

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**CARACTERÍSTICAS FERMENTATIVAS, FORMAÇÃO DE
COMPOSTOS VOLÁTEIS E QUALIDADE DA AGUARDENTE DE
CANA OBTIDA POR LINHAGENS DE LEVEDURAS ISOLADAS DE
DESTILARIAS ARTESANAIS**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Evelyn de Souza Oliveira** aprovada pela Comissão Julgadora em 31 de agosto de 2001.

Campinas, 31 de agosto de 2001

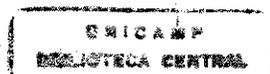

Prof. Dr. Gil Eduardo Serra
Presidente da Banca

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

Evelyn de Souza Oliveira
Engenheira Química

Orientador: Prof. Dr. Gil Eduardo Serra

**Campinas – SP
2001**



**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

UNIDADE 80
 N.º CHAMADA:
T/ UNICAMP
OL4c
 V. Ex.
 COMBO BC/ 96976
 PROC. 6.392/01
 C D
 PREC. R\$ 11,00
 DATA 02/11/01
 N.º CPD

CM00161230-1

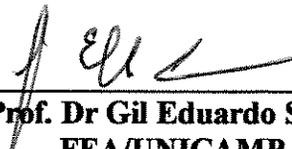
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

OL4c Oliveira, Evelyn de Souza
 Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais / Evelyn de Souza Oliveira. – Campinas, SP: [s.n.], 2001.

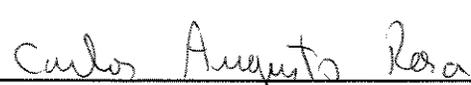
Orientador: Gil Eduardo Serra
 Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Fermentação. 2.Cachaça. 3.Aguardente. 4.Cana-de-açúcar. 5.Saccharomyces. I.Serra, Gil Eduardo.
 II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

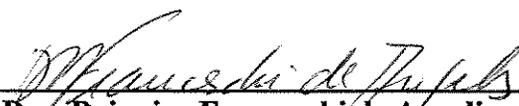
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Gil Eduardo Serra
FEA/UNICAMP
Orientador



Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa
ICB/UFMG
Membro



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



Prof. Dr. Fernando Valadares Novaes
ESALQ/USP
Membro



Prof. Dr. João Bosco Faria
FAC.FARMÁCIA/UNESP
Membro

Prof. Dr. Jorge Horii
ESALQ/USP
Membro

Prof. Dra. Helena Maria André Bolini Cardello
FEA/UNICAMP
Membro

2012 5033

Aos meus queridos pais (in memoriam), Ana e Sebastião

Às minhas irmãs e amigas Lillian e Dete

Dedico

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Ao Simeão por tudo que representa na minha vida
Ofereço

“Aspira a vencer e vencerás, mas lembra-te de que vencer sem abrir os caminhos da vitória para os outros é avançar para o tédio da inutilidade sob o frio da solidão”

(Francisco Cândido Xavier pelo Espírito de Emmanuel)

HOMENAGEM

Ao Prof. Dr. Gil Eduardo Serra, pelo exemplo profissional e humano, por ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho, pela orientação, grande amizade, dedicação, consideração e respeito, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela presença constante em minha vida, pela oportunidade de aprender e de poder transmitir os conhecimentos adquiridos.

À minha amada mãe, símbolo de força e alegria, você foi a mão a me amparar nas quedas, a me incentivar nos desafios, a me aplaudir nas vitórias. Você é a luz que ilumina meu caminho e me ensina que o amor e a gratidão são eternos. Você foi e sempre será o dom mais precioso da minha vida, minha amiga, meu anjo protetor.

Ao meu pai lembro-me com saudades da sua generosidade, da sua fé, do seu otimismo e vontade de vencer. Aprendi muito com você.

À Lilian, minha querida irmã, amiga e companheira, sempre me apoiando, incentivando e acreditando em mim, você é imprescindível na minha vida, obrigada por tudo.

Ao Simeão, obrigado pelo apoio, incentivo, por estar sempre ao meu lado, nos momentos alegres e tristes, juntos estamos aprendendo muitas coisas, amor, respeito e paciência.

Aos meus familiares que sempre me apoiaram e acreditaram em mim, minha gratidão.

À Elisângela pela amizade, apoio e compreensão nos momentos de incertezas e dúvidas e por ter contribuído com muita dedicação e empenho durante a produção das aguardentes e análise sensorial.

À Carolina pela amizade, e por ter contribuído com muita boa vontade nos experimentos de produção das aguardentes.

À Jamila, esposa do Prof. Gil, pela amizade, carinho e atenção com que sempre me recebeu em sua casa.

À grande amiga Rosemary que mesmo distante, está sempre me transmitindo amor, coragem e apoio.

Aos amigos, Marisa, Mariângela, Tereza, Márcia, Rosane, Flávio, Leonel, Miriam, Beth, Jorge, Márcio, pela convivência, solidariedade e estímulo.

Aos colegas de trabalho da Faculdade de Farmácia da UFMG pelo apoio e incentivo. Aos funcionários, Ana Koon, Priscila, Ana Lourdes e Adalton, do Departamento de Tecnologia de Alimentos-FEA-UNICAMP, pela convivência e amizade.

Ao Prof. Dr. Carlos A. Rosa, por ter cedido a maioria das linhagens de leveduras utilizadas neste trabalho, pela disponibilidade, sugestões e correções efetuadas.

À Profª. Dra. Helena M. A. B. Cardello, pela colaboração nas análises sensoriais.

Ao Marcelo Antônio Morgano pela colaboração nas análises estatísticas.

Aos Professores Dra. Dejanira Franceschi de Angelis, Dr. Fernando Valadares Novaes e Dr. João Bosco Faria, pelas valiosas contribuições na correção do texto preliminar.

Ao professor Silvio R. Andrietta pela colaboração e por ter permitido o uso do Laboratório de fermentação e os equipamentos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Química, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP).

Ao Químico Elson Luiz Rocha de Souza, Responsável pelo Laboratório de Bebidas do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária em Andradas-MG, pela colaboração na análise de componentes voláteis das aguardentes.

Ao Engenheiro Agrônomo Sérgio A. Carra, da Agrária Amparo Agrícola Ltda, pela doação do Alambique utilizado neste trabalho.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos-UNICAMP.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida e à Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG, pela liberação durante a realização do doutorado.

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

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

SUMÁRIO

RESUMO	xvii
SUMMARY	xx
INTRODUÇÃO	1
Capítulo 1	
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1. Leveduras na Produção de Aguardente de Cana e outras Bebidas Alcoólicas ..	5
2.2. Fatores que Influenciam a Formação e a Composição dos Compostos Voláteis nas Aguardentes de Cana e outras Bebidas Alcoólicas	7
.....	
2.2.1. Leveduras e Condições de Fermentação	7
2.2.2. Destilação	13
2.3. Compostos Voláteis na Aguardente de Cana e Bebidas Alcoólicas:	
Mecanismo de Formação e sua relação com a Qualidade e o Sabor	19
2.3.1. Etanol	23
2.3.2. Álcoois superiores	24
2.3.3. Aldeídos	28
2.3.4. Acetais	31
2.3.5. Diketonas	31
2.3.6. Ácidos orgânicos	32
2.3.7. Ésteres	37
2.3.8. Outros constituintes	43
2.3.8.1. Glicerol	43
2.3.8.2. Compostos sulfurados	43
3. Referências Bibliográficas.....	44
Capítulo 2	
CARACTERÍSTICAS FERMENTATIVAS DE LEVEDURAS ISOLADAS DE FERMENTAÇÕES EM DESTILARIAS ARTESANAIS DE AGUARDENTE DE CANA	
Resumo	59

Summary.....	60
1. Introdução	61
2. Material e Métodos.....	64
3. Resultados e Discussão.....	67
4. Conclusões	76
5. Referências Bibliográficas	76

Capítulo 3

**AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS EM DESTILARIAS
ARTESANAIS DE AGUARDENTE DE CANA EM FUNÇÃO DA FORMAÇÃO
DE COMPOSTOS VOLÁTEIS**

Resumo	81
Summary.....	82
1. Introdução	83
2. Material e Métodos	85
3. Resultados e Discussão.....	88
4. Conclusões.....	97
5. Referências Bibliográficas	99

Capítulo 4

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES LINHAGENS DE LEVEDURA NA
COMPOSIÇÃO E QUALIDADE SENSORIAL DA AGUARDENTE DE CANA**

