C. A partir desses testes, foram selecionadas as leveduras que apresentaram características semelhantes com a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando a metodologia desenvolvida por Vaughan-Martini (1983). Essas leveduras selecionadas foram então submetidas a outras análises para avaliar e assimilar diferentes fontes de carbono.

4.4 Análises de seleção das leveduras em escala piloto

Foi adotada a metodologia descrita por Gonçalves *et al.* (2019) em escala piloto para selecionar as leveduras utilizadas na produção de cachaça de alambique.

Inicialmente, as diferentes cepas foram submetidas a quatro estágios de reprodução celular (A1, A2, A3 e A4), no qual o °Brix alcançado por cada cepa foi avaliado ao final do estágio A4 (Tabela 4). Após a conclusão deste estágio, as cepas selecionadas foram então submetidas aos estágios de fermentação FP1 e FP2, nos quais foram avaliados o tempo necessário para redução do °Brix no estágio FP1 e o tempo total de fermentação no estágio FP2 (Tabela 5). Dessa forma, as cepas que demonstraram os resultados mais satisfatórios durante o estágio de reprodução e nos estágios de fermentação foram consideradas adequadas para a produção de cachaça (Gonçalves *et al.*, 2019).

Figura 4. Incubadora Shaker de Laboratório com movimento orbital - NT712



Fonte: Autoria própria (2023)

As análises de seleção das leveduras foram executadas em triplicata, seguindo a metodologia proposta neste trabalho.

De acordo com Maia e Campelo (2005), a seleção das cepas depois da etapa da escala piloto, com potencial para a fabricação de cachaça, foi baseada na redução dos açúcares na etapa de reprodução celular e fermentação do caldo de cana, assim como na duração da fermentação. Estabeleceu-se o critério de que quanto menor o tempo de redução dos açúcares na etapa da reprodução celular para aumentar a biomassa celular e na etapa da fermentação do caldo de cana para a produção de etanol, menor seria o tempo de fermentação e maior seria a produção. Neste contexto, produtividade se refere à velocidade de produção de etanol ao fim da fermentação. Além disso, quanto menos tempo for necessário para atingir 0°Brix, maior seria a produtividade da fermentação.

4.4.1 Multiplicação das leveduras testadas em escala piloto

Seguindo a metodologia aplicada por Maia e Campelo (2005), as leveduras destinadas à produção de cachaça foram inoculadas em meio sólido YPD 2% e incubadas com uma temperatura de 30°C por um período de 48 horas. Em seguida, cada cepa foi inoculada individualmente, transferindo-se quatro alíquotas contendo culturas puras para cada um dos três frascos Erlenmeyer de

250 ml. Esses frascos continham 100 ml de caldo de cana com 5 °Brix (etapa A1).

Em seguida, se iniciou as três etapas seguintes (A2, A3 e A4) de reprodução das leveduras, conforme apresentado na Tabela 4. Na etapa A2, foram utilizados três recipientes Erlenmeyer de 250 ml cada. Na etapa A3, foram utilizados três frascos de 500 ml cada, e na etapa A4, também foram utilizados três frascos de 500 ml de capacidade. Todos os frascos Erlenmeyer foram incubados em uma temperatura de 28 °C por um período de 24 horas, sob agitação constante de 150 rpm, utilizando uma incubadora shaker de laboratório com movimento orbital (NT712).

Para cada etapa, foram utilizados três frascos Erlenmeyer que foram preenchidos com caldo estéril de cana-de-açúcar (previamente esterilizado a 90°C por 15 minutos). Na etapa A1, cada frasco continha 100 ml de caldo de cana com 5 °Brix. Os frascos da etapa A2 possuíam 100 ml de caldo de cana com 7 °Brix, enquanto os da etapa A3 continham 100 ml de caldo de cana com 9 °Brix. Os frascos da etapa A4 continham 100 ml de caldo de cana com 12 °Brix. Cada etapa foi incubada em uma incubadora tipo shaker a uma velocidade de agitação constante de 150 rpm, com uma temperatura de 30 °C, pelo período de 24 horas, conforme apresentado na Tabela 4 a seguir.

Tabela 4. Etapas de multiplicação (A1 a A4).

Etapas	A1	A2	A3	A4
Volume / °Brix	Inoculado + 100 ml / 5 °Brix	100 ml de P1 + 100 ml / 7 °Brix	200 ml de P2 + 100 ml / 9 °Brix	300 ml de P3 + 100 ml / 12 °Brix
Volume total	100 ml	200 ml	300 ml	400 ml
Incubação	30 °C e 150 rpm / 24h	30 °C e 150 rpm / 24h	30 °C e 150 rpm / 24h	30 °C e 150 rpm / 24h

Fonte: Gonçalves et. al., 2019

Após 24 horas, foram realizadas transferências assépticas do volume de um recipiente Erlenmeyer para o recipiente Erlenmeyer da etapa seguinte, refazendo esse processo para todos os recipientes em cada etapa. Na última Etapa A4, somando todos os volumes dos quatro recipientes Erlenmeyer,

obteve-se um volume total de 400 ml de inóculo.

Na etapa de multiplicação (A1 até A4), o critério de seleção adotado para avaliar o sucesso da multiplicação das leveduras testadas foi baseado no °Brix alcançado ao finalizando a etapa A4. Foi considerado um desempenho satisfatório quando o valor medido de °Brix foi igual ou inferior a 4,8 (valor de referência).

O valor teórico de referência de 4,8 °Brix é obtido calculando-se a metade do valor teórico de 9,6 °Brix, que é obtido somando-se os volumes das etapas A1 (5 °Brix) até A4 (12 °Brix) da multiplicação, sem incubação e sem inoculação de leveduras, de acordo com a metodologia utilizado por Cardoso (2006).

Neste estudo, foi estabelecido o valor de 4,8 °Brix (metade do valor teórico de 9,6 °Brix) para o parâmetro de referência, onde foi avaliado o desempenho adequado ao final da etapa de reprodução. Essa escolha foi baseada nos estudos apontados por Cardoso (2006), na expectativa de que as cepas, ao se desenvolverem, utilizam seu metabolismo para consumir açúcar e oxigênio, resultando no aumento da biomassa celular e, conseqüentemente, na redução do valor de °Brix ao final da etapa A4. O objetivo era alcançar um valor de °Brix inferior a 9,6 °Brix (valor teórico sem fermentação). Portanto, neste estudo, o valor de referência de 4,8 °Brix foi estabelecido como indicativo de um desempenho excelente no final da etapa A4 de reprodução.

4.4.2 Etapa da fermentação em escala piloto

Depois de um período de 24 horas de crescimento na etapa A4, o inóculo de 400 ml foi repassado para um frasco Erlenmeyer com capacidade de 1000 ml. Em seguida, adicionou-se 250 ml de caldo com 13 °Brix, que passou por um processo de pasteurização prévia (70 °C/15s), seguido de resfriamento até atingir 32 °C. Essa etapa é conhecida como FP1.

