

PRODUÇÃO E ANÁLISE QUÍMICA DE CACHAÇA DE ALAMBIQUE A PARTIR DE CEPA SELECIONADA DE *SACCHAROMYCES CEREVIAE*

CLEBER MIRANDA GONÇALVES*
SAMUEL CARVALHO**
ARISTÓTELES GÓES NETO***
HENRIQUE REIS SERENO****
ALICE FERREIRA DA SILVA HUGHES*****
BRUNO MOTTA OLIVEIRA*****
CARLA SANTOS RIBEIRO PINHEIRO*****
ANA PAULA TROVATTI UETANABARO*****

As leveduras e as condições de fermentação são apontadas como fatores que influenciam no sabor das bebidas alcoólicas, pois a maioria dos compostos secundários responsáveis pela qualidade sensorial da bebida é formada durante a fermentação. A utilização de leveduras selecionadas para produção de cachaça tem sido pesquisada visando ao aumento da produtividade, vantagens tecnológicas e melhoria das características sensoriais da bebida. Assim, o presente trabalho teve como objetivo verificar a qualidade química da cachaça artesanal produzida em alambique de cobre por levedura selecionada com base no consumo de açúcares ("Brix) durante a multiplicação celular e a fermentação do caldo de cana, bem como no tempo transcorrido para concluir a fermentação. Foram testadas 16 linhagens de *S. cerevisiae* previamente isoladas de dornas de fermentação de destilarias artesanais localizadas no estado da Bahia. Considerando parâmetros de consumo de açúcares durante a etapa de multiplicação e de fermentação, a linhagem *S. cerevisiae* SC82 foi escolhida para a produção de cachaça em alambique de cobre em pequena escala (10 L). Entretanto os valores de álcoois superiores estariam acima do permitido pela legislação. Fatores como a cepa utilizada, presença de micro-organismos contaminantes na fermentação, concentração dos suplementos orgânicos adicionados na fermentação, e o tipo do equipamento usado na destilação, podem estar influenciando a produção desses álcoois superiores.

PALAVRAS-CHAVE: CACHAÇA; LEVEDURA SELECIONADA; ANÁLISE QUÍMICA; FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.

*Doutor em Biotecnologia, Instituto Federal de Sergipe (IFS) – Campus São Cristóvão/SE, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)/BA; (e-mail: cleber_bahia@hotmail.com).

**Pós-Doutorando, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC)/BA, (e-mail: samuelmicrobiologia@gmail.com).

***Pós-Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)/MG, PPGBiotec da UEFS, (e-mail: arigoesneto@gmail.com).

****Doutorando, Programa de Pós-graduação em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos (PPGBBM) da UESC, Instituto Federal Baiano – Campus Senhor do Bonfim/BA, (e-mail: henriquesereno@gmail.com).

*****Pós-Doutora, UFMG (e-mail: alicefhughes@gmail.com).

*****Doutor em Biotecnologia, Universidade Federal do Oeste da Bahia (e-mail: bruno.motta@ufob.edu.br).

1. INTRODUÇÃO

A cachaça é uma bebida tipicamente brasileira, que representa um produto alcoólico de importância econômica crescente, de grande aceitação no mercado nacional e internacional (PEREIRA *et al.*, 2003). Essa bebida alcoólica foi elevada ao posto de bebida nobre, símbolo nacional, e segundo lugar entre todas as bebidas alcoólicas vendidas no Brasil, ficando atrás somente da cerveja (BARBOSA, 2013).

A cachaça de alambique corresponde a uma bebida dotada de sabor e aroma característicos, sendo produzida exclusivamente do caldo de cana-de-açúcar, sem a adição de produtos químicos, nos chamados engenhos e destilada em alambiques, que são, na verdade, a estrutura de cobre em que é feito o processo de destilação (CARDOSO, 2006). Basicamente, a produção da cachaça de alambique consiste em multiplicar o inóculo, extrair o caldo da cana-de-açúcar na operação de moagem, convertê-lo em vinho pelo processo de fermentação e transformar o vinho em cachaça por meio da destilação (PATARO *et al.*, 2002).

No processo de produção da cachaça de alambique, em geral, a fermentação do caldo de cana é espontânea, em que os micro-organismos presentes no caldo de cana, nos equipamentos e nos utensílios das áreas de produção, são os responsáveis pelo processo (SANTOS, 2013). Dessa forma, existe uma grande diversidade de espécies de micro-organismos, com predominância de leveduras, especialmente a *Saccharomyces cerevisiae*, bem como outras espécies de leveduras e bactérias contaminantes provenientes do canavial e da água utilizada no processo (ALCARDE; MONTEIRO; BELLUCO, 2012).

As leveduras e as condições de fermentação são apontadas como os fatores que influenciam no sabor das bebidas alcoólicas, pois a maioria dos compostos secundários responsáveis pela qualidade química e sensorial da bebida é formada durante a fermentação (PEREIRA, 2007).

A utilização de leveduras selecionadas como iniciadoras do processo de fermentação para produção de cachaça tem sido pesquisada visando ao aumento da produtividade, a diminuição da contaminação e a padronização da qualidade química e sensorial da bebida produzida (SOARES; SILVA; SCHWAN, 2011). Segundo Stroppa *et al.* (2009), a seleção de linhagens iniciadoras corresponde a uma alternativa para garantir uma alta produtividade e a manutenção da qualidade da cachaça, e favorece o início mais rápido do processo fermentativo, evitando-se os riscos de contaminação apresentados pela fermentação espontânea com menor competição por nutrientes essenciais, maior rendimento, qualidade e padronização da bebida produzida.

A bebida produzida por levedura selecionada torna-se uma alternativa para a melhoria da qualidade química e sensorial, levando à produção de uma bebida padronizada (MENDONÇA, 2014). Assim, o presente trabalho teve como objetivo a produção e a análise química de cachaça de alambique produzida a partir de cepas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*, escolhidas mediante a seleção feita, em escala piloto, de isolados de *S. cerevisiae* com base no consumo de açúcares (°Brix), durante a multiplicação celular e a fermentação, e o tempo transcorrido para terminar a fermentação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 LEVEDURAS PARA A PRODUÇÃO DE CACHAÇA DE ALAMBIQUE

Para a seleção de leveduras para a produção de cachaça de alambique, foram estudadas 16 cepas: SC52, SC60, SC82, SC91, SC102, SC114, SC129, SC138, SC174, SC177, SC179, SC184, SC219, SC220, SC225 e SC229 de *Saccharomyces cerevisiae*, isoladas de fermentações em fábricas de cachaça de alambique localizadas no estado da Bahia. Esses isolados foram previamente identificados molecularmente como *Saccharomyces cerevisiae* por Silva (2009), e estão

criopreservados a -86 °C no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Bahia.

2.2 TESTES DE SELEÇÃO DAS LEVEDURAS EM ESCALA PILOTO

Para a seleção das leveduras, em escala piloto, a serem utilizadas para a produção de cachaça de alambique, primeiramente, as cepas testadas passaram por quatro etapas de multiplicação celular (P1, P2, P3 e P4), em que foi avaliado o Brix alcançado pelas cepas no final da etapa P4 de multiplicação (Tabela 1). Ao término da referida etapa, as cepas testadas foram encaminhadas para as etapas fermentativas, F1 e F2, em que foram avaliados o tempo obtido para reduzir o Brix da etapa F1 da fermentação e o tempo transcorrido para terminar a fermentação da etapa F2 (Tabela 2). Assim, as cepas testadas que apresentaram os melhores resultados no final da etapa de multiplicação e durante as etapas fermentativas foram consideradas aptas para a produção de cachaça utilizando alambique de cobre de pequeno porte (10 L).

A seleção das cepas em escala piloto, aptas para a produção de cachaça de alambique, com base no consumo de açúcares durante a multiplicação celular e a fermentação do caldo, e no tempo necessário para fermentar, baseou-se no parâmetro de que quanto mais rápido for o consumo de açúcares durante a multiplicação celular, para o aumento da biomassa celular, e durante a fermentação do caldo, para a produção de etanol, menor será o tempo fermentativo e consequentemente maior será a produtividade da fermentação. O termo produtividade refere-se à velocidade de produção de etanol ao final da fermentação; e quanto menor for o tempo requerido para zerar o Brix, maior será a produtividade da fermentação (MAIA; CAMPELO, 2006).