Resumo	105
Summary	106
1. Introdução	108
2. Material e Métodos	111
3. Resultados e Discussão	114
4. Conclusões.....	130
5. Referências Bibliográficas	131

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

RESUMO

Foram avaliadas 30 linhagens de leveduras quanto às suas características fermentativas e formação dos principais compostos voláteis, sendo 24 *Saccharomyces cerevisiae* e 6 pertencentes aos gêneros *Candida* (3), *Kloeckera*, *Pichia* e *Schizosaccharomyces*. Foram isoladas em destilarias de aguardente artesanal de cana (27), em destilaria industrial de aguardente (2) e destilaria de álcool (1). As fermentações foram conduzidas em meio sintético, em frascos com condições padronizadas de pH, temperatura, agitação e tempo de fermentação. Foram determinados os seguintes parâmetros fermentativos: rendimento da fermentação, conversão de substrato, eficiência de conversão de substrato em etanol, fatores de conversão de substrato em etanol ($Y_{p/s}$), em células ($Y_{x/s}$), em ácidos orgânicos ($Y_{ac/s}$) e em glicerol ($Y_{g/s}$), e velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{max}). Os compostos voláteis no meio fermentado (vinho) foram determinados por cromatografia gasosa, sendo estes o acetaldeído, acetato de etila, propanol, isobutanol, álcool isoamílico e o ácido acético. De uma maneira geral as linhagens de *S. cerevisiae* apresentaram bom potencial fermentativo, com rendimento entre 83 a 91%, μ_{max} entre 0,450 a 0,640 h⁻¹, e várias delas foram comparáveis à levedura de alto desempenho utilizada na produção industrial de etanol e adotada como referencial. As linhagens não-*Saccharomyces* destacaram-se por apresentar elevada eficiência de conversão de substrato em etanol, comparáveis às linhagens de *S. cerevisiae*; no entanto, o rendimento em etanol destas linhagens foi muito baixo, e foram altos os valores de conversão de substrato em acidez ($Y_{ac/s}$) e de substrato em glicerol ($Y_{g/s}$). Uma exceção foi a linhagem de *Pichia subpelliculosa* que se comportou de maneira similar às linhagens de *S. cerevisiae*. A análise multivariada (Análise de Agrupamento Hierárquico) foi aplicada utilizando-se como variáveis os parâmetros fermentativos e também os compostos voláteis formados, o que permitiu a separação das linhagens em diferentes grupos, de acordo com sua similaridade. Na Análise de Componente Principal (ACP) utilizando como variáveis os parâmetros fermentativos estudados, o rendimento da fermentação (ou a conversão de substrato) foi o parâmetro que mais contribuiu para a separação entre as linhagens. As linhagens *Saccharomyces* mostraram uma variação do teor de compostos secundários, limitada em torno de 50% da taxa média de produção de cada composto. As análises de AH

e de CP mostraram a separação das linhagens em diversos grupos, sendo a capacidade de produção de ácido acético a variável de maior impacto na diferenciação das linhagens. As linhagens *Saccharomyces* fermentaram melhor, fornecendo vinhos com maior teor alcoólico, sendo, portanto, mais tolerantes ao etanol, o que lhes confere maior potencial de dominar o processo fermentativo. Deste modo, uma vez que as não-*Saccharomyces* apresentam um perfil qualitativo e quantitativo de compostos voláteis considerado semelhante ao das *Saccharomyces* para efeitos práticos na qualidade da aguardente, pode-se dizer que as não-*Saccharomyces* em vista de sua pouca tolerância ao etanol, e consequentemente pequena população além de reduzida atividade fermentativa em vinhos a partir de determinado teor em etanol, deve provocar pouca alteração no perfil de compostos voláteis do vinho e da aguardente final. Baseando-se nestes resultados foram selecionadas 10 linhagens de leveduras entre as 30 linhagens avaliadas sendo seis *Saccharomyces cerevisiae*, além de *Candida apicola*-similar, *Kloeckera javanica*, *Pichia subpelliculosa* e *Schizosaccharomyces pombe*, com o objetivo de estudar a influência das mesmas na composição e qualidade sensorial da aguardente de cana. As aguardentes foram produzidas em escala piloto, o caldo de cana fermentado (vinho) foi destilado em um alambique de cobre de capacidade útil de 30 litros, obtendo-se aproximadamente 4 a 6 litros de aguardente a 39 % (v/v). Nas aguardentes foi analisado o acetaldeído, acetato de etila, propanol, isobutanol, álcool isoamílico; a acidez volátil e o grau alcoólico, e também o teor de açúcares redutores totais (ART) no mosto e o teor de etanol no vinho. Foram verificadas correlações negativas estatisticamente significativas entre o etanol do vinho e todos os compostos voláteis das aguardentes, com exceção do acetaldeído, mostrando que quanto maior o teor alcoólico do vinho, maior o volume de aguardente obtida com determinada graduação alcoólica, e assim os componentes do vinho sofrerão um efeito de diluição. O álcool isoamílico e álcoois superiores nos vinhos obtidos em fermentações em meio sintético e em condições padronizadas, com as mesmas leveduras, apresentaram correlações positivas estatisticamente significativas com os teores destes mesmos compostos nas aguardentes. Observaram-se ainda correlações positivas estatisticamente significativas entre diversos compostos das aguardentes, indicando que o teor dos compostos voláteis totais não é influenciado por apenas um componente particular. As aguardentes obtidas apresentaram variações nos teores dos compostos voláteis, mas estas variações não ocasionaram

diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) em relação aos atributos sensoriais de aroma, sabor e impressão global, indicando que as linhagens não-*Saccharomyces* presentes nas fermentações para produção de aguardente de cana, não interferem negativamente na qualidade sensorial da bebida. Entre os compostos determinados nas aguardentes o propanol apresentou correlação positiva com os atributos de sabor e impressão global. As linhagens não-*Saccharomyces* apresentaram rendimentos das fermentações, em meio de caldo de cana, similares às linhagens *Saccharomyces*; no entanto, a linhagem *S. pombe* forma poucos compostos voláteis e não se mostrou adequada para a produção de aguardente, obtendo as notas mais baixas na análise sensorial de aceitação. Os rendimentos das fermentações obtidos com as linhagens *S. cerevisiae* na produção das aguardentes correlacionaram-se positivamente com os rendimentos obtidos com estas mesmas linhagens no meio sintético, mostrando a validade da avaliação das linhagens em meio sintético, em laboratório, em condições padronizadas. A ACP utilizando-se os teores dos compostos voláteis das aguardentes mostrou que todos os componentes voláteis individuais, com exceção do álcool isoamílico, e os componentes secundários totais contribuíram sobre a variabilidade das aguardentes.

Palavras-chave: fermentação alcoólica, aguardente de cana, cachaça, compostos voláteis, análise sensorial, leveduras, *Saccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*.

SUMMARY

Thirty yeast strains were evaluated with respect to their fermentation characteristics and to the main volatile compounds formed, viewing the production of Brazilian sugarcane liquor or “cachaça”. Twenty four of the strains were *Saccharomyces cerevisiae* and six belonged to the following genera: *Candida* (3), *Kloeckera*, *Pichia* and *Schizosaccharomyces*. They were isolated from small sugarcane liquor distilleries (27), industrial sugarcane liquor distilleries (2) and one sugarcane alcohol distillery. Fermentation was carried out in flasks containing synthetic media, under standardized conditions of pH, temperature and agitation. The following fermentation parameters were determined: fermentation yield; conversion factors of substrate into ethanol ($Y_{p/s}$), cells ($Y_{x/s}$), organic acids ($Y_{ac/s}$) and glycerol ($Y_{g/s}$), and the maximum specific velocity of cell growth (μ_{max}). The volatile compounds in the fermentation medium (wine) were determined by gas chromatography and included acetaldehyde, ethyl acetate, propanol, isobutanol, isoamyl alcohol and acetic acid. In general the *S. cerevisiae* strains showed good fermentation potential, with yields between 83 and 91% and μ_{max} between 0.450 and 0.640 h⁻¹, several of them comparing well with the high performance yeast used in the industrial manufacture of alcohol, which was used as reference. The non-*Saccharomyces* strains were distinguished by their high levels of efficiency in the conversion of substrate into ethanol, being comparable to the *S. cerevisiae* strains, although the ethanol yields from these strains were low and the values for conversion of substrate into acidity ($Y_{ac/s}$) and of substrate into glycerol ($Y_{g/s}$), were high. One exception was the strain *Pichia subpelliculosa*, which behaved in a manner similar to the *S. cerevisiae* strains. The multivariate analysis (Hierarchical Cluster Analysis) was applied, using the fermentation parameters and volatile compounds formed as variables, which allowed for the separation of the strains into different groups, according to similarity. In the Principal Component Analysis (PCA), using the fermentation parameters as variables, the fermentation yield (or substrate conversion) was the parameter which most contributed to the separation of the strains. The *Saccharomyces* strains showed a limited variation of the rate of production of each volatile compound, ranging near 50% of the average rate. The Hierarchical Cluster Analysis (HCA) and the PCA showed the separation of the strains into several groups, being the rate