Quando o °Brix da etapa FP1 atingia a metade do valor inicial ou completava 24 horas, adicionava-se mais 250 ml de caldo de cana a 15 °Brix, previamente aquecido a 30 °C, sem passar pelo processo de pasteurização. Essa segunda etapa recebeu o nome de FP2, na qual as cepas analisadas permaneceram até que o °Brix chegasse a zero, como indicado na Tabela 5.

Tabela 5. Etapas da fermentação (FP1 e FP2).

Etapas	FP1	FP2
Volume / °Brix	400 mL de A4 +250 ml / 13 °Brix	650 mL de FP1 + 250 ml / 15 °Brix
Volume	650 ml	900 ml

Fonte: Autoria própria (2023)

Seguindo a metodologia aplicada por Cardoso (2006), apenas as leveduras que conseguiram se multiplicar e fermentar de maneira adequada em um período de seis dias foram consideradas aptas para serem utilizadas como inóculos iniciadores na produção de cachaça de alambique. Essas leveduras foram selecionadas com base em critérios como atingir um °Brix abaixo de 4,8 °Brix no final da etapa de multiplicação, apresentar aroma agradável e ter um tempo de fermentação igual ou inferior a 24 horas. O período de seis dias foi estabelecido levando em consideração as etapas planejadas para o processo de multiplicação e fermentação do caldo de cana, com o objetivo de produzir cachaça. Além de servir como uma referência para o procedimento, esse período também foi um parâmetro importante para identificar as leveduras iniciadoras mais eficientes no processo de fermentação.

O teor de sólidos solúveis totais (°Brix) do caldo de cana-de-açúcar utilizado nessa pesquisa foi avaliado utilizando um refratômetro digital de análise Brix em alimentos, modelo Hanna - HI96801.

4.5 Análise de floculação

As cepas de leveduras selecionadas e isoladas foram cultivadas em meio de cultura sólida YPD 2% e mantidas a uma temperatura de 30°C por 48 horas. Em seguida, as leveduras foram cultivadas em um tubo de ensaio contendo 4 ml de YP, adicionado de 2% de glicose. Os tubos de ensaio foram posicionados em uma incubadora de laboratório com movimento orbital (modelo NT712) a uma temperatura de 28 °C e agitados a 150 rpm por 24 horas. Após esse período, a floculação foi avaliada visualmente, utilizando os métodos descritos por Verstrepén *et al.* (2001).

4.6 Análises de tolerância aos tipos de estresses

4.6.1 Análise de Tolerância à temperatura

As leveduras que demonstraram resistência a concentrações mais altas de etanol no análises anteriores foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura YPD 2% com uma concentração suportada de etanol. Em seguida, as placas foram incubadas a 30°C e 37°C por 48 horas, seguindo a metodologia adotado por Verstrepen *et al.* (2001).

4.6.2 Análise de tolerância ao álcool

As cepas de leveduras foram cultivadas em meio de cultura sólida YPD 2% e mantidas a 30°C por 48 horas. Após o crescimento, as leveduras foram transferidas usando o método de replica plating para placas contendo meio YPD 2% com diferentes concentrações de etanol (10%, 15% e 20%). As placas foram incubadas a 30°C por mais 48 horas, adotando a metodologia adotado por Verstrepen *et al.* (2001).

4.6.3 Acidez total do mosto de fermentação e do vinho

Foi realizado nas amostras a acidez total avaliada por titulometria, com hidróxido de sódio 0,025 mol.L⁻¹, de acordo ABNT (1997).

4.7 Análises do destilado - Cachaça

As cachaças produzidas por cada produtor foram submetidas a análises de acordo com os padrões de Identidade e Qualidade estabelecidos na Portaria Nº 539, de 26 de dezembro de 2022, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Essas análises foram realizadas no Laboratório de Traços Metálicos e Ensaios Orgânicos, localizado no Instituto SENAI de Tecnologia em Química, na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais.

4.8 Análises estatística dos resultados

Para comparar o mosto fermentado em sólidos totais durante as etapas entre as amostras e de acordo com o tempo, foram realizados Modelos de Equações de Estimação Generalizadas (GEE). As comparações significativamente diferentes a 5% seguiram para o teste de Bonferroni. O modelo GEE foi proposto por Zeger e Liang (1986), sendo adequado para respostas contínuas e medidas repetidas, refletindo a relação entre respostas variáveis e independentes, considerando a correlação entre as medidas em cada momento de tempo (Costa et al., 2017).

Para comparar a floculação entre os grupos, foi realizado o teste de qui-quadrado. Todas as análises foram realizadas no programa IBM SPSS (IBM SPSS Statistics, 2016) a 5% de significância.

5 RESULTADOS e DISCUSSÕES

5.1 Seleção das leveduras

A seguir, nas tabelas 6, 7, 8 e 9, estão apresentados os resultados de °Brix obtidos pelas cepas analisadas durante as etapas de A1 a A4 do processo de multiplicação.

Tabela 6. Análise do mosto fermentado em sólidos totais durante a etapa de A1 de multiplicação (30 °C, 150 rpm / 24h)

Amostra	° Brix					<i>p</i> -valor
	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h	
CA1	5,00A	4,20B	2,57C	1,50Da	0,27Eb	<0,001
CA2	5,00A	4,33B	2,40C	1,60Da	0,53Ea	<0,001
CA3	5,00A	4,47B	2,50C	1,50Da	0,33Eb	<0,001
CA4	5,00A	4,43B	2,77C	1,60Da	0,67Ea	<0,001
CA5	5,00A	4,50B	2,60C	1,70Da	0,73Ea	<0,001
CA6	5,00A	4,23B	2,20C	1,17Db	0,17Ec	<0,001
<i>p</i> -valor	1,00	0,82	0,65	0,04	0,02	

Letras minúsculas diferentes indicam contrastes entre as médias dos grupos dentro de um determinado tempo, e letras maiúsculas distintas mostram diferenças com o passar do tempo, pelo teste Bonferroni a 5% de significância.

Fonte: Autoria própria (2023)

Tabela 7. Análise do mosto fermentado em sólidos totais durante a etapa de A2 de multiplicação (30 °C, 150 rpm / 24h).

Amostra	° Brix					<i>p</i> -valor
	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h	
CA1	7,00A	5,57B	3,57C	1,53Db	0,13Ec	<0,001
CA2	7,00A	5,97B	3,97C	1,93Da	0,67Eb	<0,001
CA3	7,00A	5,87B	3,87C	1,57Db	0,27Ec	<0,001
CA4	7,00A	6,03B	4,27C	2,03Da	1,13Ea	<0,001
CA5	7,00A	5,87B	3,77C	1,67Dab	0,07Ec	<0,001
CA6	7,00A	5,73B	3,53C	1,20Dc	0,13Ec	<0,001
<i>p</i> -valor	1,00	0,74	0,23	0,03	0,01	

Letras minúsculas diferentes indicam contrastes entre as médias dos grupos dentro de um determinado tempo, e letras maiúsculas distintas mostram diferenças com o passar do tempo, pelo teste Bonferroni a 5% de significância.