Os testes de seleção das leveduras utilizando a metodologia proposta neste trabalho foi realizado em triplicata.

2.2.1 MULTIPLICAÇÃO EM ESCALA PILOTO DAS LEVEDURAS TESTADAS

As leveduras para a produção de cachaça de alambique foram reativadas em ágar sabouraud dextrose e em seguida foram incubadas a 30 °C durante 24h. Após esse período, foi verificada a pureza das culturas pelo aspecto macroscópico e pela microscopia óptica.

Em seguida foi feita a inoculação de cada cepa individualmente por meio da transferência de quatro alçadas carregadas das culturas puras para cada um dos quatro frascos de 250 ml de capacidade, contendo 100 ml de caldo de cana a 5 °Brix (etapa P1). Depois foram iniciadas as três etapas seguintes (P2, P3 e P4) de multiplicação das leveduras (Tabela 1). Na etapa P2, foram usados quatro frascos de 500 ml; na etapa P3, quatro de 1 L; e na etapa P4, quatro de 2 L de capacidade.

Cada um dos quatro frascos das etapas tinha caldo de cana estéril (121 °C/15min), suplementado com fubá de milho (20 g/L) e farelo de arroz (1 g/L). Além disso, cada frasco da etapa P1 tinha 100 ml de caldo de cana a 5 °Brix, por sua vez, os da etapa P2 tinham 100 ml de caldo de cana a 7 °Brix, já os da etapa P3 apresentavam 200 ml de caldo de cana a 9 °Brix, e os da etapa P4 com 600 ml de caldo de cana a 11 °Brix. A incubação de cada etapa foi feita em incubadora tipo shaker a 150 rpm e temperatura de 30 °C por 24h. Após 24h, transferiu-se, assepticamente, o volume do frasco de uma etapa para o frasco da etapa seguinte, repetindo-se esse procedimento para os demais frascos em todas as etapas. No final da Etapa P4, somando o volume dos quatro frascos, foi obtido, no total, o volume de 4 L de inóculo, conforme apresentado na Tabela 1.

TABELA 1. ETAPAS DE MULTIPLICAÇÃO (P1 A P4), UTILIZANDO QUATRO FRASCOS POR ETAPA, DAS LEVEDURAS SOB CONDIÇÕES ASSÉPTICAS PARA O PREPARO DE VOLUME DE INÓCULO PARA A FERMENTAÇÃO EM ESCALA PILOTO.

ETAPAS DA MULTIPLICAÇÃO	P1 (1a etapa)	P2 (2a etapa)	P3 (3a etapa)	P4 (4a etapa)
Volumes utilizados e Brix do mosto por frasco	Levedura inoculada (quatro alçadas por frasco) + 100 ml de CC1 a 5 °Brix / frasco	100 ml de P1 (volume transferido / frasco) + 100 ml de CC1 a 7 °Brix / frasco	200 ml de P2 (volume transferido / frasco) + 200 ml de CC1 a 9 °Brix / frasco	400 ml de P3 (volume transferido / frasco) + 600 ml de CC1 a 11 °Brix / frasco
Volume por frasco / etapa (ml)	100	200	400	1000
Quantidade de frascos / etapa	4	4	4	4
Volume total dos frascos / etapa (ml)	400	800	1600	4000
Condições de incubação na etapa dos frascos	Incubadora a 30 °C e 150 rpm / 24h	Incubadora a 30 °C e 150 rpm / 24h	Incubadora a 30 °C e 150 rpm / 24h	Incubadora a 30 °C e 150 rpm / 24h

CC1 = Caldo de cana-de-açúcar estéril suplementado com 20 g/L de fubá de milho e 1 g/L de farelo de arroz por frasco.

O critério de seleção adotado na etapa de multiplicação (P1 até P4) para a indicação do bom andamento da fase de multiplicação pelas leveduras testadas está relacionado ao Brix alcançado no final da etapa P4. Foi considerado um bom desempenho quando o °Brix medido foi menor ou igual a 4,8 (valor referência).

Esse valor teórico de referência para o Brix refere-se à metade do valor do Brix teórico de 9,6 °Brix que é obtido na simples mistura dos volumes das etapas P1 (5 °Brix) até P4 (11°Brix) da multiplicação, sem incubação e sem inoculação de leveduras.

Assim, ficou definido nesta pesquisa o valor da metade do Brix teórico (4,8 °Brix) como parâmetro de referência para o bom desempenho no final da etapa de multiplicação, baseando-se no fato de que as cepas, para crescerem, utilizariam seu metabolismo, consumindo açúcar e oxigênio para o aumento da biomassa celular (CARDOSO, 2006) e, com isso, reduziriam o valor do Brix no final da etapa P4 para um valor pelo menos menor que 9,6 °Brix (Brix teórico sem fermentação). Por isso, estabeleceu-se nesta pesquisa um bom desempenho realizado ao final da etapa P4 de multiplicação o valor de referência de 4,8 °Brix (metade do Brix teórico).

2.2.2 PROCESSO DE FERMENTAÇÃO EM ESCALA PILOTO

Após as 24h de multiplicação na etapa P4, os 4 L de inóculo foram transferidos para uma dorna de fermentação de aço inoxidável com capacidade de 30 L. Em seguida, foram adicionados 5 L de caldo de cana a 13 °Brix, previamente pasteurizado (70 °C/15s, seguido de resfriamento a 32 °C) e suplementado com 20 g/L de fubá de milho e 1 g/L de farelo de arroz (CLETO; RAVANELI; MUTTON, 2009). Essa etapa foi chamada de F1.

Quando o Brix da etapa F1 atingia a metade do seu valor inicial ou completava 24 h, eram adicionados mais 6 L de caldo de cana a 15 °Brix previamente aquecido a 30 °C, sem suplementação

e sem pasteurização. Essa etapa foi chamada de F2, em que as cepas testadas permaneceram até o Brix zerar, conforme descrito na Tabela 2.

TABELA 2. ETAPAS DA FERMENTAÇÃO (F1 E F2) EM ESCALA PILOTO DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS TESTADOS.

ETAPAS DA FERMENTAÇÃO	F1 (1a etapa)	F2 (2a etapa)
Volumes utilizados e Brix do mosto / etapa	4 L de P4 + 5 L de CC2 a 13 °Brix pasteurizado* e suplementado**	9 L de F1 + 6 L de CC2 a 15 °Brix a 30 °C, sem pasteurização e sem suplementação
VOLUME OBTIDO (L)	9	15

CC2 = Caldo de cana-de-açúcar; *70 °C/15s, seguido de resfriamento a 32 °C; **Caldo de cana suplementado com 20 g/L de fubá de milho e 1 g/L de farelo de arroz.

Apenas as leveduras que conseguiram adequadamente multiplicar e fermentar em seis dias, ou seja, que chegaram a um Brix abaixo de 4,8 °Brix no final da etapa de multiplicação, além de apresentarem aroma agradável e tempo de fermentação menor ou igual a 24h, foram consideradas aptas a serem possíveis inóculos iniciadores e selecionadas para a produção de cachaça de alambique. Os seis dias referidos nesta pesquisa, para se produzir cachaça a partir de levedura selecionada, foram estabelecidos com base na sequência das etapas planejadas para o procedimento de multiplicação e de fermentação do caldo de cana objetivando a produção de cachaça. Além disso, serviu como um importante parâmetro de indicação de boas leveduras iniciadoras do processo fermentativo.

O grau Brix (°Brix), sólidos solúveis totais, do caldo de cana utilizado nesta pesquisa foi medido com auxílio do sacarímetro.

2.3 PROCESSO DE DESTILAÇÃO DO FERMENTADO (VINHO)

A destilação da cachaça foi realizada no laboratório da Agroindústria da Universidade Estadual de Santa Cruz, na Bahia.