of acetic acid production that one of greater impact to differentiate the strains. The *Saccharomyces* strains fermented better, the wine reached higher ethanol concentrations, due to the strains higher ethanol tolerance, and so with a higher potential for dominating the fermentative process. In a practical approach basis, viewing *cachaça* quality, the non-*Saccharomyces* strains showed a qualitative and quantitative profile of the volatile compounds similar to that of *Saccharomyces* strains. So the non-*Saccharomyces* probably will promote little changes on the profile of volatile compounds of the wine and *cachaça* once they being low ethanol tolerant their population is restricted and shows an also lower fermentative activity in wines with ethanol content above certain limit. Based on these results, 10 strains were selected to study their influence on the composition and sensory quality of the *cachaça*. The distillation was performed on a pilot plant scale, the fermented cane juice (wine) being distilled in a copper still with a working capacity of 30 liters, obtaining approximately 4 to 6 liters of *cachaça* at 39% alcohol (v/v). Acetaldehyde, ethyl acetate, propanol, isobutanol and iso-amyl alcohol were determined in the *cachaça*, and volatile acidity, alcohol content and total reducing sugars in the must. The alcohol level was also determined in the wine. Statistically significant negative correlations were shown between the ethanol in the wine and all the secondary compounds in the *cachaça*, with the exception of acetaldehyde, showing that the greater the alcohol level of the wine, the greater the volume of *cachaça* obtained, of a determined alcohol grade, the wine components suffering a dilution effect. Propanol, iso-amyl alcohol and the higher alcohols found in the wine after fermentation in synthetic media under standardized conditions with the same yeasts, presented statistically significant positive correlation with the level of these same compounds in the *cachaça*. Statistically significant positive correlation was also found between various compounds in the *cachaça*, indicating that the total volatile compound content is not influenced by only one particular component. The *cachaça* produced varied in their contents of secondary compounds, but these variations did not result in statistically significant differences ($p \leq 0.05$) with respect to the sensory attributes of aroma, taste and overall impression, indicating that the non-*Saccharomyces* strains present in the fermentation for the production of *cachaça*, do not interfere negatively in the sensory quality of the beverage. Among the volatile compounds determined only the propanol showed positive correlation with the sensory attributes of taste and overall

impression. The non-*Saccharomyces* strains presented similar fermentation yields to the *Saccharomyces* strains, although the strain of *S. pombe* formed few secondary compounds and was shown to be inadequate for the production of *cachaça*, receiving low scores in the sensory analysis for acceptance. The fermentation yields obtained with the strains of *S. cerevisiae* in the production of *cachaça* showed positive correlation with the yields obtained with these same strains in synthetic media, showing the validity of evaluating the strains in a laboratory, using synthetic media and standard conditions. The PCA showed that the total content of secondary components and each individual component, except iso-amyl alcohol, contributed to a greater extent to the variability of the *cachaça*.

Key Words: alcoholic fermentation, distilled sugarcane beverage, sugarcane liquor, *cachaça*; volatile compounds, sensory analysis, yeasts, *Saccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*.

1 – INTRODUÇÃO

A aguardente de cana, caninha ou cachaça, é uma bebida tipicamente brasileira, e vem conquistando uma parcela crescente do mercado internacional de bebidas destiladas por ser considerada exótica e de sabor especial. A produção brasileira de aguardente de cana está estimada em 1,3 bilhão de litros por ano. A produção artesanal de aguardente de cana é realizada por produtores rurais, com pequena capacidade (10.000 a 200.000 litros por safra), sendo a destilação conduzida em alambiques intermitentes, de cobre, e o produto é bastante diferenciado daquele obtido em maior escala de produção com o uso de colunas de destilação em aço inoxidável. O Estado de Minas Gerais vem se destacando na produção de aguardente artesanal, liderando na sua divulgação e agregando um conceito de qualidade típica para essa bebida, permitindo aos produtores sair da economia informal. O preço de algumas marcas atinge até sessenta vezes aquele de aguardentes comercializadas sem a conotação de qualidade artesanal. Nesse Estado existem mais de 8.000 destilarias artesanais que produzem cerca de 130 milhões de litros/ano, funcionando no período de maio a dezembro.

A aguardente de cana foi incluída em programas de exportação do governo como o PEE – Programa Especial para Exportação e PNPE – Programa dos Novos Pólos de Exportação. O PBDAC – Programa Brasileiro de Desenvolvimento da Aguardente de Cana, Caninha ou Cachaça, foi criado oficialmente em 1997 pela Associação Brasileira de Bebidas (ABRABE) para estimular a valorização da bebida e a qualidade dos seus métodos de produção (Pepe, 1999). A previsão do setor para a próxima década é alcançar US\$ 100 milhões em divisas para o país. Em Minas Gerais o aumento da produção de cachaça está sendo estimulado pelo Pró-Cachaça e pela Associação Mineira dos Produtores de Aguardente de Qualidade (Ampaq), que criaram um selo de qualidade para os produtores que integram a referida associação.

A fermentação artesanal de aguardente de cana caracteriza-se por ser conduzida por uma microbiota mista de leveduras, com predominância de linhagens de *Saccharomyces*

cerevisiae. Leveduras apiculadas (principalmente *Kloeckera japonica*) e espécies de *Candida*, *Kluyveromyces* e *Pichia* são também freqüentemente isoladas (Morais et al., 1997; Pataro et al., 2000). As leveduras presentes nessas fermentações estão em constante sucessão, devido à introdução de microrganismos que acompanham o caldo de cana, e também devido às condições de processo (Pataro et al., 1998).

Com o progresso da tecnologia de fermentação alcoólica e da taxonomia de leveduras, foi possível verificar também que a linhagem predominante é a que possui características mais propícias de adaptação às diferentes condições de processo tais como teor de açúcar do mosto/teor de etanol no vinho, acidez do vinho, operação de purificação do caldo, temperatura do mosto, "armadilhas" nos equipamentos e no modo de condução da fermentação etc. Quando se alteram condições de processamento, certamente dão-se condições para o estabelecimento de um novo equilíbrio entre as linhagens de leveduras, com o surgimento de outra linhagem dominante. A simples inoculação de uma linhagem selecionada, ou de uma linhagem dominante isolada de uma determinada destilaria, não é capaz de garantir a sua permanência e/ou melhorar a eficiência de outras destilarias. A alteração e a adequação de procedimentos tecnológicos de processo, certamente são passos preliminares importantes para alterar a microbiota e a(s) levedura(s) com condições de dominância no processo. É importante observar que não ocorrem leveduras dominantes *per se*, mas leveduras dominantes em determinadas condições ou processos. A seleção de uma microbiota mais eficiente e de maior rendimento, sem perder de vista a qualidade da bebida, deve ser buscada com adoção de processo adequado e que opere em condições as mais estáveis possíveis. A comunidade de leveduras presente numa fermentação de aguardente artesanal é composta por diversas espécies e linhagens, mostrando a ocorrência de leveduras com amplas diferenças em seus parâmetros fermentativos e na produção de compostos secundários. O que realmente é de interesse empresarial é a ocorrência de uma flora microbiana em geral, e de leveduras em particular, que conduza a um elevado rendimento fermentativo e melhor qualidade da bebida, em termos comparativos com os resultados de destilarias reconhecidamente eficientes, não importando se a(s) linhagem(s) presente(s) são as mesmas ou não.