Fonte: Autoria própria (2023)

Tabela 8. Análise do mosto fermentado em sólidos totais durante a etapa de A3 de multiplicação (30 °C, 150 rpm / 24h).

Amostra	° Brix					<i>p</i> -valor
	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h	
CA1	9,00A	7,07B	4,77C	1,63Dab	0,13Ec	<0,001
CA2	9,00A	7,47B	5,17C	2,03Da	0,67Eb	<0,001
CA3	9,00A	7,37B	5,07C	1,67Dab	0,27Ec	<0,001
CA4	9,00A	7,53B	5,47C	2,13Da	1,13Ea	<0,001
CA5	9,00A	7,37B	4,97C	1,77Da	0,07Ec	<0,001
CA6	9,00A	7,23B	4,73C	1,30Db	0,13Ec	<0,001
<i>p</i> -valor	1,00	0,85	0,56	0,02	0,001	

Letras minúsculas diferentes indicam contrastes entre as médias dos grupos dentro de um determinado tempo, e letras maiúsculas distintas mostram diferenças com o passar do tempo, pelo teste Bonferroni a 5% de significância.

Fonte: Autoria própria (2023)

Tabela 9. Análise do mosto fermentado em sólidos totais durante a etapa de A4 de multiplicação (30 °C, 150 rpm / 24h)

Amostra	° Brix					p-valor
	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h	
CA1	12,00A	8,47B	5,67C	1,73Da	0,07Ed	<0,001
CA2	12,00A	8,87B	6,07C	2,13Da	0,67Eb	<0,001
CA3	12,00A	8,77B	5,97C	1,77Da	0,23Ec	<0,001
CA4	12,00A	8,93B	6,37C	2,23Da	1,07Ea	<0,001
CA5	12,00A	8,77B	5,87C	1,87Da	0,07Ed	<0,001
CA6	12,00A	8,63B	5,63C	1,40Db	0,07Ed	<0,001
p-valor	1,00	0,89	0,25	0,03	0,001	

Letras minúsculas diferentes indicam contrastes entre as médias dos grupos dentro de um determinado tempo, e letras maiúsculas distintas mostram diferenças com o passar do tempo, pelo teste Bonferroni a 5% de significância.

Fonte: Autoria própria (2023)

Com base nas análises de °Brix realizadas durante a fase de multiplicação das leveduras, nas etapas A1 a A4, onde foi possível realizar comparação com os resultados obtidos por Gonçalves (2019), foi observado que todas as cepas foram capazes de se multiplicar e fermentar adequadamente em um período de quatro dias. Isso implica que elas alcançaram um °Brix abaixo de 4,8 ao término da etapa de reprodução, ao mesmo tempo em que exibiram uma fermentação com tempo igual ou inferior a 24 horas, com aroma agradável. Entre as cepas testadas, as amostras CA1, CA5 e CA6 mostraram maiores reduções no °Brix em um tempo menor, enquanto as cepas das amostras CA2 e CA4 tiveram um tempo maior para redução do °Brix. Com base nos resultados obtidos, as amostras foram consideradas adequadas na utilização de possíveis inóculos selecionados para a fabricação de cachaça de alambique.

Após a conclusão das etapas de A1 a A4 do processo de multiplicação, as cepas analisadas foram submetidas às etapas de fermentação FP1 e FP2. Na etapa FP1, foi avaliado o tempo necessário para a redução do °Brix da fermentação, como demonstrado na Tabela 10. Já na etapa FP2, foi registrado

o tempo total decorrido para completar a fermentação, conforme ilustrado na Tabela 11.

Tabela 10. Valores médios de sólidos totais do mosto fermentado das leveduras ao longo das etapas de fermentação FP1 (caldo-de-cana pasteurizado por 24h à 13 °Brix,)

AMOSTRA	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h	p-valor
CA1	13,00A	10,07B	6,53C	1,93Dab	0,27Ec	<0,001
CA2	13,00A	10,47B	7,07C	2,37Da	1,13Ea	<0,001
CA3	13,00A	10,13B	6,67C	1,67Db	0,70Eb	<0,001
CA4	13,00A	10,53B	7,13C	2,27Da	1,23Ea	<0,001
CA5	13,00A	9,83B	6,27C	1,53Db	0,07Ed	<0,001
CA6	13,00A	9,80B	6,27C	1,50Db	0,03Ed	<0,001
p-valor	1,00	0,56	0,11	0,02	0,002	

Letras minúsculas diferentes indicam contrastes entre as médias dos grupos dentro de um determinado tempo, e letras maiúsculas distintas mostram diferenças com o passar do tempo, pelo teste Bonferroni a 5% de significância.

Fonte: Autoria própria (2023)

Tabela 11. Valores médios de sólidos totais do mosto fermentado das leveduras ao longo das etapas de fermentação FP2 (caldo-de-cana pasteurizado por 24h à 15 °Brix,).

Tempo	CA1	CA2	CA3	CA4	CA5	CA6	p-valor
0	15,00A	15,00A	15,00A	15,00A	15,00A	15,00A	1,00
6	11,57B	13,53A	11,87B	13,67B	11,87B	11,73B	0,23
12	7,43C	8,47B	7,77C	9,57C	7,67C	5,77C	0,08
18	2,47Dc	4,27Cb	3,97Db	5,33Da	2,07Dc	1,47Dc	0,02
24	1,20Ec	3,50Ca	3,07Dab	3,97Ea	0,07Ed	0,10Ed	0,001
30	0,13Fc	2,40Db	0,07Ec	3,37Ea	0,00Fd	0,00Fd	<0,001
36	0,00Gb	2,00Da	0,00Fb	2,50Fa	0,00Fb	0,00Fb	<0,001
42	0,00Gb	1,47Ea	0,00Fb	1,67Fa	0,00Fb	0,00Fb	<0,001
48	0,00Gc	0,77Fb	0,00Fc	1,10Ga	0,00Fc	0,00Fc	<0,001
54	0,00Gc	0,20Gb	0,00Fc	0,43Ha	0,00Fc	0,00Fc	<0,001
p-valor	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

Letras minúsculas diferentes indicam contrastes entre as médias dos grupos dentro de um determinado tempo, e letras maiúsculas distintas mostram diferenças com o passar do tempo, pelo teste Bonferroni a 5% de significância.

Fonte: Autoria própria (2023)

Entre as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas e testadas das amostras, somente as cepas das amostras CA5 e CA6 foram capazes de concluir etapa da fermentação no período de seis dias, incluindo as etapas de multiplicação e fermentação, comparando-se com os resultados obtidos por Gonçalves (2019).

Dentre essas cepas, as cepas da amostra CA6 se destacaram por apresentarem a redução de °Brix mais rápidas durante o menor tempo observado, obtendo resultados semelhantes encontrados em Gonçalves (2019). Em relação às outras cepas testadas, foi observado que a etapa da fermentação do caldo de cana-de-açúcar foi concluída no sétimo dia, com exceção das cepas da amostra CA2, que atingiram um °Brix nulo (zerado) no oitavo dia. As cepas da amostra CA4, por sua vez, finalizaram o processo de fermentação após o oitavo dia de testes.