Foi utilizado alambique de cobre com capacidade útil de 10 L de vinho. Durante a destilação, foi realizado o fracionamento da cachaça, em que se adotou como referência o padrão de 5% do volume máximo de destilado esperado para a fração da “cabeça”, 80% do volume máximo de destilado esperado para a fração do “coração” e 15% do volume máximo de destilado esperado para a fração da “cauda” (FRANÇA JUNIOR, 2008; CARDOSO, 2006; RODRIGUES FILHO e OLIVEIRA, 1999).

O volume teórico máximo de destilado esperado foi calculado com base no teor alcoólico e no volume de vinho, conforme a seguinte expressão: Volume máximo de destilado esperado = (volume de vinho posto no alambique * teor alcoólico (°GL) do vinho) / teor alcoólico (°GL) desejado na cachaça (FRANÇA JUNIOR, 2008; RODRIGUES FILHO e OLIVEIRA, 1999). Assim, estabeleceu-se os volumes (mL) de cabeça, coração e cauda a serem retirados durante a destilação.

2.4 ANÁLISES QUÍMICAS

A cachaça produzida foi analisada para: grau alcoólico real por densimetria, acidez volátil por titulometria; carbamato de etila por cromatografia gasosa acoplada a espectofotômetro de massa (CG-MS); teores de acetaldeído, acetado de etila, metanol, alcoóis superiores, álcool n-butílico, álcool sec-butílico, acroleína e furfural por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama

(CG-FID); e contaminantes inorgânicos (cobre, chumbo e arsênio) por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, conforme preconiza a legislação Brasil (2005a), que dispõe sobre o Regulamento Técnico para a fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para a Aguardente de Cana e Cachaça.

Todas as análises realizadas seguiram metodologias oficiais descritas no Manual de Análises de Bebidas e Vinagres do MAPA (BRASIL, 2005b).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 SELEÇÃO DAS LEVEDURAS

Na Tabela 3, estão esquematizados os valores de Brix obtidos pelas cepas testadas no final da etapa P4 de multiplicação e durante as etapas F1 e F2 da fermentação.

TABELA 3. SÓLIDOS TOTAIS DO MOSTO FERMENTADO DAS LEVEDURAS TESTADAS NO FINAL DA ETAPA P4 DA MULTIPLICAÇÃO (30 °C, 150 RPM / 24H) E DURANTE AS ETAPAS FERMENTATIVAS F1 (CALDO DE CANA A 13 °BRIX, PASTEURIZADO E SUPLEMENTO / 24H) E F2 (CALDO DE CANA A 15 °BRIX, A 30 °C E SEM SUPLEMENTAÇÃO / 24H).

ETAPAS		ISOLADOS DE <i>S. CEREVIAE</i> TESTADOS																
		SC52	SC60	SC82	SC91		SC 102	SC 114	SC129	SC138	SC174	SC 177		SC 179	SC 184	SC 219	SC 220	SC 225
P4	°Brix após 24h	9	9	4	9	9	9	9	9	9	9	8	9	9	8,5	9	9	9
F1	°Brix inicial	11	11	9	11	11	11	11	11	11	10	11	11	11	11	11	11	11
	°Brix após 24h	10	10	0,5	10	10	10	10	10	10	9	10	10	10	10	10	10	10
F2	°Brix inicial	12	12	6	12	12	12	12	12	12	11	12	12	12	12	12	12	12
	°Brix após 24h	8	8	0	9	9	9	9	9	9	7	9	9	9	9	9	9	9
	°Brix após 48h	5	5	nd	7	7	7	7	7	7	4	7	7	6	7	7	7	7

Nd: não determinado.

|Dos 16 isolados de *S. cerevisiae* testados, apenas a cepa SC82 foi a que conseguiu terminar a fermentação em seis dias (etapas de multiplicação e de fermentação). Já as demais cepas testadas não conseguiram terminar a fermentação do caldo de cana em menos de 10 dias. Mendes *et al.* (2013) relatam que os processos tradicionais de propagação de leveduras requerem entre 8 e 15 dias, chegando a 30 dias em alguns casos.

Os seis dias estabelecidos nesta pesquisa, com base na sequência das etapas planejadas para o procedimento de multiplicação e de fermentação do caldo de cana para a produção de cachaça, representaram um importante parâmetro para forçar a rápida adaptação ao processo das leveduras

testadas e, com isso, selecionar leveduras que apresentam uma melhor capacidade de adaptação ao substrato em que são inoculadas com respostas fermentativas rápidas. Martins (2013) comenta que, em processos fermentativos, as células de leveduras são expostas a alterações ambientais, tais como os níveis de nutrientes, temperatura, pH, concentração de etanol, concentração de O₂ e outras mudanças. Com isso, a sua capacidade de desenvolver respostas rápidas é importante para que possam sobreviver a tais mudanças, que, muitas vezes, geram estresses e podem comprometer suas funções celulares normais.

Verifica-se, na Tabela 3, que a cepa SC82 apresentou no final da etapa P4 da multiplicação um valor de 4 °Brix, enquanto que as outras cepas testadas apresentaram valores entre 8° e 9 °Brix (Tabela 3). Esse resultado demonstrou um bom desempenho inicial na etapa de multiplicação da cepa SC82, comparando com o valor do Brix teórico de 4,8 °Brix estabelecido nesta pesquisa para a indicação de um metabolismo oxidativo satisfatório durante a etapa de multiplicação.

Considerando a origem das linhagens estudadas (todas de dornas de fermentação de mosto de cana-de-açúcar) e que as etapas P1 a P4 da multiplicação foram realizadas de forma asséptica e com controle de temperatura e agitação, era esperado que a maior parte das leveduras apresentasse um crescimento parecido e satisfatório ao final da etapa P4, e o valor do Brix muito próximo entre elas. Outra característica, que reforça o bom desempenho da cepa SC82, foi o fato dela reduzir o Brix da etapa F1 a 0,5 °Brix, logo depois de 24h. As demais cepas, após 24h de inoculação, reduziram a concentração dos sólidos solúveis totais em apenas 1 °Brix cada (Tabela 3).

Na etapa F2 da fermentação, a cepa SC82 zerou o Brix em 18 horas. Fato que também demonstra um bom desempenho na etapa fermentativa da citada cepa. Por sua vez, as outras cepas testadas não conseguiram zerar o Brix da etapa F2 após 24 horas. Para essas cepas, foi observada uma redução de 3° a 4 °Brix do mosto fermentado (Tabela 3). Mesmo após dois dias do final da etapa F2, não foi verificada melhoria no desempenho fermentativo das leveduras. Pereira, Rosa e Faria (2006) relatam que fermentações com tempo de duração maior que 30h podem estar contaminadas com micro-organismos indesejáveis.

O objetivo das etapas fermentativas F1 e F2 era mimetizar o ambiente do produtor de cachaça, tentando chegar a uma levedura que tivesse a capacidade de se adaptar de forma mais rápida a um meio (caldo de cana) não asséptico e controlado em que ela seria inoculada em possíveis condições industriais, como a ausência de aeração na fase de multiplicação, a falta de controle de temperatura na fermentação e na propagação da levedura, e a grande diversidade de micro-organismos encontrada na microbiota inicial do caldo de cana. Além de ter a capacidade de se multiplicar de forma rápida e, com isso, realizar a fermentação mais rapidamente.

Bosqueiro (2010) relata que fermentações bem conduzidas podem ser identificadas pela formação de uma espuma fina e de um aroma agradável, decorrente dos compostos secundários produzidos durante o processo fermentativo. A cepa SC82, durante as etapas F1 e F2 da fermentação, apresentou uma fermentação com aroma agradável e tempo para fermentar menor que 24h. Já Cardoso (2006) comenta que uma fermentação adequada, geralmente apresenta um aroma agradável, enquanto que aromas desagradáveis geralmente estão associados com fermentações contaminadas.