São vários os fatores que interferem na qualidade das bebidas alcoólicas destiladas, tais como a matéria-prima, fermentação, o método de condução do processo fermentativo, destilação, envelhecimento etc. No entanto, as leveduras e as condições de fermentação têm sido apontadas como os fatores que mais influenciam o sabor das bebidas alcoólicas (Suomalainen & Lehtonen, 1979; Lehtonen & Jounela-Eriksson, 1983), pois é durante a fermentação que a maioria dos compostos do sabor são formados.

Vários pesquisadores têm investigado a influência das espécies ou linhagens de leveduras na formação de compostos do sabor em fermentações em meio sintético contendo açúcar, ou na produção de diferentes bebidas alcóolicas, tais como vinho, cerveja, uísque, conhaque, rum (Nykänen & Nykänen, 1977; Soles et al., 1982; Cabrera et al., 1988; Giudici et al., 1990; Mateo et al., 1991; Mateo et al., 1992; Longo et al., 1992; Lurton et al., 1995). No entanto, na literatura científica existem poucos trabalhos sobre a influência destes compostos na qualidade da aguardente de cana. Segundo Cole & Noble (1995) o sabor em um sistema complexo, tal como das bebidas alcoólicas, não pode ser inferido com base em análises; com poucas exceções, o sabor perceptível é resultante de uma combinação de vários componentes, ao invés de ser devido a um composto de “impacto”.

Durante a fermentação alcóolica, as leveduras produzem etanol, dióxido de carbono, e um grande número de componentes secundários, sendo os mais abundantes os álcoois superiores; porém, muitos compostos presentes em menores quantidades também desempenham um papel importante no desenvolvimento do sabor das bebidas (Lehtonen & Jounela-Eriksson, 1983). Compostos carbonílicos tais como o acetaldeído e diacetil estão presentes em pequenas concentrações; mas tendo “threshold” muito baixo, podem desempenhar um papel chave no sabor das bebidas (Berry, 1995). Apesar de diferir quantitativamente, esses compostos estão presentes em todas as bebidas destiladas (Suomalainen & Lehtonen, 1979). Estes compostos podem ser divididos em diferentes categorias e têm origem no metabolismo da célula.

A produção de aguardente de cana no Brasil vem, nos últimos anos, buscando uma imagem fortemente vinculada à qualidade da bebida e investindo no desenvolvimento de um mercado consumidor mais exigente, de modo a diversificar e desvincular de sua linha tradicional de bebida popular, e também procurando competir no mercado externo, aumentando as exportações da bebida. Torna-se então evidente a necessidade de se conhecer melhor e controlar os fatores que influenciam a qualidade da aguardente de cana. Considerando tais aspectos, este trabalho teve por objetivo avaliar o comportamento fermentativo e a formação dos principais compostos voláteis em leveduras isoladas de fermentações de aguardente artesanais, de qualidade reconhecida, do Estado de Minas Gerais. A aplicação de métodos estatísticos multivariados, permitiu verificar se as leveduras isoladas se distribuíam em agrupamentos diferenciados, e quais os parâmetros mais importantes para sua diferenciação. Com os resultados obtidos nesta etapa, foram selecionadas linhagens pertencentes aos diferentes agrupamentos, visando verificar a influência das mesmas na composição e na qualidade sensorial da aguardente de cana recém- destilada, produzida em escala piloto, em alambique de cobre.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Leveduras na Produção de Aguardente de Cana e Outras Bebidas Alcoólicas

De acordo com Reed & Nagodawithana (1991) as leveduras utilizadas na produção de bebidas alcoólicas devem apresentar as seguintes características: alta tolerância ao álcool e bom rendimento; fermentar rapidamente o meio e portanto minimizar o risco de contaminações; produzir a melhor concentração e balanço de compostos secundários desejáveis. Russel et al. (1987) acrescentam ainda, que as leveduras devem apresentar estabilidade genética e ao fim da fermentação devem ser facilmente removidas do meio de fermentação por floculação ou centrifugação.

As leveduras utilizadas na fabricação de bebidas alcoólicas geralmente são linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, exceto nas fermentações naturais onde um grande número de espécies pode estar envolvido. Para a fermentação natural do vinho de uva foi descrita a sucessão de espécies durante o transcorrer da fermentação (Reed & Nagodawithana, 1991).

Na produção de aguardente de cana os termos pé de cuba, pé de fermentação ou levedo são geralmente utilizados para designar o volume inicial ou massa de fermento que é adicionado ao mosto para que a fermentação se realize. São vários os tipos de fermento utilizados para se preparar um pé de cuba, tais como o “caipira” ou natural, constituído de leveduras selvagens, ou seja, que ocorrem espontaneamente no processo; outros, são as leveduras selecionadas e as de panificação (Maia, 1995).

A cana-de-açúcar leva consigo uma grande quantidade de leveduras contaminantes e sua contagem no caldo foi de 10^3 - 10^4 células/mL, atingindo a 10^6 células/L após 10 dias de estocagem da cana (Tilbury, 1975). Shehata (1960) isolou 139 leveduras de amostras da água de lavagem da cana, e do caldo de cana e vinho para a produção de aguardente. No

caldo de cana os gêneros de levedura predominantes foram *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida* e *Torulopsis*, enquanto no vinho, as espécies predominantes foram *S. cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*.

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

As características da fisiologia de crescimento de 210 linhagens de leveduras isoladas de um alambique de aguardente artesanal do Estado de Minas Gerais foram estudadas por Pataro et al. (1998). A maioria das linhagens foi fisiologicamente adaptada às condições ambientais observadas nas dornas de fermentação. Elas foram capazes de crescer a 35° C, em meio contendo 25% de glicose e em concentração de 5% (v/v) de etanol.

Pataro et al. (2000) mostraram também a sucessão da população de leveduras em diferentes períodos de fermentação, para produção de aguardente, em três destilarias do Estado de Minas Gerais. *Saccharomyces servazzii*, *Pichia anomala*, *Saccharomyces unisporus* e *Torulaspota delbrueckii* foram exclusivamente isoladas de fermentações “iniciais” (7 a 30 dias de preparo de seu fermento inicial); *Candida glabrata*, *C. colliculosa*, *P. fabianii*, *C. krusei* e *S. kluyveri* foram encontradas somente nas fermentações “medianas” (31 a 60 dias). A maioria das linhagens de *C. stellata*, *C. valida*, *S. exiguus*,

Kluyveromyces sp e *S. pombe* foram encontradas no final do período de fermentação (61 a 120 dias). *Saccharomyces cerevisiae* foi a espécie predominante durante todo o período de produção da aguardente, mas *S. pombe* foi predominante nas fermentações “finais” de uma das destilarias. Uma alta variabilidade genética de linhagens de *S. cerevisiae* também foi observada até mesmo, numa mesma dorna em diferentes períodos de fermentação. Foi mostrado que há uma sucessão de linhagens de *S. cerevisiae* geneticamente diferentes durante a produção de aguardente.

2.2. Fatores que Influenciam a Formação e a Composição dos Compostos Voláteis nas Aguardentes de Cana e outras Bebidas Alcoólicas

2.2.1. Leveduras e Condições de Fermentação

Leveduras e condições de fermentação são apontadas como os fatores que mais influenciam o sabor das bebidas alcoólicas (Suomalainen, 1971; Suomalainen & Lehtonen, 1979). Suomalainen & Nykänen (1966) relatam que os mesmos compostos aparecem como principais componentes nas diversas bebidas alcoólicas, independentemente da matéria-prima utilizada, o que evidencia a importância das leveduras na formação do sabor das bebidas alcoólicas. Segundo Lehtonen & Jounela-Eriksson (1983), a natureza e a quantidade dos compostos formados na fermentação é grandemente afetada pelas condições de fermentação, tais como a temperatura e nutrientes do meio de fermentação. Além disso, a técnica de destilação tem um grande efeito no aroma das bebidas, especialmente na sua composição quantitativa.

Suomalainen & Nykänen (1966) investigaram a capacidade de leveduras comerciais de *S. cerevisiae* sintetizar vários compostos de aroma, em meio sintético contendo sacarose como fonte de carbono, sem adição de nitrogênio. Os autores verificaram uma grande similaridade entre a composição qualitativa das substâncias

voláteis presentes nos destilados desta fermentação com a dos destilados obtidos na produção do uísque de origem escocesa, embora certas diferenças quantitativas foram evidentes. Estas similaridades indicaram que as leveduras são as responsáveis pela maior parte dos compostos aromáticos produzidos.