Nesta pesquisa, foi estabelecido um período de seis dias para a observação das cepas durante as etapas de reprodução e fermentação do caldo de cana-de-açúcar. Esse modelo foi adotado por ser considerado um importante método para acelerar a adaptação das cepas ao processo de testes. Estudos anteriores, realizados por Vieira (2011), também respaldam a importância desse período de observação para a seleção das cepas adequadas.

Segundo Martins (2013), durante as etapas de fermentação, as células de levedura enfrentam diversas mudanças ambientais, como variações nos nutrientes, pH, temperatura, pressão, concentração de etanol e oxigênio, entre outras. Essas condições ambientais desafiam as leveduras a desenvolver respostas adaptativas para garantir sua sobrevivência.

Dada a origem das linhagens estudadas e as condições assépticas controladas de temperatura e agitação nas etapas A1 a A4, era esperado que a maioria das leveduras apresentasse um crescimento semelhante no final da etapa A4, com valores próximos de °Brix entre elas, obtendo resultados semelhantes aos de Martins (2013). Entretanto, as cepas da amostra CA6 demonstram um importante desempenho, com uma redução do °Brix para 1,4 °Brix na etapa FP1 após 18 horas, chegando a 0 °Brix em 24 horas. Por outro lado, as outras cepas das amostras, apresentaram uma redução nas concentrações de sólidos solúveis totais acima de 1 °Brix após o período de 24 horas (Tabela 10).

Na etapa FP2 as cepas da amostra CA6 foram capazes de reduzirem em 1,2 °Brix ao completar as 18 horas de fermentação, chegando a 0 °Brix em 24 horas. Isso demonstra um bom desempenho nessa etapa. As cepas da amostra CA5, também atingiram 0 °Brix em um período de 24 horas, embora levou mais tempo em comparação com as cepas da amostra CA6. No entanto, as demais cepas avaliadas não foram capazes de atingir um °Brix de zero na etapa FP2 dentro de 24 horas. No entanto, as cepas da amostra CA1 e CA3 foram capazes de alcançar esse resultado após 30 horas.

O objetivo das etapas de fermentação FP1 e FP2 foi criar um ambiente semelhante ao processo de produção de cachaça, a fim de identificar uma levedura capaz de se adaptar rapidamente a um meio não estéril.

De acordo com Bosqueiro (2010), é possível determinar se uma fermentação ocorreu com sucesso com base na formação de uma espuma fina e um aroma agradável, provenientes dos compostos secundários gerados durante o processo. Por outro lado, um aroma desagradável pode indicar possível contaminação na fermentação. Ao analisar os resultados deste estudo, observou-se que as cepas da amostra CA6 apresentaram uma fermentação com aroma agradável em menos de 24 horas nas etapas FP1 e FP2 do processo fermentativo.

Foi observado que as leveduras da amostra CA2 e CA4 (que não tiveram sucesso na fermentação) apresentaram um aroma desagradável, semelhante a ovo apodrecido, possivelmente devido à produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S). Esse aroma também foi notado na fase de multiplicação. Por outro lado, as cepas da amostra CA6 apresentaram um aroma agradável tanto na fase de multiplicação quanto na fermentação. Conforme define Zuppardo (2010), o sulfeto de hidrogênio (H₂S), que possui um odor desagradável, é formado devido ao metabolismo das leveduras.

A temperatura é um fator de grande importância a ser considerado, já que pode ter influência nas atividades metabólicas dos microorganismos (Braga, 2006). No processo de fermentação realizado pelas cepas da amostra CA6, nas etapas FP1 e FP2, a dorna foi mantida a uma temperatura de 32°C. De forma geral, as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* são capazes de crescer em uma faixa de temperatura que varia de 10°C a 40°C, sendo que a faixa mais adequada geralmente se encontra entre 26°C e 35°C (Vieira, 2011).

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas neste estudo foram todas provenientes de dornas de fermentação de cachaça artesanal. Foi levado em consideração o desempenho na utilização dos açúcares presentes no mosto durante as etapas de multiplicação e fermentação como critério de pré-seleção para determinar quais cepas seriam adequadas para fermentar o caldo de cana. Com base nessa análise, as cepas das amostras CA5 e CA6 foram escolhidas como as leveduras ideais para os ensaios da cultura iniciadora do processo fermentativo na produção de cachaça.

5.2 Floculação

As leveduras que possuem características de floculação despertam grande interesse na produção de bebidas devido a questões práticas e econômicas (Verstrepen *et al.*, 2003). Assim, as cepas de leveduras das amostras CA1, CA2, CA3, CA4, CA5 e CA6 foram submetidas a um teste de floculação espontânea. Essas cepas foram inoculadas em tubos contendo 4 ml de meio YP com 2% de glicose e mantidas em incubação a 28 °C por 24 horas, com agitação de 150 rpm. Após esse período, a floculação foi avaliada visualmente, seguindo os métodos descritos por Verstrepen *et al.* (2001). Das leveduras analisadas podemos observar que as cepas das amostras CA1, CA3, CA5 e CA6, apresentaram um perfil de floculação. Já as cepas de leveduras da amostra CA2 e CA4, demonstraram ser não floculantes, como mostrado na próxima Tabela 12.

Tabela 12. Resultado das análises de floculação em meio a YP 2% de glicose entre as amostras

Amostras	Floculação				
	Não		Sim		<i>p</i> -valor
	N	%	n	%	
CA1	0	0,0	3	100,0	0,04
CA2	2	66,7	1	33,3	
CA3	1	33,3	2	66,7	
CA4	3	100,0	0	0,0	
CA5	0	0,0	3	100,0	
CA6	0	0,0	3	100,0	

Teste de Qui-quadrado

Fonte: Autoria própria (2023)

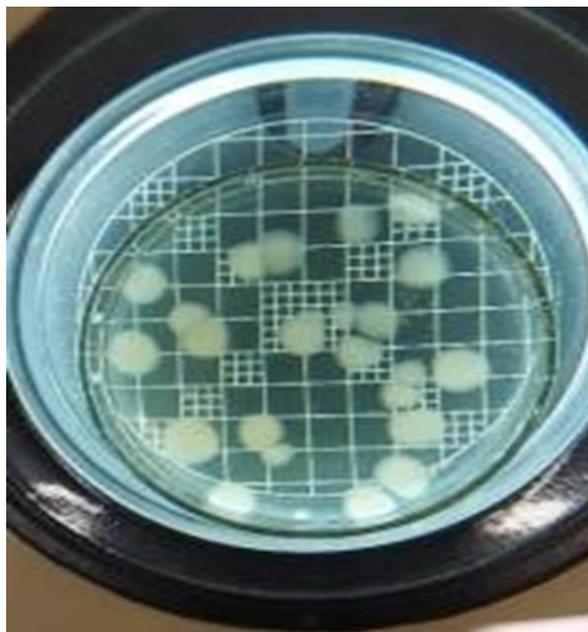
5.3 Tolerância a temperaturas elevadas e etanol

Segundo Bortoletto (2013), é comum que a fermentação de caldo de cana ocorra sob altas temperaturas, o que, por sua vez, conduz a formação de elevadas concentrações de etanol. Essa característica permite que ocorra diversidade de *Saccharomyces cerevisiae* nas cepas observadas, de tal forma que é possível que a temperatura e o nível de concentração de etanol possam ser utilizados nos critérios na escolha de cepas.