Um detalhe observado, dentre as leveduras que não obtiveram êxito na fermentação, foi o fato de que apenas os isolados SC174, SC179 e SC184 apresentaram um aroma não agradável, parecido com “ovo podre”, durante a fermentação, bem como durante a etapa de multiplicação. Esse fato não ocorreu com a cepa SC82 que sempre apresentou um aroma agradável durante as etapas de multiplicação e fermentação. É muito provável que as cepas SC174, SC179 e SC184 tenham produzido sulfeto de hidrogênio (H₂S). Zuppardo (2010) comenta que o sulfeto de hidrogênio, ácido sulfídrico ou gás sulfídrico (H₂S), possui odor repugnante, o que, aliado ao seu baixo limite de detecção sensorial, torna a sua presença nas bebidas indesejável, tendo as causas da sua formação relacionadas com o metabolismo das leveduras.

A temperatura é um dos fatores ambientais importantes que influencia as atividades metabólicas dos micro-organismos (BRAGA, 2006). A fermentação conduzida pela cepa SC82, nas etapas fermentativas F1 e F2, apresentou uma temperatura de 35 °C na dorna durante o processo fermentativo. Vieira (2011) comenta que linhagens mesófilas de *S. cerevisiae* crescem em um intervalo compreendido entre a temperatura mínima de 10 °C e máxima de 40 °C, sendo a temperatura ótima entre 28 °C e 35 °C. Já Lima *et al.* (2001) relata que as leveduras crescem melhor em temperaturas próximas à ambiente, sendo a temperatura ótima para a produção de etanol na faixa de 26-35 °C.

Uma vez que todas as cepas de *S. cerevisiae* aqui testadas eram originárias de dornas de fermentação de cachaça artesanal, o desempenho na utilização dos açúcares do mosto nas etapas de multiplicação e de fermentação foi tido como critério de pré-seleção de leveduras boas fermentadoras do caldo de cana. Assim, a cepa SC82 foi escolhida para os ensaios seguintes como cultura iniciadora do processo fermentativo para a produção de cachaça.

3.2 ANÁLISE QUÍMICA DA CACHAÇA PRODUZIDA

Os resultados das análises químicas da cachaça produzida pelo isolado SC82 em condições artesanais (caldo de cana não estéril, temperatura e aeração não controlados), feitos em pequena escala em alambique de cobre, estão apresentados na Tabela 4.

TABELA 4. RESULTADOS DA ANÁLISE QUÍMICA (MOLÉCULAS VOLÁTEIS, CONTAMINANTES ORGÂNICOS E INORGÂNICOS) DA CACHAÇA PRODUZIDA PELA CEPA SC82 E A COMPARAÇÃO COM O VALOR MÁXIMO PERMITIDO POR LEI NO BRASIL (BRASIL, 2005A).

ANÁLISES MOLÉCULAS VOLÁTEIS	RESULTADOS (CEPA SC82)	VALOR MÁXIMO PERMITIDO*
Acidez volátil, expressa em ácido acético, em mg/100ml de álcool anidro	9,9	150
Ésteres totais, expressos em acetato de etila, em mg/100ml de álcool anidro	25,5	200
Aldeídos totais, em acetaldeído, em mg/100ml de álcool anidro	13,5	30
Furfural, em mg/100ml de álcool anidro	< 0,99	5
Soma dos álcoois isobutilícos, isoamílicos e n-propílico, em mg/100ml de álcool anidro	391	360
Soma dos Componentes secundários, em mg/100ml de álcool anidro	440	650
CONTAMINANTES ORGÂNICOS		
Álcool metílico, em mg/100ml de álcool anidro	1,9	20
Carbamato de Etila, em ug/L	< 50	210
Acroleína, em mg/100ml de álcool anidro	< 0,85	5
Álcool séc-butílico, em mg/100ml de álcool anidro	< 0,04	10
Álcool n-butílico, em mg/100ml de álcool anidro	0,4	3
CONTAMINANTES INORGÂNICOS		
Cobre, em mg/L	3,1	5
Chumbo, em µg/L	< 10	200
Arsênio, em µg/L	< 8	100
TEOR ALCOÓLICO REAL, EM % V/V A 20°C	45	38 a 48

*Brasil (2005a).

Verifica-se, na Tabela 4, que todos os componentes químicos analisados estão de acordo com os padrões estabelecidos pela legislação brasileira, com exceção do teor de álcoois superiores, representado pela soma dos álcoois isobutílicos, isoamílicos e n-propílico, que estavam acima do limite permitido pela legislação, apresentando o valor de 391 mg/100ml de álcool anidro.

Segundo Fernandes (2013) e Miranda (2005), a formação de álcoois superiores em cachaça pode ser influenciada pela composição do meio (concentração de açúcar, concentração e tipo de fonte de nitrogênio), fermentação demorada, pela ocorrência de micro-organismos contaminantes e pela linhagem da levedura empregada. Rodrigues Filho e Oliveira (1999) comentam que todo o cuidado deve ser observado na adição de fubá de milho e farelo de arroz para a suplementação da nutrição da levedura durante a etapa de multiplicação, pois o excesso de fubá aumenta a produção de compostos secundários, e o excesso de farelo de arroz diminui a proporção desses compostos.

A formação de álcoois superiores, segundo Léauté (1990), citado por Bortoletto (2013) e Cardoso (2013), também pode ser influenciada pelo processo e o tipo de equipamento utilizado durante a destilação da cachaça.

Com base nesses fatores, supõe-se que o elevado teor de álcoois superiores, encontrado na cachaça produzida em condições de alambique pela cepa SC82, pode ser devido à suplementação do caldo de cana, que foi realizada com fubá de milho e farelo de arroz, na etapa de multiplicação da levedura ou pela própria levedura selecionada utilizada no processo de produção da cachaça. Além do fato de que possíveis problemas no dimensionamento dos componentes do alambique de cobre podem interferir na destilação adequada dos componentes químicos do vinho (fermentado), por não proporcionar refluxo suficiente para separar convenientemente os álcoois superiores (CARDOSO, 2006).

Possibilidades de contaminação microbiana e utilização de fermento fraco durante a produção da cachaça produzida em condições de alambique estão descartados, uma vez que a multiplicação e a fermentação do caldo de cana pelo isolado SC82 foram conduzidas de forma satisfatória, com aroma agradável, reduções rápidas dos teores de Brix, tempo de fermentação menor que 24h e observação por microscopia óptica. Fato este comprovado pela baixa acidez volátil na cachaça produzida em condições de alambique, que foi de 9,9 mg/100ml de álcool anidro, que indica um processo de produção realizado com baixos níveis de contaminação bacteriana (CARDOSO, 2006).

Santos (2013) comenta que níveis elevados de contaminação microbiana podem ser prejudiciais à produção de álcool, devido tanto à competição pelo consumo de açúcares quanto por diminuição da viabilidade das leveduras, em virtude da produção de toxinas e/ou acidificação do meio. O autor comenta que o consumo de sacarose pelas bactérias ocasiona a formação de ácidos orgânicos, especialmente ácido lático e ácido acético, que causam a acidificação.

Diante disso, quanto ao quesito acidez, a cachaça produzida com a levedura SC82 apresentou um baixo teor (9,9 mg/100ml de álcool anidro). Esse resultado indica um processo de produção realizado com boas condições higienicosanitárias e uma fermentação conduzida de forma adequada, com baixos níveis de contaminação bacteriana (CARDOSO, 2006).

Alcarde, Monteiro e Belluco (2012), comparando a composição química de aguardentes de cana-de-açúcar fermentadas por diferentes cepas comerciais da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, obtiveram valores de acidez volátil na faixa de 11,62 a 47,14 mg/100ml de álcool anidro. Os citados autores comentam que a acidez volátil alta corresponde ao parâmetro associado ao principal defeito sensorial em bebidas destiladas. Já Barbosa (2013), visando à caracterização molecular e bioquímica de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* da região de Salinas (MG) para fins de Identificação Geográfica, para o teste de acidez volátil das linhagens testadas, os valores variaram entre 12,87 e 32,68 mg/100ml de álcool anidro, com teor médio de 19,73 mg/100ml de álcool anidro.