A importância predominante das leveduras na formação de compostos aromáticos nas bebidas foi claramente demonstrada por Suomalainen & Nykänen (citados por Suomalainen & Lehtonen, 1979). Vinhos de uva e groselha obtidos utilizando-se a mesma levedura, apresentaram composição qualitativamente semelhante em ésteres, ácidos e álcoois e apenas algumas diferenças quantitativas. Os autores concluíram então, que as mesmas leveduras, produzem os mesmos componentes do aroma independentemente da matéria-prima utilizada. Suomalainen (1971) relata que dentro de um grupo de mais de 100 componentes voláteis verificou-se que as mesmas substâncias aparecem na fração de componentes do aroma em cervejas, vinhos e bebidas destiladas. Em vista disso, parece evidente que a matéria-prima utilizada na produção de bebidas contribui de maneira limitada para o aroma

Vários pesquisadores têm investigado a influência das espécies ou linhagens de leveduras na formação de compostos do aroma (ésteres, álcoois superiores, aldeídos, ácidos graxos, entre outros) em fermentações em meio sintético contendo açúcar ou na produção de diferentes bebidas alcoólicas, tais como vinho, cerveja, uísque, conhaque e rum (Nykänen & Nykänen, 1977; Soles et al., 1982; Cabrera et al., 1988; Giudici et al., 1990; Mateo et al., 1991; Longo et al., 1992; Mateo et al., 1992; Lurton et al., 1995). As linhagens de leveduras são apontadas como tendo um grande efeito no sabor das cervejas ao contrário do que ocorre com os vinhos (Meilgaard & Peppard, 1986). Diferentes espécies e linhagens de leveduras são responsáveis por elevada variabilidade (até cinco vezes) na concentração de álcoois superiores em cerveja Engan (citado por Cole & Noble, 1995).

As espécies e linhagens de leveduras diferem na sua capacidade de produzir álcoois superiores (Korhola et al., 1989). Giudici et al. (1990) examinaram a capacidade de produzir

álcoois superiores em 100 linhagens de *S. cerevisiae* e verificaram que para as linhagens testadas a produção de álcoois superiores é uma característica individual e as diferenças foram estatisticamente significativas. Parfait & Jouret (1975) mostraram que *S. pombe* produz relativamente pouca quantidade de álcool fúsel.

Berry (1984) relata que foi estudada a influência das linhagens de leveduras na formação de vários álcoois superiores em um processo fermentativo de produção de uísque em pequena escala. A quantidade total de álcoois superiores mostrou não ser notadamente afetada pela linhagem de levedura, enquanto a proporção relativa de cada álcool e em particular a razão de álcoois amílicos para isobutanol diferiu entre as linhagens, mas foi constante para uma dada linhagem.

Castor & Guymon (1952) mostraram que a formação de álcoois superiores ocorre paralelamente à formação de álcool etílico em fermentações de suco de uva. Ramsay (citado por Watson, 1983) relatou a cinética de formação de várias classes de compostos voláteis, durante a fermentação de malte uísque. A cinética de produção dos álcoois superiores foi muito similar à do etanol. Houve um aumento exponencial durante as primeiras 8 horas seguida de uma fase linear de 8-20 horas. A formação dos álcoois superiores foi também relacionada com o consumo de carboidratos, e não houve nenhuma correlação geral com o consumo de nitrogênio. Ribeiro (1997) também verificou, em estudos sobre a produção de aguardente de cana, que a formação de isobutanol e álcool isoamílico ocorreu paralelamente ao crescimento celular, à produção de etanol e ao consumo de açúcar.

Usando leucina radioativa, em fermentações de uísque, Reazin et al. (1970) sugeriram que durante as primeiras 8 horas de fermentação os álcoois superiores foram produzidos a partir dos aminoácidos do mosto e após este período a partir de carboidratos.

A adição de precursores, tais como os aminoácidos específicos, leucina, isoleucina e valina, aumentou a quantidade de álcoois isoamílicos, amílicos ativos e isobutílicos formados durante a fermentação, mas não na proporção direta da quantidade adicionada (Guymon, 1972).

Guymon et al.(1961) mostraram que condições oxidativas durante a fermentação do vinho de uva, favorecem a produção de álcoois superiores. Crowell & Guymon (1963) relatam que a aeração vigorosa durante a fermentação do vinho aumenta consideravelmente a formação de álcoois superiores, de acetoína e diacetil. Relatam ainda que os materiais encontrados naturalmente em suspensão no meio de fermentação aumentam também a produção de álcoois superiores, particularmente álcoois isobutílico e isoamílico. No entanto, a quantidade de 1-propanol e 2-metil-1-butanol foi muito pouco alterada pela presença de sólidos em suspensão. Guymon (1972) observou que maiores quantidades de álcoois fúsel são formadas em mostos turvos do que em sucos de uva clarificados, e que o efeito da aeração é estimular o crescimento e a atividade biossintética das leveduras e conseqüentemente a demanda por nutrientes nitrogenados.

Em geral os resultados obtidos em estudos conduzidos em pequena escala para produção de uísque sugerem que os fatores que aumentam a taxa de fermentação também aumentam o nível de álcoois superiores (Berry,1984). Condições que favorecem alta taxa de crescimento, como temperatura relativamente elevada e aeração do meio, tendem a estimular a produção de álcoois superiores. Esses e outros fatores elevam o nível global de álcoois superiores, porém, os álcoois superiores individuais podem ser manipulados alterando a quantidade do aminoácido correspondente no mosto, ou manipulando geneticamente o organismo. Isto pode ser vantajoso considerando que certos aminoácidos originam sabores distintos; por exemplo, fenilalanina estimula a produção de álcool fenilil, um álcool superior que possui um aroma semelhante ao de rosas (Berry, 1995). A quantidade produzida de álcoois superiores é menor quando se adiciona íon de amônio no meio de fermentação por bloquear a sua síntese a partir de carboidratos (Reazin et al., 1970; Amerine, 1972). Segundo Korhola et al. (1989), a quantidade máxima de álcoois superiores

é produzida a 25-30° C, em cultivos agitados, com inóculo elevado, em mostos contendo altas concentrações de aminoácidos e substâncias insolúveis (Korhola et al.,1989).

Ramsay & Berry (1984b) estudando o efeito da temperatura de fermentação (20 a 35° C) na formação de álcoois superiores, verificaram que as maiores quantidades de álcoois superiores foram obtidas na faixa de 25-30° C e que a composição relativa dos álcoois superiores foi pouco afetada pela temperatura.

Ramsay & Berry (1984a) verificaram também que a formação de álcoois fúsel em uísques pode ser regulada por diferentes níveis de inóculo na fermentação. A quantidade total de álcoois aumenta com o aumento do inóculo. No entanto, a quantidade relativa dos diferentes álcoois encontrados não foi alterada. Seus resultados indicaram que a quantidade de álcoois fúsel aumentou de 288 mg para 504 mg por litro quando o nível de inóculo foi alterado de $0,5 \times 10^7$ para 16×10^7 células por mL. Berry (1984) relata que alterando o pH inicial do mosto, na produção de uísque, ocasionou um pequeno efeito na produção de propanol, isobutanol e 2 feniletanol, mas o nível de álcool amílico aumentou quando o pH foi elevado de 4,0 para 6,0, o que também resultou em aumento global de álcoois superiores.

Os aldeídos são intermediários na produção de álcoois superiores, e condições que favorecem a produção de álcoois superiores também favorecem a formação de pequenas quantidades de aldeídos. Estes são excretados pelas leveduras, mas podem ser reabsorvidos e reduzidos ao álcool correspondente, durante os últimos estágios da fermentação (Berry, 1995). Em investigações relativas à formação de aldeídos por diferentes leveduras, Radler (citado por Nykänen & Nykänen, 1991) encontrou que o nível mais alto de aldeído é atingido quando as leveduras estão na fase mais vigorosa da fermentação. A síntese de acetaldeído é também dependente da linhagem e das condições de fermentação (Nykänen & Nykänen, 1991) e ocorre em maior proporção em meios com concentrações deficientes em nutrientes (Nykänen, 1986).

A capacidade das leveduras produzirem aldeídos é bastante variável, e experimentos com 300 leveduras diferentes mostraram uma variação no conteúdo de aldeídos de 6 mg/L a 190 mg/L (Nykänen & Nykänen, 1991). Há diferenças marcantes na produção de aldeídos entre linhagens de *S. cerevisiae*, as quais são atribuídas a variações na atividade da enzima piruvato descarboxilase das leveduras (Nykänen, 1986; Nykänen & Nykänen, 1991).