Nesse sentido, para este trabalho, foram selecionadas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* consideradas como mais resistentes aos fatores de estresse descritos. Avaliou-se o fenótipo das cepas de leveduras de cada cachaçaria submetidas. Estas que foram testadas quanto ao seu crescimento a partir de diferentes níveis de etanol, sendo eles 10%, 15% e 20%, sendo que todos foram submetidos a mesma temperatura de 30 °C.

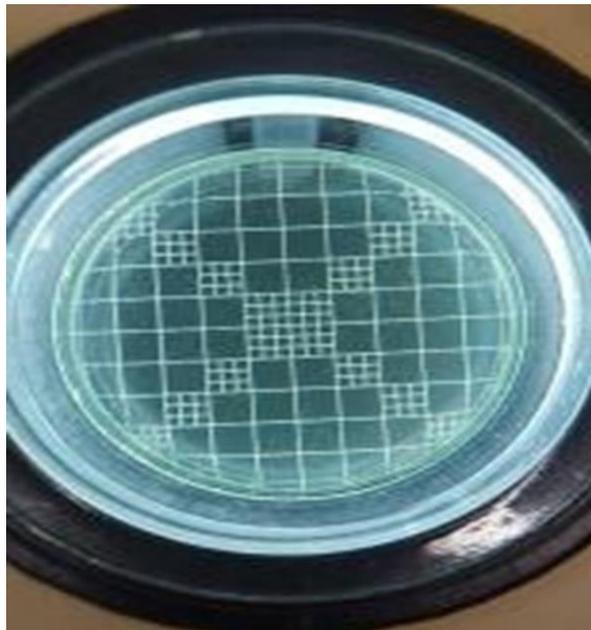
Todas as cepas analisadas nos níveis de 10% e 15% de etanol (Figura 5), apresentaram crescimento que se considerou como satisfatório. Enquanto as cepas sob a concentração de etanol a 20% (Figura 6), não se observou crescimento celular.

6 Análise de tolerância a etanol e a temperaturas elevadas, demonstrando o não crescimento de leveduras com 10% e 15% de etanol à 30 °C.



Fonte: Autoria própria (2023)

Figura 6. Análise de tolerância a etanol e a temperaturas elevadas, demonstrando crescimento de leveduras com 20% de etanol à 30 °C.



Fonte: Autoria própria (2023)

Posteriormente, analisou-se as cepas a partir de análises de tolerância a diversos padrões de temperatura. Todas as leveduras foram inoculadas via YPD com etanol a 15% e sob temperaturas de 30 °C e 37 °C, respectivamente. Comparando com os resultados encontrados em Pataro *et al.*, 2000; Badotti, 2005), observou-se que as leveduras se adaptaram as duas variações de temperatura, não ocorrendo nenhuma exclusão de nenhuma cepa. Nesse sentido, é possível observar que o ambiente sob temperaturas entre 30 °C e 37 °C com nível de etanol elevado possibilita o crescimento/proliferação das cepas, sendo esta evidência de que as cepas analisadas são fisiologicamente adaptadas as condições analisadas.

5.4 Análises do destilado - Cachaça

Os resultados obtidos na Tabela 13, demonstram que as amostras de cachaça analisadas, na totalidade dos ensaios, atendam aos limites estabelecidos na Instrução Normativa N°539/2022 do MAPA.

Tabela 13. Resultado das análises os destilados de cachaças.

Parâmetro (unidade)	Método	Valores de Referência MAPA	± Incerteza	Amostras					
				MC1	MC2	MC3	MC4	MC5	MC6
Álcool metílico (mg/100mL de álcool anidro)	PT 6710/V6.0	máx. 20	± 0,60	3,54	4,82	4,34	6,87	3,72	3,26
Álcool n-butílico (mg/100mL de álcool anidro)	PT 6710/V6.0	máx. 3	± 0,18	0,74	1,21	0,94	1,68	0,78	0,68
Álcool sec-butílico (mg/100mL de álcool anidro)	PT 6710/V6.0	máx. 10	± 0,73	<1,87	<2,12	<1,98	<3,61	<1,76	<1,72
Aldeídos totais, em acetaldeído (mg/100mL de álcool anidro)	PT 6710/V6.0	máx. 30	± 1,3	7,6	8,21	9,69	9,8	7,14	6,99
Cobre (mg/L)	PT 6210/V4.0	máx. 5	± 0,059	<0,250	<0,270	<0,320	<0,430	<0,240	<0,230
Ésteres totais em acetato de etila (mg/100mL de álcool anidro)	PT 6710/V6.0	máx. 200	± 4,0	<9,2	<9,94	<11,73	<11,87	<8,65	<8,46
Soma dos álcoois isobutílico, isoamílicos e n-propílico (mg/100mL de álcool anidro)	PT 6710/V6.0	máx. 360	± 11	252	272,16	321,3	325,08	236,88	231,84
Teor Alcoólico Real a 20 °C (%v/v)	PT 6711/V5.0	38-48 (cachaça)	± 0,13	41,8	45,14	45,36	44,86	42,45	41,5
Acidez volátil, expressa em ácido acético (mg/100mL de álcool anidro)	PT 6722/V6.0	máx. 150	± 0,96	26,11	42,6	33,29	78,68	36,54	24,02
Açúcares (g/L de sacarose)	PT 6725/V3.0	máx. 6 (cachaça)	± 0,19	<1,00	<1,08	<1,00	<1,10	<1,00	<1,00
Furfural (mg/100mL de álcool anidro)	PT 6710/V6.0	máx. 5	± 0,23	<0,93	<1,00	<1,19	<1,20	<0,87	<0,86
Soma dos componentes secundários (mg/100mL de álcool anidro)	PT 6710/V6.0	200-650	± 12	295	318,6	376,13	380,55	277,3	271,4

*Resultados expressos como "<(valor)" referem-se aos limites de quantificação dos métodos.

Fonte: Autoria própria (2023)

A incerteza declarada refere-se a incerteza expandida num intervalo de confiança de aproximadamente 95% e é declarada como a incerteza padrão multiplicada por um fator de abrangência (K) igual a 2, determinados nos procedimentos descritos na metodologia do ensaio.

A incerteza expandida foi determinada segundo as prescrições do Eurachem/CITAC Guide (2012), considerando-se os seguintes componentes: preparo padrões analíticos, curva analítica, preparo da amostra, repetitividade e reprodutibilidade.