Sobre os teores de moléculas voláteis, verificou-se também que o teor de ésteres totais, expressos em acetato de etila, da cachaça produzida pela cepa SC82, apresentou o valor de 25,5

mg/100ml⁻¹ de álcool anidro ácido. Esse valor obtido está dentro do limite permitido pela legislação que é de 200 mg/100ml⁻¹ de álcool anidro ácido.

Os ésteres, ao lado dos álcoois superiores, correspondem aos principais compostos químicos responsáveis pelo sabor e pelo aroma de bebidas destiladas (MONTEIRO, 2010). Os ésteres são produzidos no metabolismo secundário das leveduras durante a fermentação alcoólica e durante o envelhecimento pela esterificação de ácidos graxos com o etanol (SANTOS, 2013).

O principal éster encontrado na cachaça é o acetato de etila, que, em baixas concentrações, incorpora um aroma agradável de frutas à bebida, porém, em altas concentrações, a bebida adquire um sabor indesejável e enjoativo (BARBOSA, 2013). Segundo Etiévant (1991), citado por Santos (2013), Moser (2012) e Monteiro (2010), o acetato de etila não contribui com o aroma de bebidas alcoólicas em concentrações abaixo de 75 mg L⁻¹, e, quando em concentrações acima de 200 mg L⁻¹, confere à bebida um aroma desagradável.

Barbosa (2013), visando à caracterização molecular e bioquímica de linhagens de *S. cerevisiae* da região de Salinas (MG), verificou que as cachaças, produzidas pelas 15 linhagens testadas, apresentaram, em relação aos ésteres, um teor médio do composto de referência (acetato de etila) de 15,5 mg/100ml⁻¹ de álcool anidro, com resultados entre 5,9 e 63,9 mg/100ml⁻¹ de álcool anidro. Já Silva e colaboradores (2006), comparando, por meio de análises químicas e sensoriais, cachaças obtidas pela fermentação com diferentes linhagens de *S. cerevisiae*, encontraram valores para ésteres em acetato de etila entre 9,7 a 32,3 mg/100ml⁻¹ de álcool anidro.

Já os teores de aldeídos totais, expressos em acetaldeído, encontrado na cachaça produzida pela cepa SC82 foi de 13,5 mg/100ml⁻¹ de álcool anidro. Esse valor obtido está dentro do limite permitido pela legislação, que é de 30 mg 100mL⁻¹ de álcool anidro ácido.

Silva e colaboradores (2009), avaliando a produção de cachaças em escala de laboratório a partir de leveduras isoladas de alambiques de diferentes regiões de Minas Gerais, verificaram que, aproximadamente, 64% das amostras superaram o valor máximo legal de aldeídos, com valores entre 20,68 a 178,60 mg/100ml⁻¹ de álcool anidro ácido. Por sua vez, Silva e colaboradores (2006), comparando, por meio de análises químicas e sensoriais, cachaças obtidas pela fermentação com diferentes linhagens de *S. cerevisiae*, encontraram valores para acetaldeídos entre 12,9 a 23,4 mg/100ml⁻¹ de álcool anidro.

Os aldeídos, principalmente o acetaldeído, são compostos carbonílicos muito voláteis, resultante da ação de leveduras durante estágios preliminares do processo de fermentação, tendendo a desaparecer no estágio final, desde que não ocorra aeração, bem como também são componentes químicos responsáveis pelo aroma e pelo sabor das cachaças (CARDOSO, 2013). De modo geral, ocorre aumento excessivo na formação de aldeídos quando se faz aeração do mosto durante a fermentação, por isso recomenda-se não aerar e sequer remexer o mosto durante essa etapa (FERNANDES, 2013).

De acordo com Oliveira (2012), do ponto de vista toxicológico, sabe-se que o acetaldeído é extremamente reativo e, em quantidade elevada, pode causar grandes danos ao sistema nervoso central. Moreira, Netto e Maria (2012) comentam que um conteúdo reduzido de aldeídos nas aguardentes é frequentemente relacionado a bebidas de qualidade superior. Em geral, aldeídos com até oito átomos de carbono, tais como acetaldeído e furfural, apresentam odores penetrantes, geralmente enjoativos, que são considerados indesejáveis para a cachaça (SOARES, SILVA e SCHWAN, 2011). Cardoso (2013) relata que os aldeídos podem possuir desde odor penetrante, muitas vezes enjoativo e indesejável em bebidas destiladas, a aroma agradável, dependendo do composto e da sua concentração.

Ainda em relação às substâncias voláteis presentes na cachaça, verificou-se que o teor de furfural encontrado foi menor que 0,99 mg/100ml⁻¹ de álcool anidro. Esse valor está bem abaixo do limite máximo estabelecido pela legislação brasileira para a cachaça que é de 5 mg/100ml⁻¹ de álcool anidro.

O furfural e o hidroximetilfurfural são aldeídos indesejáveis na bebida, pois conferem à cachaça aroma penetrante e enjoativo. A formação desses compostos pode estar relacionada com a queima da palha da cana-de-açúcar, que provoca a desidratação de fração de açúcares presentes na cana, bem como pode ser devido à presença de açúcares residuais (MOSER, 2012). Cardoso (2006) relata que, na destilação, períodos prolongados de aquecimento do mosto fermentado produzem principalmente o furfural, mediante a decomposição térmica de açúcares residuais e matéria orgânica ou bagacilhos do vinho depositados no fundo do alambique, o que pode ser evitado utilizando mosto fermentado sem excesso de matéria em suspensão.

No presente estudo, acredita-se que o aparecimento de furfural na cachaça produzida pela cepa SC82 se deva pela presença de açúcares residual no vinho, visto que, no processo de produção da bebida, a colheita da cana-de-açúcar foi feita sem queima do canavial, prática esta adotada e comum na produção da cachaça de alambique pelos produtores, bem como foi feita a filtração do vinho (mosto fermentado) antes de ser adicionado no alambique para a destilação.

Em relação à presença de contaminantes orgânicos, verificou-se que o teor de metanol encontrado na cachaça produzida pela cepa SC82 foi de 1,9 mg/100ml⁻¹ de álcool anidro, constatando-se que esse teor encontrado está bem abaixo do limite máximo estabelecido pela legislação que é de 20 mg /100ml⁻¹ de álcool anidro.

O metanol é um álcool indesejável na bebida devido a sua alta toxidez, e se origina da degradação da pectina, um polissacarídeo presente na cana-de-açúcar, que é formada pela associação de centenas de moléculas de ácido galacturônico, que possuem fragmentos de moléculas de metanol, as quais são liberadas durante o processo de fermentação (CARDOSO, 2006). Sua presença pode estar ligada a uma filtração inadequada do caldo, o que possibilita a presença de bagacilhos no processo fermentativo, cuja pequena quantidade de pectina pode ser degradada (em condições ácidas) dando origem ao metanol (PEREIRA, ROSA e FARIA, 2006).

A presença de metanol é indesejada nas bebidas alcoólicas, pois pode causar sintomas tóxicos, como, por exemplo, dor de cabeça, vertigem e vômitos (MOREIRA, NETTO e MARIA, 2012). Além disso, se ingerido durante longo período, mesmo em doses pequenas, pode levar o indivíduo à cegueira e até mesmo à morte, pois provoca acidose e disfunção celular. Bortoleto (2013) comenta que, na cachaça, o metanol é formado pela degradação de bagacilhos da cana-de-açúcar, fibra que contém pectina, quando inicialmente não é separado do caldo por filtração, bem comonormalmente o teor de álcool metílico em destilados de cana-de-açúcar é baixo devido ao conteúdo de pectina na cana ser baixo.