A formação de ésteres durante a fermentação de açúcares tem sido estudada por muitos pesquisadores (Nykänen et al., 1968; Nykänen & Nykänen, 1977), e sua concentração normalmente aumenta com o aumento do teor de álcool (Mac Donald et al., 1984). Os fatores que influenciam a formação de ésteres são a levedura, a qualidade do mosto, a temperatura de fermentação, a quantidade de inóculo e a aeração e agitação do mosto, sólidos em suspensão (Berry, 1984; Ramsay & Berry, 1984a,b). Peddie (1990) em extensa revisão aponta como principais fatores que interferem na formação de ésteres, na produção de cerveja, a linhagem de levedura, a composição e aeração do mosto, pressurização das dornas de fermentação, quantidade de inóculo, sólidos em suspensão e a temperatura de fermentação.

Condições que restringem o crescimento microbiano, tais como a falta de aeração ou nitrogênio, podem conduzir a um aumento na formação de ésteres. Parece que a maioria dos ésteres é produzida nos últimos estágios da fermentação, ao contrário dos álcoois superiores que são produzidos abundantemente durante a fase de crescimento. O crescimento das leveduras em um sistema bem aerado pode suprimir totalmente a formação de ésteres, mesmo em condições que favorecem altos níveis de produção de etanol (Berry & Watson, citados por Berry, 1995).

A aeração é também um fator muito importante na formação de ácidos graxos. Leveduras cultivadas aerobiamente são muito ricas em, ácidos graxos insaturados, ácido palmitoléico e ácido oléico, os quais são raramente encontrados em leveduras cultivadas anaerobiamente (Ahvenainen, 1982). Amerine et al. (1972a) relatam que o ácido acético é

produzido principalmente durante os estágios iniciais da fermentação alcoólica, e que maiores quantidades são formadas em presença de oxigênio. Ramsay & Berry (1984b) observaram que a quantidade de ácidos graxos formados na fermentação de uísque decresce com o aumento da temperatura. Watson (1983) relata que há um aumento relativo dos ácidos graxos nos estágios finais da fermentação.

Quanto à produção de glicerol, Amerine et al. (1972a) relatam que a maior parte do glicerol é produzida durante os primeiros estágios da fermentação, e que as leveduras diferem marcadamente no seu rendimento em glicerol. A quantidade de glicerol produzida é fortemente influenciada pela linhagem de levedura e diversos fatores interferem na formação de glicerol por leveduras, tais como temperatura, pH, concentração de sacarose, fontes de nitrogênio e inibidores (Gutierrez, 1991).

A linhagem de levedura é também um fator que influencia a produção de sulfeto de hidrogênio. Normalmente, o sulfeto de hidrogênio produzido durante a fermentação é eliminado do meio, sendo arrastado pelo dióxido de carbono liberado na fermentação. Em fermentações menos vigorosas e lentas, pode ocorrer a autólise das células e o desenvolvimento de odores sulfurosos (Berry, 1995).

2.2.2. Destilação

A destilação altera as características sensoriais das bebidas alcoólicas, uma vez que as quantidades de compostos voláteis absolutas e relativas resultantes são influenciadas pela mesma. A composição dos destilados é determinada por muitos fatores incluindo o tipo de destilador, o grau de purificação, e a seleção das frações tomadas para inclusão na bebida destilada (Cole & Noble, 1995). De Rijke & ter Heide (1983) lembram que a destilação altera o sabor das bebidas não somente por causa do seu efeito na proporção

relativa dos compostos, mas também por causa das reações químicas que ocorrem devido ao aquecimento.

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

- a) O “destilado de cabeça”, que corresponde às primeiras frações recolhidas na saída do alambique;
- b) O “destilado de coração”, que é a porção destilada que corresponde à aguardente;
- c) O “destilado de cauda”, ou “água fraca”, que é a última porção destilada, obtida quando a destilação não é interrompida após obtenção da aguardente.

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

Segundo Léauté (1990) cada componente volátil destila segundo três critérios: o ponto de ebulição, a afinidade com álcool ou água, e a variação do conteúdo de álcool no vapor durante a destilação. Com relação à afinidade com álcool ou água, há várias possibilidades: (1) o componente é completamente ou parcialmente solúvel no álcool e “destila” quando o vapor está rico em álcool; (2) o componente é solúvel na água e “destila” quando o vapor está pobre em álcool; (3) o componente é solúvel em ambos,

álcool e água, e “destila” do começo ao fim da destilação ou (4) o componente não é solúvel em água, mas o vapor de água arrasta este componente (hidrodestilação).

Leauté (1990) acrescenta que estes componentes podem ainda ser classificados em 5 tipos:

Tipo 1: possuem baixo ponto de ebulição e são solúveis em álcool; tais como acetaldeído (21°C); acetato de etila (77°C). A maioria destes componentes é separada no início da destilação. Sua concentração é muito alta na fração cabeça e no início da fração coração.

Tipo 2: apresentam ponto de ebulição relativamente alto e são completa ou parcialmente solúveis no álcool. Os ácidos graxos e seus ésteres pertencem a esta categoria. Exemplos: caprilato de etila (208°C), caprato de etila (244°C), laurato de etila (269°C), caproato de etila (166,5°C), e acetato de isoamila (137,5°C). São separados no início da destilação e alguns no meio da fração de coração.

Tipo 3: têm ponto de ebulição não acima de 200°C, são solúveis em álcool, e completamente ou parcialmente solúveis em água. Exemplos: metanol (65,5°C); álcoois superiores: 1-propanol, isobutanol, 2-metil butanol e 3-metil butanol. Estão presentes nas frações de cabeça e coração.

Tipo 4: têm ponto de ebulição acima do PE da água e são solúveis ou parcialmente solúveis em água. Exemplos: ácido acético (110°C), 2-feniletanol, lactato de etila e succinato de dietila. Começam a destilar durante a metade da fração coração.

Tipo 5: possuem alto ponto de ebulição e são muito solúveis em água. Começam a destilar durante a metade da fração coração. Exemplos: furfural (167°C). A concentração de furfural aumenta a partir da metade da fração coração e na cauda.

Nas bebidas destiladas, a fração mais volátil (cabeça) é frequentemente separada das demais frações coletadas. Essa fração contém muitos compostos do aroma, sendo principalmente rica em acetaldeído, dióxido de enxofre e acetato de etila, compostos normalmente considerados como atribuindo um impacto sensorial negativo (Guymon, 1973).

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

O tipo de alambique e a técnica de destilação também afetam o sabor dos destilados. Muitas reações são catalisadas e ocorrem nos destiladores de cobre e seus condensadores (Watson, 1983). O cobre age de forma a reduzir o teor de compostos sulfurados voláteis no destilado, e portanto o desagradável odor típico de sulfetos (Faria et al., 1993). Nascimento (1997) relata que o principal componente desta classe de compostos é o dimetilsulfeto (DMS).

Segundo Simpson (1971) altas concentrações de congêneres e sabores pesados (“heavy flavours”) são obtidas pelo uso de alambiques, os quais não permitem a separação fracionada dos voláteis de forma eficaz como pode ser conduzida nos destiladores contínuos. O 2-feniletanol que possui aroma de rosas é encontrado em brandies destilados em alambiques, mas ausente ou presente em menores quantidades quando produzidos em destiladores contínuos. O furfural é formado nos alambiques de aquecimento a fogo direto, mas não aparece durante a destilação em destiladores contínuos. De acordo com Amerine

(1972b) o furfural e hidroximetilfurfural não são formados durante a fermentação; o furfural é formado principalmente durante a destilação.

Mitchell (citado por Maia, 1994) relata que durante a destilação o gás sulfídrico é eliminado com facilidade, mas que algumas mercaptanas (compostos com o grupo funcional -SH) são líquidos voláteis, que quando transferidos para o destilado, mesmo em níveis de partes por bilhão (ppb), conferem-lhe aroma particularmente desagradável. Segundo Mitchell o íon cúprico catalisa a oxidação das mercaptanas convertendo-as em sulfetos e dissulfetos, minimizando seus efeitos nas bebidas destiladas.

Reações de Maillard (reações entre o açúcar e compostos amino) também podem ocorrer durante a destilação. A reação de Maillard é a principal fonte de compostos heterocíclicos tais como furanos, piridinas e pirazinas (Léauté, 1990). Segundo De Rijkde & ter Heide (1983), a reação de Maillard pode originar compostos heterocíclicos durante a destilação, particularmente em alambiques a fogo direto, onde o furfural também pode ser formado.