Tendo como objetivo coletar amostras das cepas de leveduras e as cachaças de diferentes regiões do Estado do Maranhão, sendo de produtores diferentes. Podemos observar diferenças nas análises das amostras de cachaça, quanto aos parâmetros físico-química.

Analisando o teor alcoólico, podemos observar que o valor médio entre as amostras, apresentou um valor de 44,12% em volume a 20 °C, demonstrando que todas as amostras estão dentro do que estabelece a Legislação.

No estudo publicado por Dalla Costa (2002), analisando os aguardentes do Rio Grande do Sul, relata que foram encontrados valores em concentrações alcoólicas de 38,00 a 55,98% em volume a 20 °C.

Conforme discutido por Bogusz Junior *et al.* (2006), quando os níveis de concentração alcoólica das cachaças estão além dos limites estabelecidos por lei, isso indica uma deficiência de conhecimento tecnológico na produção, seja em relação às técnicas de destilação ou ao processo de padronização do produto.

Durante as análises de ésteres nas cachaças, foram encontrados valores entre 9,2 e 11,87 mg/100 mL de álcool anidro, os quais estão abaixo do limite máximo permitido pela Portaria 539 do MAPA (2022). Conforme Pereira *et al.* (2003), isso indica que as amostras estão dentro da faixa estabelecida durante a formação de ésteres no processo fermentativo, não ultrapassando os valores permitidos.

De acordo com Maia e Campelo (2005), os ésteres presentes na aguardente são compostos principalmente por acetato de etila, representando cerca de 80% do total. Essa é uma característica da fração cabeça do destilado e tem um impacto negativo na qualidade final da cachaça. Conforme mencionado por Bogusz Junior *et al.* (2006), é desejável obter teores baixos

desses compostos nas bebidas destiladas, buscando um produto de qualidade. Para alcançar isso, as agroindústrias devem ter um controle adequado na aplicação das técnicas de destilação, visando obter a fração ideal do destilado conhecida como "coração". Além disso, é importante usar leveduras adequadas, controlando o tempo da fermentação para evitar a formação excessiva de ésteres.

Conforme estabelecido na Portaria 539 do MAPA (2022), a concentração máxima de acidez volátil permitido para a cachaça é de 150 mg de ácido acético por 100 mL de álcool anidro. O ácido acético é um composto secundário que se forma durante o processo de fermentação da cachaça. De acordo com Cardoso (2001), a análise da acidez volátil é importante para controlar diversos fatores, como a higienização dos equipamentos utilizados nos processos, as cepas de leveduras empregadas, o tempo e a temperatura da fermentação, a pureza da fermentação e o manejo do mosto. Esses fatores são cruciais para reduzir a ocorrência de acidez volátil e assegurar a qualidade do produto.

De acordo com as análises da acidez volátil, todas as amostras estão abaixo da concentração máxima permitida que é de 150 mg de ácido acético por 100 mL de álcool anidro, estabelecido pela Portaria 539 do MAPA. A média encontrada foi de 40,20 mg. No entanto, há uma diferença significativa entre as amostras MC1 e MC4, que apresentaram valores de 26,11 mg e 78,68 mg, respectivamente. Isso indica possíveis diferenças nos aspectos do processo, especialmente em relação à higienização, entre essas amostras. Conforme discutido por Bogusz Junior *et al.* (2006), esses resultados podem impactar as propriedades sensoriais das amostras, uma vez que a acidez volátil é um parâmetro significativo que está relacionado com as características sensoriais de cachaças.

6 CONCLUSÕES

O estudo evidenciou que as cepas analisadas das amostras de CA1, CA2, CA3, CA4, CA5 e CA6 de *Saccharomyces cerevisiae*, apenas as cepas das amostras CA5 e CA6 foram as que conseguiram finalizar a fermentação em seis dias, onde as cepas da amostra CA6, sendo as mais promissoras.

As cepas das amostras CA1, CA5 e CA6 foram capazes de consumir o

açúcar do caldo de cana de forma satisfatória, reduzindo o °Brix durante as etapas de multiplicação e fermentação. Além disso, o tempo necessário para a fermentação foi inferior a 24 horas, resultando em um teor de álcool de menos de 1% no °Brix. Esses resultados indicam o potencial dessas cepas na produção de cachaça, podendo possibilitar um aumento significativo na produtividade em volume.

As amostras MC1 e MC4 apresentam uma diferença notável na acidez volátil, respectivamente, apontando resultados em 26,11 mg/100 mL e 78,68 mg/100 mL. Essa disparidade pode estar associada a questões de higienização durante o processo de produção das amostras.

Conforme mencionado por Bogusz Junior *et al.* (2006), a acidez volátil é um parâmetro de grande importância que está diretamente relacionado às características sensoriais de cachaças. Altos valores de acidez volátil podem indicar a presença de problemas nas características sensoriais das amostras, como sabores indesejados.

Portanto, é importante monitorar a acidez volátil nas amostras de bebidas alcoólicas destiladas, garantindo que estejam dentro dos limites estabelecidos e apresentem características sensoriais adequadas. A diferença observada entre as amostras MC1 e MC1 pode ser um indicativo de possíveis problemas na higienização na etapa de fermentação, onde afetaram a qualidade sensorial das amostras.

Analisando todos os testes de estresses que foram aplicadas às cepas, é observado que as cepas *Saccharomyces cerevisiae* das amostras CA1, CA3, CA5 e CA6, apresentaram resultados satisfatórios, evidenciando características favoráveis na produção de cachaça de alambique em condições ambientais encontradas na região do Maranhão.

A partir dos resultados obtidos, foi possível obter isolados de *Saccharomyces cerevisiae*, que permitiram estabelecer produções mais eficazes, rentáveis e com características favoráveis aos estresses e condições encontradas no estado do Maranhão. Sendo necessárias, etapas posteriores, como análise molecular da levedura para verificar padrões e diferenças das cepas estudadas. Possibilitando obter o selo regional para a cachaça maranhense.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Acidez titulável total, volátil total e fixa – NBR 13856**. São Paulo: ABNT, 1997.

AIBA, S.; HUMPHREY, A.E.; MILLIS, N. **Biochemical Engineering**. 2nd edition. Academic Press, Inc., 1973, 434 p.

ALCARDE, André Ricardo. **Cachaça: ciência, tecnologia e arte**. Editora Blucher, 2017.

ALVARENGA, Flávia Barbosa Magalhães et al. **Seleção de isolados ambientais de *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de cachaça de alambique**. 2019.

ALVES, M. **Mercado de cachaça**. Revista Envasador: guia de fornecedores 2009, v. 40, mar. 2009. Disponível em: <<http://www.ibrac.net>>. Acesso em: 10 out de 2023.

ASHRAE. **AMERICAN SOCIETY OF HEATING, REFRIGERATION AND AIRCONDITIONING ENGINEERS**. Handbook of refrigeration. SI Edition. Atlanta, 2014.

Bogusz Junior *et al.* **Composição química da cachaça do Noroeste do Rio Grande do Sul**. Ciências e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 26(4): 793-798, out.-dez. 2006.