Diante disso, durante o processamento da cana-de-açúcar, cuidados redobrados devem ser considerados no processo de filtração e decantação do caldo de cana que acabou de ser moído, bem como na regulagem da moenda para evitar a presença de bagacilhos de cana no caldo que será enviado para a fermentação, e que podem favorecer a presença de metanol na cachaça. Por isso é muito importante que a filtração e a decantação do caldo de cana, bem como a regulagem da moenda, sejam muito bem realizadas e constantemente acompanhadas para que os teores de metanol sejam sempre mantidos bem abaixo do limite estabelecido pela legislação, já que a sua presença na bebida é esperada em virtude da presença de substâncias pécticas dissolvidas no caldo durante a moagem da cana-de-açúcar (BORTOLETTO, 2013).

O teor de acroleína encontrado na cachaça produzida foi menor que 0,85 mg/100ml⁻¹ de álcool anidro. Percebe-se que é um valor bem abaixo do máximo que é permitido pela legislação, que é de 5 mg/100ml⁻¹ de álcool anidro.

A acroleína, também conhecida como 2-propenal, é uma substância carcinogênica oriunda do processo de fermentação, podendo ser formada pela desidratação do glicerol ou por contaminação bacteriana (Zacaroni et al., 2011). Segundo Oliveira (2012), a acroleína é formada pela reação do glicerol produzido pelas leveduras com o beta-hidroxipropionaldeído sintetizados por contaminantes bacterianos. Fernandes (2013) relata que a acroleína possui gosto amargo, odor penetrante e apimentado, e pode ser formada pela desidratação do glicerol, produto da fase inicial

da fermentação, na presença de ácidos, a quente, quando em contato com as superfícies metálicas da coluna de destilação.

Fernandes (2013), avaliando as variações na composição físico-química da cachaça de alambique produzida usando uma mesma levedura selecionada sob condições controladas de fermentação e de destilação a partir de cinco cultivares de cana-de-açúcar, verificou que, nas 45 amostras de cachaças produzidas, não foi detectada a presença de acroleína na bebida. Já ZACARONI et al. (2011), avaliando a presença de contaminantes orgânicos e inorgânicos em aguardentes de cana da região sul de Minas Gerais, verificaram valores para os teores de acroleína de não detectado a 7,45 mg/100ml⁻¹ de álcool anidro.

Na literatura, são encontrados poucos relatos sobre a quantificação de acroleína em cachaça, em que se configura a necessidade de mais pesquisas voltadas para o estudo desse contaminante que apresenta efeitos tóxicos à saúde das pessoas por todas as vias de administração, bem como não está bem elucidado seu comportamento químico com o envelhecimento da bebida, além da necessidade de estudos sobre seus efeitos químicos em baixas concentrações para a saúde dos consumidores de cachaça.

O carbamato de etila, substância altamente carcinogênica, é um contaminante orgânico, cuja quantificação em cachaças passou a ser exigida pela legislação brasileira a partir de junho de 2010, que estabelece a quantidade não superior a 210 µg L⁻¹. O teor de carbamato de etila encontrado na cachaça produzida pela cepa SC82 foi menor que 50 µg L⁻¹. Esse valor corresponde aproximadamente a 33 % do valor máximo permitido pela legislação para carbamato de etila, o que representa um teor bem abaixo do estabelecido pela lei. Quanto menor esse valor, melhor será a qualidade da bebida e principalmente para a saúde dos consumidores, uma vez que o carbamato de etila é uma substância reconhecidamente genotóxica e carcinogênica (OLIVEIRA, 2012).

Vieira, em 2011, objetivando quantificar carbamato de etila durante a fermentação e destilação de bebida alcoólica elaborada a partir de diferentes mostos, encontrou nos destilados produzidos teores de carbamato de etila variando de 54 a 110 µg L⁻¹. Já Masson (2009), avaliando as concentrações de carbamato de etila, acroleína e outros componentes de aguardentes de cana coletadas de produtores das regiões norte e sul de Minas Gerais, verificou que, das 71 amostras analisadas, 29,57% encontraram-se fora da legislação brasileira quanto ao teor de carbamato de etila, com teores variando de 22,6 a 980 µg L⁻¹.

De acordo com Masson (2009), a falta de boas práticas de produção e a utilização de equipamentos tecnologicamente defasados favorece a contaminação da bebida, principalmente por carbamato de etila e aldeídos, dificultando a comercialização no mercado externo, em decorrência das exigências dos países importadores quanto à presença e teor dessas substâncias na bebida.

Os possíveis mecanismos de formação do carbamato de etila em bebidas alcoólicas ainda não se encontram claramente estabelecidos (FERNANDES, 2013; ZACARONI et al., 2011; MASSON, 2009), por isso devem ser intensificadas pesquisas envolvendo esse composto químico para serem elucidados seus mecanismos de formação e medidas de prevenção da contaminação em bebidas alcoólicas, particularmente na cachaça, com intuito de esclarecer e orientar os produtores na produção de cachaça de qualidade, além da segurança a saúde dos consumidores.

Já o teor de álcool sec-butílico encontrado na cachaça produzida pela cepa SC82 foi menor que 0,04 mg/100ml⁻¹ de álcool anidro, enquanto que o teor de álcool n-butílico foi igual a 0,4 mg/100ml⁻¹ de álcool anidro. Esses valores estão bem abaixo do máximo permitido pela legislação para cachaça, que é de 10 mg/100ml⁻¹ de álcool anidro para o álcool sec-butílico e 5 mg/100ml⁻¹ de álcool anidro para o álcool n-butílico.

Cardoso (2013), investigando a correlação entre os resultados de avaliação sensorial e de composição química de amostras de cachaça nova produzidas em alambiques de Salinas (MG), constatou que, das 24 amostras analisadas, os teores de álcool sec-butílico variaram de não detectável a 9,52 mg/100ml⁻¹ de álcool anidro, enquanto que os teores de álcool n-butílico variaram de 0,33 a 31,14 mg/100ml⁻¹ de álcool anidro, com três amostras acima do limite estabelecido pela legislação.

Segundo França Junior (2008), o aumento dos teores dos álcoois n-butílico (1-butanol) e sec-butílico (2-butanol) é relacionado à presença de bactérias, podendo comprometer a qualidade da cachaça, bem como o 1-butanol pode ser produzido como coproducto da acetona e do etanol, pela fermentação de certos carboidratos por bactérias anaeróbicas. Pereira (2007) comenta que a formação do álcool n-butílico nas bebidas alcoólicas está diretamente relacionada com a linhagem da levedura, os nutrientes presentes no meio, a temperatura, o pH, a presença de compostos nitrogenados e a certos aminoácidos. Cabe destacar que, na literatura científica, existem poucas pesquisas envolvendo a quantificação dos álcoois sec-butílico e n-butílico em bebidas alcoólicas para um maior esclarecimento sobre seus mecanismos de formação e prevenção na cachaça e seus efeitos químicos em concentrações elevadas.

Sobre os contaminantes inorgânicos encontrados na cachaça produzida pela cepa SC82, verificou-se que o teor de cobre encontrado foi de $3,1 \text{ mg L}^{-1}$. Esse valor encontrado está abaixo do limite máximo estabelecido pela legislação, que é de 5 mg L^{-1} .

Silva et al (2012), verificando a conformidade físico-química com a legislação vigente de aguardentes de cana-de-açúcar produzidas na microrregião de Itapetinga (BA), encontraram teores de cobre nas cinco amostras de cachaças analisadas com valores de $2,55 \text{ mg L}^{-1}$; $4,37 \text{ mg L}^{-1}$; $7,63 \text{ mg L}^{-1}$; $8,8 \text{ mg L}^{-1}$ e $21,45 \text{ mg L}^{-1}$. França, Sá e Fiorini (2011), avaliando a qualidade da cachaça produzida artesanalmente no município de Passos (MG), por meio da quantificação dos teores de cobre, acidez acética e graduação alcoólica, constataram que, das oito amostras analisadas, 75%, ou seja, seis amostras, estavam com os teores de cobre fora da especificação determinada pela legislação; com um valor máximo detectado de $19,92 \text{ mg L}^{-1}$. Apenas 25% das amostras analisadas estavam em consonância com a legislação vigente, com valores de $4,64 \text{ mg L}^{-1}$ e $3,08 \text{ mg L}^{-1}$ de cobre. Já Miranda e colaboradores (2007), fazendo um levantamento de marcas comerciais de cachaça e aguardente quanto à conformidade com os padrões de identidade e qualidade previstos pela legislação vigente, verificaram que, das 94 amostras de cachaças analisadas, 15% apresentaram teor de cobre acima do limite estabelecido, com valor máximo verificado de 12 mg L^{-1} .