Ácidos graxos e seus ésteres etílicos compreendem o segundo grupo de produtos secundários mais abundante nas bebidas destiladas depois dos óleos fúsel e destilam de maneira similar aos mesmos. Alguns dos ésteres etílicos mais voláteis são perdidos na fração de cabeça, nas destilações em alambiques (Guymon, 1973). Os principais ésteres têm aroma de frutas, como os ésteres, etílico, isobutílico e isoamílico, de ácidos graxos de cadeia curta (Cole & Noble, 1995). Frequentemente predominam nas bebidas destiladas os ésteres de alto ponto de ebulição, como os ésteres etílicos de ácidos caprílico e cáprico (Guymon, 1973). Outros ésteres de alto ponto de ebulição como os ésteres etílicos de ácidos mirístico, palmítico e palmitoléico (este último principalmente em uísque escocês), também são encontrados (Suomalainen & Lehtonen, 1979). Ácidos caprílico, caprílico e cáprico, os quais têm aroma de sabão, tendem a se concentrar na fração de cauda, usualmente descartada na destilação (Guymon, 1973) e conseqüentemente estão presentes em baixas concentrações nos destilados.

Muitos compostos secundários, tais como os ácidos graxos de cadeia longa, são integrantes das células de leveduras e são extraídos durante a destilação (Watson, 1983). Os ácidos lipofílicos, como o láurico, palmítico, palmitoléico, esteárico e oléico, acumulados nas leveduras, podem aparecer em grandes quantidades durante a destilação das bebidas se o mosto fermentado é destilado na presença de leveduras (Suomalainen et al., 1974). As leveduras representam 60 a 70% dos compostos sólidos encontrados nos vinhos. Vinhos contendo células apresentam muitos ésteres de ácidos graxos (tais como caprilato de etila, caprato de etila, laurato de etila, ésteres C₁₄ a C₁₈), mais ácidos graxos e compostos nitrogenados - aminoácidos principalmente (Léauté, 1990).

Álcoois superiores e ésteres de ácidos graxos são destilados a uma maior velocidade no início da destilação. Os ésteres etílicos de ácidos graxos de C₈, C₁₀ e C₁₂, todos possuindo pontos de ebulição maiores do que dos álcoois superiores do óleo fúsel, destilam quase totalmente na fase inicial não sendo portanto encontrados nas últimas frações dos destilados nem tão pouco na fração de cauda (Guymon, 1973).

Durante a destilação e envelhecimento, o álcool reage com ácidos para formar pequenas quantidades de ésteres como o acetato de etila. Outros ésteres são também formados durante a fermentação, destilação e envelhecimento (Amerine et al., 1972b). Ácidos e álcoois reagem para formar ésteres, e muitas reações de oxidação e redução ocorrem na fase de vapor, durante a destilação, como a oxidação de aldeídos a ácidos e a redução de alguns ácidos a álcoois (Watson, 1983). Acetais são formados na destilação através da condensação entre dois álcoois e um aldeído, reação esta catalizada por ácido. Durante a destilação, o dietil-acetal é formado em concentrações bem acima do seu “threshold” para aroma, proporcionando uma fragância “delicada” à bebida destilada (Nykänen & Nykänen, 1983).

Acredita-se que o aroma penetrante e apimentado em bebidas destiladas novas, uísques, conhaques ou rum, é causado pela acroleína (Nykänen, 1986). A acroleína (2-

propenal) é provavelmente formada por bactérias, a partir do glicerol ou pela desidratação do glicerol (1,1,3-propanetriol) na presença de ácidos, a quente, quando em contato com as superfícies metálicas da coluna de destilação (Nykänen, 1986; Nykänen & Nykänen, 1991;). A acroleína é altamente tóxica, irritante aos olhos e nariz e tem um odor picante (Amerine et al., 1972b).

2.3. Compostos Voláteis na Aguardente de Cana e Bebidas Alcoólicas : Mecanismo de Formação e sua relação com a Qualidade e o Sabor

A aguardente de cana tem seus padrões de identidade e qualidade definidos pelo decreto N° 2.314 de 04 de setembro de 1997, e pela Portaria N° 371 do Ministério da Agricultura, de 18 de setembro de 1974, que especifica que o coeficiente de congêneres não poderá ser inferior a duzentos miligramas por cem mililitros de álcool anidro. Além disso, os componentes voláteis não álcool da aguardente de cana deverão obedecer aos seguintes limites:

Parâmetros	Teor máximo (mg/100 mL de álcool anidro)
Acidez volátil, em ácido acético	150
Ésteres, em acetato de etila	200
Aldeídos, em aldeído acético	30
Furfural	5
Álcoois superiores	300

De acordo com Laing & Jinks (1996) o sabor é definido como o conjunto de sensações provocadas por estímulos de um produto na cavidade bucal, compreendendo: os odores, provocados pelas substâncias voláteis, através da via retronasal; os gostos, provocados pelas substâncias solúveis na boca; e os fatores de sensibilidade química,

estimulantes das terminações nervosas das cavidades oral e nasal (pungência, frescor, irritação).

O sabor das bebidas alcoólicas é devido a inúmeros compostos orgânicos voláteis e não voláteis, que conferem às bebidas seu sabor típico. Estes compostos podem ser divididos em vários grupos de acordo com sua natureza química. Álcoois superiores (óleo fúsel), ácidos graxos e ésteres formam quantitativa e qualitativamente o maior grupo na fração de aroma volátil das bebidas alcoólicas, sendo os álcoois superiores os mais abundantes (Lehtonen & Jounela-Eriksson, 1983; Berry, 1995). Compostos carbonílicos, fenóis e compostos nitrogenados e sulfurados, são menores em quantidade, mas sua contribuição para o aroma pode ser tão grande, ou mesmo maior (Lehtonen & Jounela-Eriksson, 1983). Segundo Berry (1995) os compostos carbonílicos como o acetaldeído e diacetil estão presentes em pequenas concentrações; mas tendo “threshold” muito baixo, podem desempenhar um papel chave no sabor das bebidas. Ácidos fenólicos e aldeídos são os principais componentes na fração não volátil das bebidas alcoólicas destiladas (Lehtonen & Jounela-Eriksson, 1983).

Os compostos do sabor originam-se em diferentes estágios da produção. A fermentação é inquestionavelmente a principal etapa na produção destes compostos, mas a matéria-prima usada na produção da bebida, a técnica de destilação e a maturação contribuem também para a formação e seleção dos compostos do sabor (Lehtonen & Jounela-Eriksson, 1983). Segundo Berry (1995) as leveduras podem também estar envolvidas na produção ou modificação de compostos sulfurados os quais podem ser de importância crítica no desenvolvimento de sabores agradáveis e desagradáveis (“off-flavours”) nas bebidas alcoólicas. Esses componentes podem ser divididos em diferentes categorias e têm origem no metabolismo da célula conforme a Figura 1.

Mais de 1.300 compostos voláteis já foram identificados em bebidas alcoólicas (Nykanen, 1986), e para muitos o “threshold” para o odor e descrições do aroma foram relatados. Apesar destas informações, o sabor em um sistema complexo, tal como a cerveja,

o vinho ou o uísque, não pode ser inferido com base em análises; com poucas exceções, o sabor perceptível é resultante de uma combinação de vários componentes, ao invés de ser devido a um composto de "impacto" (Cole & Noble, 1995).

Apesar das diferentes bebidas serem prontamente distinguidas uma das outras por suas características organolépticas, não se observam grandes diferenças na sua composição química. A diferença mais importante parece ser no conteúdo quantitativo dos compostos do aroma (Suomalainen & Lehtonen, 1979).