BORTOLETTO, Aline Marques. **Composição química de cachaça maturada com lascas tostadas de madeira de carvalho proveniente de diferentes florestas francesas**. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, 2013. 80p.

BOSQUEIRO, Angelo Cesar. **Composição química da aguardente de cana-de-açúcar ao longo do processo de dupla destilação em alambique simples**. Piracicaba: USP, 2010.

BRAGA, V.S. **A influência da temperatura na condução de dois processos fermentativos para a produção de cachaça**. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 13, de 29 de junho de 2005**. Aprovar o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2005a. Seção 1, p. 54.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lei 8.918, de 14 de julho de 1994**. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Seção 1, p. 02.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 24, de 08 de setembro de 2005**. Aprovar o Manual Operacional de Bebidas e Vinagres. Diário Oficial da República Federativa do Brasil,

Brasília, 2005b. Seção 1, p. 11.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria MAPA Nº 539, de 26 de dezembro de 2022**. Estabelece os Padrões de identidade e Qualidade da aguardente de cana e da cachaça. Seção 1, p. 07.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **A cachaça no Brasil: dados de registro de cachaças e aguardentes ano 2021** / Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/AECS, 2021.

BRUNELLI, L. T. **Caracterização físico-química, energética e sensorial de hidromel**. 2015. VII. 85 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, 2015.

CAETANO, Rafael Rodrigo Resende. **Bebidas alcoólicas e sua ecologia: impactos históricos e sociais desde o surgimento até a atualidade**. 2018. 33 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba, 2018.

CALDWELL, D. R. **Microbial physiology and metabolism**. Dubuque: Wm. C. Brown, 1995. 353 p.

CARDOSO, M.G.C. **Análises físico-químicas de aguardente**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. p. 152-173.

CARDOSO, M.G.C. **Produção de Aguardente de Cana**. 2 ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 445 p. CARDOSO, D. C. **Correlação entre a qualidade sensorial e a composição química da cachaça de alambique nova**. 2013. 184 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. **Fermentação descontínua**. In: SCMIDELL, W. (Coord.); LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2. p. 193-204.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Análise Anual**. Safra 2023. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4982-producao-de-cana-de-acucar-deve-crescer-4-4-na-safra-2023-24-estimada-em-637-1-milhoes-de-tonadas> >. Acesso em 02 de setembro de 2023.

CORRÊA, Ana Carolina. **Qualidade da bebida destilada a partir do mosto combinado de malte de cevada e caldo de cana-de-açúcar**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

COSTA, P R F et al. **Fenótipo Cintura Hipertrigliceridêmica e mudanças na glicemia de jejum e pressão arterial de crianças e adolescentes após um ano de seguimento**. *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo, v. 109, n. 1, p. 47-53, July 2017.

DALLA COSTA, E. R. **Perfil analítico das aguardentes produzidas na região central do Rio Grande do Sul**, Santa Maria, 2002, 73 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 2002.

DIAS, D. R. **Elaboração de bebida alcoólica fermentada a partir de frutas tropicais**. 2001. 139 p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DING, J. et al. **Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae***. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 85, n. 2, p. 253–263, 2009.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA. **Cachaça**. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em :< <https://www.embrapa.br/en/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/cana/pos-producao/cachaca>> Acesso em 02 de outubro de 2022.

ESTADO DE MINAS, **página 12 do Caderno Agropecuário do Jornal Estado de Minas**, 13 de agosto de 2008. FAO. Food and Agricultural Organization. Disponível em: <<http://apps.fao.org/page/collections>>. Acesso em: 12 dez de 2022.

ESTANISLAU, M.L.L.; CANÇADO JR., F.L.; PAIVA, B.M. **Mercado Atual e potencial da cachaça**. Informe Agropecuário, EPAMIG, v. 23, n.217, p.19-24, 2002.

FIALHO, C.J. **Identificação de *Saccharomyces cerevisiae* por técnicas moleculares (PCR e PFGE) em uma fermentação de caldo de cana-de-açúcar**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2000, 76p. (Tese, Mestrado em Ciência de Alimentos, concentração em Microbiologia de Alimentos).

FIORE, C. et al. **Comparison between yeasts from grape and agave musts for traits of technological interest**. World Journal of Microbiology & Biotechnology, New York, v. 21, n. 6/7, p. 1141-1147, oct. 2005.

FRANÇOSO, Iára Luiza Tassim. **Efeito da enzima α -amilase na etapa de clarificação do caldo de cana-de-açúcar**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

200 anos_200 cachaças: **A evolução da cachaça, da independência até os dias de hoje, contada em 200 rótulos** / editores Andréia Gerk... [et al.]. 1. ed. Campinas, SP: PCN Comunicação, 2022.

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

Gomes FCO, Pataro C, Guerra JB, Neves MJ, Côrrea SR, Moreira ESA, Rosa CA (2002) **Physiological diversity and trehalose accumulation in *Schizosaccharomyces pombe* strains isolated from spontaneous fermentation during the production of Brazilian cachaça**. Can J Microbiol 48:399–406

GONÇALVES, C. M. *et al.* **Produção e análise química de cachaça de alambique a partir de cepa selecionada de *Saccharomyces cerevisiae***. B. CEPPA, Curitiba, v. 37, n. 2, jul./dez. 2019.

GUIDINI, C. Z. **Fermentação Alcoólica em Batelada Alimentada Empregando *Saccharomyces cerevisiae* de Características Floculantes**. 2013. 148p. Tese de doutorado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia/MG, 2013.

HENICK-KLING, T. **Yeast and Bacterial Control in Winemaking**. In: **Modern methods of plant analysis**, new series vol 6. Wine analysis. Edited by LINSKENS, H.F.; JACKSON, J.F. Spring-Verlag Berlen Heidelberg, 1988.

IBM Corp. Released 2016. **IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0**. Armonk, NY: IBM Corp.

IBRAC - INSTITUTO BRASILEIRO DA CACHAÇA. **Mercado interno**. Disponível em: <<http://www.ibrac.net>>. Acesso em: 10 abr. 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL – INMETRO **Portaria nº 126, de 2005**. Aprova o Regulamento de avaliação da conformidade da cachaça. Disponível em: <www.inmetro.gov.br>. Acesso em: 12 jan. 2023.

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

LIMA, U.A. Aguardentes. In: AQUARONE, E., LIMA, U.A.; BORZANI, W. (Coord.) **Biotecnologia Industrial: alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 5. p. 145-182.

Lima, Luciana Leite de Andrade. **Tecnologia de bebidas** / Luciana Leite de Andrade Lima, Artur Bibiano de Melo Filho; [coordenadora institucional Argelia M^a Araújo Dias Silva]. -- Recife: EDUFRPE, 2011.

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

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

MALTA, H. L. **Estudos de parâmetros de propagação de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*) para produção de cachaça de alambique**. 2006. 70p. Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia (UFMG), Belo Horizonte/MG, 2006.