Portanto, em muitas pesquisas envolvendo a quantificação de cobre, são encontradas contaminações de cachaça com cobre, fato este que configura a necessidade de uma preocupação ainda maior por parte dos produtores em resolver esse problema, buscando atender às exigências legais e, com isso, alcançar mercados maiores, bem como produzir uma bebida de qualidade e segura à saúde dos consumidores.

O cobre corresponde a um íon metálico importante ao corpo humano devido a sua atividade funcional, estrutural e biológica, bem como possui um papel de catalisador de algumas reações fisiológicas oxidativas importantes como a fosforilação oxidativa, inativação de radicais livres, biossíntese de colágeno, entre outros (MONTEIRO, 2010). O excesso de cobre pode ser tóxico ao organismo devido a sua afinidade com grupos S-H de muitas proteínas e enzimas, causando doenças como a epilepsia, melanoma e artrite reumatoide, bem como a perda de paladar (MOSER, 2012). Vale reforçar que a contaminação de cobre na Cachaça de Alambique ocorre na etapa da destilação da bebida, pois, como corresponde ao metal de construção dos alambiques, quando o cobre se oxida, forma-se uma camada esverdeada de nome azinhavre, composta por carbonato básico de cobre, na superfície do metal, e, durante a destilação, essa camada é dissolvida e arrastada pelos vapores alcoólicos ácidos, contaminando a bebida (CARDOSO, 2006).

Outro detalhe é que o cobre contamina a cachaça de alambique quando não ocorre uma higienização adequada do alambique, por isso o alambique deve ser obrigatoriamente limpo depois de toda destilação, esfregando-se as paredes internas, utilizando-se água potável e uma escova ou vassoura exclusiva para essa atividade, bem como, ao final da safra de produção da cachaça, tanto o alambique quanto a serpentina devem ficar completamente cheios de água durante a entressafra e, quando do início da nova safra, toda a parte interna do alambique deverá ser lavada com água potável acidificada (GONÇALVES, ROSA e UETANABARO, 2009). Cardoso (2013) comenta que o cobre é um dos metais indesejáveis na cachaça e a contaminação da bebida por íons de cobre é

considerada como entrave à exportação, já que a legislação em outros países não tolera mais que 2 mg L⁻¹ de cobre nos destilados alcoólicos.

Ainda sobre os contaminantes inorgânicos presentes na cachaça produzida pela cepa SC82, verificou-se que o teor de chumbo encontrado foi menor que 10 µg L⁻¹, enquanto que o teor de arsênio foi menor que 8 µg L⁻¹. Esses valores estão bem abaixo do máximo permitido pela legislação para cachaça, que é de 200 µg L⁻¹ para o teor de chumbo e 100 µg L⁻¹ para o teor de arsênio.

O chumbo e o arsênio podem estar presentes na cachaça devido a soldas nos alambiques e em outros equipamentos e utensílios; a água usada na produção da cachaça; aos encanamentos de chumbo; as tintas, as rolhas e as tampas manufaturadas com ligas contendo chumbo; e ao desgaste mecânico e corrosão de equipamentos (FERNANDES, 2013; MASSON, 2009; FRANÇA JUNIOR, 2008). Diante disso, os produtores de cachaça de alambique devem estar atentos às citadas causas das possíveis formas de contaminação da bebida por chumbo e arsênio, visto que se tratam de compostos químicos tóxicos que, em concentrações elevadas, podem ocasionar sérios problemas de saúde, como intoxicação aguda e crônica e câncer (MASSON, 2009), aos consumidores da bebida contaminada.

Estudos devem ser conduzidos com relação à influência de determinadas concentrações, mesmo baixas, de contaminantes orgânicos e inorgânicos, além de alguns componentes secundários como acetaldeídos, furfural e álcoois superiores, que podem estar presentes na composição química de cachaças, visando a um maior esclarecimento e entendimento dos seus mecanismos de formação, influência sensorial e química na qualidade da bebida, formas de prevenção da contaminação, além, é claro, buscando a proteção à saúde dos apreciadores da bebida.

A busca por linhagens selecionadas de *S. cerevisiae*, para serem utilizadas como culturas iniciadoras, pode constituir-se em uma alternativa importante para a melhoria do desempenho do processo fermentativo de produção de cachaça em termos de baixa acidez e menor tempo de fermentação, bem como para a obtenção de uma bebida com boas qualidades químicas (OLIVEIRA *et al.*, 2005), conforme observado nesta pesquisa com a utilização da cepa SC82.

Assim, o uso de linhagens selecionadas de *S. cerevisiae*, isoladas do processo de fermentação espontânea para a produção de cachaça, possibilitou a realização de fermentações sem contaminações, aroma agradável, rápido consumo de açúcar, menor tempo fermentativo e a produção de uma bebida com boa qualidade química.

4. CONCLUSÕES

O bom desempenho, observado nesta pesquisa, da *S. cerevisiae* SC82, com relação ao consumo de açúcar (diminuição do Brix) do caldo de cana nas etapas de propagação e de fermentação, aliado ao tempo para fermentar (menor que 24 horas), indicam seu potencial como cultura iniciadora do processo fermentativo e sua utilização num sistema de produção de maior volume de cachaça.

Estudos fazem-se necessários para elucidar a possibilidade de contribuição da referida cepa no aumento do teor de álcool superior, bem como do efeito da suplementação do caldo de cana com fubá de milho e farelo de arroz na produção de álcoois superiores, além de outros fatores relacionados ao tipo do equipamento de pequeno porte usado para a destilação, que podem ter realmente contribuído para o aumento do teor de álcoois superiores.

PRODUCTION AND CHEMICAL ANALYSIS OF ARTISAN CANE SPIRIT PRODUCED IN A STILL WITH A SELECTED *SACCHAROMYCES CEREVIAE* STRAIN

ABSTRACT

The yeasts and the fermentation conditions are pointed as factors that influence the flavor of alcoholic beverages, because most of the secondary compounds responsible for the sensory quality of the beverage are formed during fermentation. The use of selected yeasts for cachaça production has been researched, aiming at increasing productivity, technological advantages, and improvement of the sensorial characteristics of the beverage. Thus, the present work aimed to verify the chemical quality of the artisanal cachaça produced in copper alembic by yeast selected based on the consumption of sugars (°Brix) during cell multiplication and fermentation of the sugar cane juice, as well as the time elapsed to finish the fermentation. Sixteen strains of *S. cerevisiae* previously isolated from fermentation tanks of artisan distilleries located in the state of Bahia were tested. Considering sugar consumption parameters during the multiplication and fermentation stages, the *S. cerevisiae* strain SC82 was chosen for the production of cachaça in a copper still on a small scale (10 L). However, the values of higher alcohols would be above what is allowed by legislation. Factors such as the strain used, presence of contaminating microorganisms in the fermentation, concentration of organic supplements added in fermentation, and the type of equipment used in distillation, may be influencing the production of these higher alcohol.

Keywords: Cachaça, selected yeast, chemical analysis, alcoholic fermentation.

REFERÊNCIAS

ALCARDE, A.R.; MONTEIRO, B.M.S.; BELLUCO, A.E.S. Chemical composition of sugar cane spirits fermented by different *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. Quim. Nova. v. 35, n. 8, p. 1612-1618, 2012.

1. BARBOSA, E. A. Caracterização molecular e bioquímica de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* da região de salinas para fins de identificação geográfica. 140 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.
2. BORTOLETTO, Aline Marques. Composição química de cachaça maturada com lascas tostadas de madeira de carvalho proveniente de diferentes florestas francesas. 2013. 80p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, 2013.
3. BOSQUEIRO, A.C. Composição química da aguardente de cana-de-açúcar ao longo do processo de dupla destilação em alambique simples. 84 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. CARDOSO, D.C. Correlação entre a qualidade sensorial e a composição química da Cachaça de Alambique nova. 188 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.
8. CARDOSO, M.G.C. Produção de Aguardente de Cana. 2 ed. Lavras:Editora UFLA, 2006. 445 p.
9. CLETO, F.V.G.; RAVANELI, G.C.; MUTTON, M.J.R. Effects of corn meal and sulphuric acid on the production of cachaça. Ciênc. Agrotec. v. 33, n. 5, p. 1379-1384, 2009.
10. ETIÉVANT, P. X. Wine. In: MAARSE, H. Volatile Compounds in Foods and Beverages. New York: Marcel Dekker, Cap. 14, p. 483-546, 1991.

11. FERNANDES, O. W. B. Avaliação da composição físico-química da cachaça de alambique obtida de cinco cultivares de cana-de-açúcar colhidas em três épocas de maturação. 115 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.
12. FRANÇA, Norival. SÁ, Odila Rigolin de. FIORINI, João Evangelista. Avaliação da qualidade da cachaça artesanal produzidas no município de Passos (MG). Ciência et Praxis, v. 4, n. 7, 2011.
13. FRANÇA JUNIOR, Adalcino. Influência do fracionamento no destilado para a otimização da produção da Cachaça de Alambique: Uma prática pedagógica no processo produtivo. 2008. 123p. (Dissertação de Mestrado) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rio de Janeiro, 2008.
14. GONÇALVES, Cleber Miranda. ROSA, Carlos Augusto. UETANABARO, Ana Paula Trovatti. Manual de Boas Práticas de Fabricação da Cachaça de Alambique. Ilhéus, BA: Editus, 80p. 2009.
15. LÉAUTÉ, R. Distillation in alambic. Am. J. Enol. Vitic. v. 41, n. 1, p. 90-103, 1990.
16. LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo:Edgar Blucher. v. 3, n. 1, 2001. 593 p.
17. MAIA, A. B. R. A.; CAMPELO, E. A. P. Tecnologia da cachaça de alambique. Belo Horizonte: Sebrae/MG/Sindbebidas, 2006. 129p.
18. MASSON, José. Determinação dos teores de carbamato de etila e acroleína em aguardentes de cana produzidas em Minas Gerais. 2009. 108p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, 2009.
19. MENDONÇA, J.G.P. Análise de carbamato de etila em cachaças de alambique produzidas por levedura selecionada e fermentação espontânea. 128 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
20. 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.
21. MENDES, T.A.O.; PINTO, L.M.; MENDES, D.S.O.; MALTA, H.L.; OLIVEIRA, E.S. Increase in yeast biomass production in batch and semi-continuous aerated propagators in the production of sugarcane spirit. Braz. J. Food Technol. v. 16, n. 2, p. 81-89, 2013.
22. MIRANDA, Mariana Branco de; MARTINS, Nilo Gustavo Souza; BELLUCO, André Eduardo de Souza; HORII, Jorge; ALCARDE, André Ricardo. Qualidade química de cachaças e de aguardentes brasileiras. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 27(4): 897-901, out.-dez. 2007.
23. MIRANDA, M.B. Avaliação físico-química de cachaças comerciais e estudo da influência da irradiação sobre a qualidade da bebida em tonéis de carvalho. 86 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
24. MONTEIRO, Bruno Miguel dos Santos. Composição química de aguardente de cana-de-açúcar obtidas por fermentação com diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. 2010. 73p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, 2010.
25. MOREIRA, Ricardo F. A. NETTO, Claudia C. MARIA, Carlos A. B. de. A fração volátil das aguardentes de cana produzidas no Brasil. Quim. Nova, v. 35, n. 9, p. 1819-1826, 2012.
26. MOSER, Alexandre de Souza. Efeito da micro-oxigenação na qualidade química e sensorial da cachaça não envelhecida. 2012. 86p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, 2012.
27. OLIVEIRA, Sônia Paula Alexandrino de. Níveis de congêneres, carbamato de etila e outros contaminantes em runs e uísques de consumo popular no Brasil. 2012. 87p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, 2012.
28. 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.
29. 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.
30. PEREIRA, A.F. Suplementação de nitrogênio sobre a fermentação alcoólica para produção de cachaça, cerveja e vinho. 113 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
31. PEREIRA, J.A.; ROSA, C.A.; FARIA, J.B. Cachaça de Alambique. Brasília(Brasil):LK Editora e Comunicação, Coleção Tecnologia Fácil, 2006. 180 p.

32. PEREIRA, N.E.; CARDOSO, M.G.; AZEVEDO, S.M.; MORAIS, A.R.; FERNANDES, W.; AGUIAR, P.M. Secundary compounds in brazilian sugar-cane spirits ("cachaça") manufactured in Minas Gerais state. Ciênc. agrotec. v. 27, n. 5, p. 1068-1075, 2003.
33. RODRIGUES FILHO, A.; OLIVEIRA, R.N. Tecnologia de Produção de Cana-de-Açúcar e Cachaça de Minas de Qualidade. EMATER, Belo Horizonte, 1999. 75 p.
34. SANTOS, T. M. Avaliação da influência de bactérias lácticas isoladas da região de Salinas/MG, em fermentações consorciadas com leveduras selecionadas, na composição físico-química e sensorial de cachaças. 102 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.
35. STROPPA, C.T.; ALVES, J.G.L.F.; FIGUEIREDO, A.L.F.; CASTRO, C.C. Kinetic parameters of yeasts strains isolated from cachaça distilleries in Minas Gerais/Brazil. Ciênc. agrotec. v. 33, p. 1978-1983, 2009.
36. SILVA, Marcondes Viana; DIAS, Fabíola Morais; ALEXANDRINO, Daniela Marques; OLIVEIRA, Jussimara Barros de; BOTÉLHO, Poliana Souza. Caracterização físico-química de aguardentes artesanais de cana-de-açúcar produzidas na região Sudoeste da Bahia. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.14, n.2, p.197-202, 2012.
37. SILVA, A.F. Caracterização genética de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de fermentações artesanais de cachaças da Bahia. 115 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.
38. SILVA PHA, Santos JO, Araújo LD, Faria FC, Pereira AF, Oliveira VA, Vicente MA, Brandão RL. Chromatographic evaluation of volatile compounds in brazilian sugar cane spirits produced with yeasts from different locations. Ciênc. Tecnol. Aliment. 2009; 29(1):100-106.
39. SILVA, Carol Líliam Coelho; ROSA, Carlos Augusto; MAIA, Amazile Biagionil Ribeiro de Abreu; OLIVEIRA, Evelyn Souza. Qualidade química e sensorial de cachaças produzidas com quatro linhagens de *saccharomyces cerevisiae* (floculantes, não-produtoras de H₂S e de referência). B.CEPPA, Curitiba v. 24, n. 2, p. 405-422, jul./dez. 2006.
40. SOARES, T.L.; SILVA, C.F.; SCHWAN, R.F. Monitoring the fermentation process for cachaça production using microbiological and physico-chemical methods with different *Saccharomyces cerevisiae* isolates. Ciênc. Tecnol. Aliment. v. 31, n. 1, p. 184-187, 2011.
41. 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.
42. ZACARONI, Lidiane Mendonça. CARDOSO, Maria das Graças. SACZK, Adelir Aparecida. SANTIAGO, Wilder D. ANJOS, Jeancarlo Pereira dos. MASSON, José. DUARTE, Felipe C. NELSON, David Lee. Caracterização e quantificação de contaminantes em aguardentes de cana. Quim. Nova, v. 34, n. 2, p. 320-324, 2011.
43. 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.

AGRADECIMENTOS

Aos produtores de cachaça da Bahia, Brasil, em especial a Cachaça Rio do Engenho, pelo apoio, à Agroindústria da UESC pelo suporte técnico experimental, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela disponibilização da bolsa de estudos e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo suporte financeiro.