MARTINS, R. L. **Importância das reservas energéticas para a resposta ao estresse ácido em *Saccharomyces***. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

MÉLO, Erika Maria Gouveia de. **Um Método Espectrofotométrico para Quantificação de Furfural em Cachaças por Extração Líquido-Líquido**. 2014. 78 f. Dissertação (Mestrado em Química analítica) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

OLIVEIRA, S.G.; MAGALHÃES, M.A. **Procedimentos para produção da cachaça artesanal de Minas regulamentados pelo Decreto nº42.644 de 05/06/2002**. Informe Agropecuário, EPAMIG, v. 23, n.217, p. 78-83, 2002.

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

OLIVEIRA, Sônia Paula Alexandrino de. **Níveis de congêneres, carbamato de**

etila e outros contaminantes em runs e uísques de consumo popular no Brasil. 2012. 87 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

ORTIZ, P. R. B. **Avaliação da geração térmica e do campo de temperaturas na fermentação de cerveja artesanal.** 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente.** Dissertação (Mestrado) - Universidade federal de Uberlândia, 2010.

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. **Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique.** Informe Agropecuário. v. 23, n. 217, p. 37-43, 2002.

PARAZZI, C.; ARTHUR, C. M.; LOPES, J. J. C; BORGES, M. T. M. R. **Avaliação e caracterização dos principais compostos químicos da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de carvalho (*Quercus sp.*).** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 28, n.1, p.193-199, jan./mar. 2008.

PEREIRA, N.E.; CARDOSO, M.G.; AZEVEDO, S.M.; MORAIS, A.R.; FERNANDES, W.; AGUIAR, P.M. **Secondary compounds in brazilian sugarcane spirits (“cachaça”) manufactured in Minas Gerais state.** Ciênc. agrotec. v. 27, n. 5, p. 1068-1075, 2003.

PRUDENCIO, Sandra Cerqueira Pereira. **As denominações de cachaça: um estudo dialetológico, etnolinguístico e semântico cognitivo.** 618 f. il Salvador, 2021.

REED, G. and PEPLER, H.J. **Yeast technology.** Westport, Connecticut: The AVI. Publishing Company, Inc., 1973. 378p.

RODRIGUES, L. et al. **Biosurfactants: potential applications in medicine.** The Journal of antimicrobial chemotherapy, v. 57, n. 4, p. 609-618, 2006.

RODRIGUES, Adriana Novaes. **Incidência e fatores de risco de contaminação por fungos filamentosos na mucosa oral normal de trabalhadores rurais das culturas de cana-de-açúcar, laranja e abacaxi da região de Frutal-MG.** 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

RODRIGUES, Leonardo Milani Avelar *et al.* Uma dose de História: cachaça de alambique e aguardente de colona. **Perspectivas e Diálogos: Revista de História Social e Práticas de Ensino**, v. 2, n. 2, 2019.

SAERENS, S. M.; DELVAUX, F.; VERSTREPEN, K. J.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J. M.; DELVAUX, F. R. **Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation.** Applied and Environmental Microbiology, v. 74, n. 2, p. 454-61, 2008.

SANTOS, Camila Oliveira dos *et al.* **Diagnóstico e avaliação da influência de contaminantes selvagens durante etapas do processo produtivo do etanol.** 2021.

SANTOS, Angélica Borges. **O processo produtivo de cachaça artesanal na**

comunidade rural de sítio - distrito de Brejo do Amparo- Januária (MG) - 2021.171f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2021.

SANTOS SFM et al. **Análise Cinética da Fermentação das Leveduras Comerciais S-04 e S-33.** Revista Saúde e Ciência online, v. 7, n. 2, 2018. 502 p.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M.C.R. **Biorreatores e processos fermentativos.** In: SCHMIDELL, W. (Coord.); LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2. p. 179-192.

SCHMIDELL, W. **Agitação e aeração em biorreatores.** In: SCHMIDELL, W. (Coord.); LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2.; p.277-331.

SCHWAN, R. F. et al. **Microbiology and physiology of Cachaça (Aguardente) fermentations.** Antonie van Leeuwenhoek, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 89-96, jan. 2001.

Sebastião, Jaqueline. **Influência do nitrogênio e do fósforo no rendimento alcoólico da fabricação da cachaça / Jaqueline Sebastiao.** - João Pessoa, 2023. 42 f.

SILVA FILHO, Benisio Ferreira da. **Análise da resposta ecológica da cana-de-açúcar (*Saccharum sp*) em resposta à herbivoria por *Diatraea saccharalis*.** Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) - Instituto de Química e Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2014. 102 f

SILVA, C.L.C. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2003. 99p. (Tese, Mestre em Ciência de Alimentos). **Seleção de linhagens de *Saccaromyces cerevisiae* floculantes e linhagens não produtoras de H₂S e sua influência na qualidade da cachaça.**

SORATTO A.N.; VARVAKISII G.; HORII, J. **A certificação agregando valor à cachaça do Brasil. Ciência e Tecnologia de Alimentos,** Campinas, v.27, n.4, out./dez. 2007.

SOUZA, L. M. **Qualidade e identidade das cachaças produzidas na região Norte Fluminense – RJ.** 2008. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2008.

STANLEY D, BANDARA A, FRASER S, et al. **The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*.** Journal of Applied Microbiology. 109:13–24. 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R; CASE, C. L. **Microbiory: anintroductiona 6.** ed. CaUforma: Benjamin Cummings, 2000. 832p.

VAUGHAN-MARTINI, A., MARTINI, A. (1983). **A taxonomic key the genus *Saccharomyces*.** System. Appl. Microbiol. 16, 113-119.

VERDI, R. A. **Dinâmicas e perspectivas do mercado da cachaça.** Revista Informações Econômicas, São Paulo, v. 36, n. 2, fev. 2006.

VERSTREPEN, K. J., DERDELINCKX, G., DELVAUX, F. R., WINDERICKX, J., THEVELEIN, J. M., BAUER, F. F., PRETORIOS, I. S. (2001). **Late fermentation expression of FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae***. J. Am. Sac. Brew. Chem. 59(2), 69-76.

VERSTREPEN, K. J., VAN LAERE, S. D. M., VANDERHAEGEN, B. N. P., DERDELINCKX, G., DUFOUR, J., PRETORIUS I. S., WINDERICKX, J., THEVELEIN, J. M. (2003). **Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Ig-ATF1. and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters**. Appl. Environ. Microbiol. 69(9), 5228-5237 a.

VIANA, Fernando Luiz E. **Indústria de bebidas alcoólicas**. Caderno Setorial ETENE. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, ano 2, n.2, fev.2017. (Série Caderno Setorial Etene, n.02).

VIEIRA, É.N.R. **Influência do tipo de mosto e do gênero de levedura na formação de aminas bioativas e carbamato de etila em destilados alcoólicos**. 167 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

ZEGER S, LIANG K. **Longitudinal data analysis for discrete and continuous outcomes**. Biometrics. 1986 Mar; 42(1):121-30.

ZUPPARDO, B. **Uso da goma Oenogum para a estabilização coloidal e de espuma em cerveja**. 116 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.