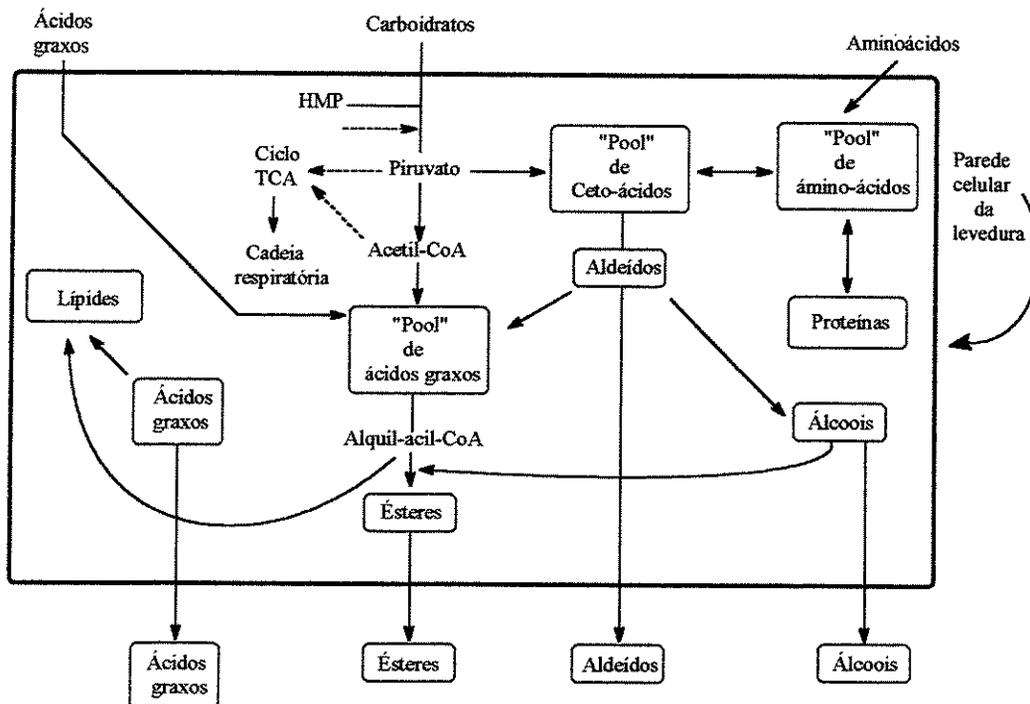


Figura 1. Vias básicas para formação dos compostos do sabor durante a fermentação (Fonte: Berry, 1995)

As bebidas alcoólicas podem ser classificadas como “encorpada” ou “leve”, de acordo com o seu conteúdo em compostos aromáticos, que podem variar em uma ampla faixa. O conteúdo dos compostos aromáticos do rum leve representa apenas 10% do conteúdo do rum encorpado (Suomalainen & Lehtonen, 1979). Em vinhos e cervejas,

muitos componentes "traço" normalmente conferem notas distintas de aroma, enquanto outros em maiores quantidades, como os ésteres e álcoois, contribuem para um sabor genérico de "fundo" (Cole & Noble, 1995).

Estudos em alimentos e bebidas, visando relacionar os componentes responsáveis pelo sabor com sua qualidade, são normalmente monitorados pela análise sensorial, que continua ainda sendo a única forma de avaliar a aceitação desses produtos, realizada diretamente através da percepção humana (Stone & Sidel, 1993). A concepção mais aceita de qualidade é aquela que a considera como o conjunto de características que diferenciam as unidades individuais de um produto e que têm importância na determinação do grau de aceitabilidade daquela unidade pelo comprador/consumidor. Essas características são as que tornam o produto agradável ao consumidor (cor, viscosidade, sabor, aroma, odor, buquê, ausência de defeitos e materiais estranhos à vista do consumidor), além de ser isento de substâncias tóxicas. Assim, a expectativa é de que o produto de melhor qualidade seja o mais bem aceito no mercado (Chaves & Póvoa, 1992).

Suomalainen (1971) preparou misturas artificiais contendo 66 componentes: 12 álcoois, 21 ácidos graxos, 26 ésteres e 7 aldeídos e verificou que os ésteres foram os que mais influenciaram o aroma. No grupo dos ácidos, o ácido acético, caprílico e láurico foram os que mais contribuíram; enquanto os álcoois, apesar de estarem presentes em concentrações próximas a 0,6 g/L, interferiram pouco no aroma. Aparentemente os aldeídos como o isovaleraldeído e isobutiraldeído são os mais importantes na fração dos aldeídos, devido ao seu odor pronunciado.

A aguardente de cana é composta principalmente de água e álcool, em proporções variáveis, segundo a sua graduação. Compõe-se ainda de componentes secundários e/ou compostos de sabor e de outros compostos em quantidade muito menor, embora importantes. Estes compostos pertencem às seguintes classes: aldeídos, ácidos, alcóois superiores, ésteres, furfural, terpenos, lactonas, furanos, pirazinas, dentre outros (Lima, 1964). Os teores destes compostos secundários na fermentação alcoólica são geralmente

inferiores a 0,1% e frequentemente inferiores a 0,001%. Qualitativamente, os componentes do aroma da aguardente são os mesmos que são encontrados nas demais bebidas alcoólicas fermentadas (vinhos, cervejas, saqué etc) e destiladas (conhaque, rum, uísque etc) (Maia, 1994).

Furtado (1995) identificou por meio da cromatografia gasosa 10 (dez) componentes em aguardente de cana, sendo estes o acetaldeído, acetato de etila, metanol, etanol, n-propanol, 2-butanol, isobutanol, n-butanol, álcool isoamílico e ácido acético. Dentre estes compostos o de maior concentração, para a maioria das amostras, foi o 2-butanol. Nonato (1999) identificou 38 compostos, em uma amostra de aguardente de cana, dentre eles álcoois, ácidos, ésteres, terpenos, cicloalcanos e hidrocarbonetos aromáticos. Os ésteres e álcoois foram os que mais se destacaram em número de compostos na amostra analisada.

Vargas (1995) avaliou a qualidade da aguardente de cana produzida em Minas Gerais no período de 1989 a 1994, através de seiscentos e oitenta e três (683) laudos de análise emitidos pelo Laboratório Vegetal do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária (MG) e verificou que a frequência de atendimento à legislação foi de 37%. O cobre, acidez volátil, e o exame organoléptico foram os parâmetros que mais contribuíram para a frequência de não atendimento (30, 28 e 24% respectivamente).

2.3.1. Etanol

O etanol, maior constituinte orgânico volátil das bebidas, em baixas concentrações tem apenas um leve odor e é um excelente solvente para materiais odoríferos. Tem um leve sabor doce e abranda o sabor ácido. O vinho desalcoolizado é muito mais adstringente do que o mesmo vinho com álcool (Amerine, 1972). De acordo com Berg et al. (1955b) o “threshold” para odor do álcool etílico é de 0,004 a 0,0052 g por 100 mL de água. Segundo Williams (1972), o etanol dá corpo às bebidas destiladas, vinhos e cidras, reduz a acidez aparente, aumenta a doçura e tem um efeito global de suavizar outros gostos característicos. Williams (1972) acrescenta ainda que o etanol é percebido em concentrações abaixo de 1%

devido ao seu odor frutado, apresentando um leve efeito secativo nas narinas. Seu “threshold” para odor é de 0,01% a 0,05% e para o gosto é da ordem de 1 a 2%.

2.3.2. Álcoois Superiores

Os principais álcoois superiores produzidos pelas leveduras são os álcoois alifáticos, n-propanol, isobutanol (2-metil-1-propanol), álcool amílico ativo (2-metil-1-butanol), álcool isoamílico (3-metil-1-butanol) e os álcoois aromáticos hexanol e 2-feniletanol (; Nykänen, 1986; Nykänen & Nykänen, 1991). O 3-metil-1-butanol é o álcool fúsel dominante nas bebidas. Seu conteúdo é aproximadamente metade do total da fração de álcool fúsel nas bebidas. O 2-metil-1-propanol é também abundante, mas seu conteúdo é muito menor do que do 3-metil-1-butanol. Os álcoois 1-propanol e 2-metil-1-butanol estão presentes em quantidades moderadamente altas (Lehtonen & Jounela-Eriksson, 1983).

Os álcoois fúsel têm um aroma característico e exercem uma grande influência no sabor das bebidas destiladas . O termo fúsel refere-se ao gosto e aroma de queimado destes álcoois. Os odores do isobutanol, álcool amílico ativo e isoamílico são muito penetrantes, o que torna sua presença facilmente detectada, mesmo em bebidas moderadamente aromatizadas (Nykänen, 1986; Nykänen & Nykänen, 1991). Os álcoois superiores concedem um aroma “alcoólico” ou “semelhante a solvente” às cervejas, e produzem um efeito de aquecimento no palato (Mac Donald et al., 1984).

Os uísques e conhaques devem suas características sensoriais, em parte, ao "óleo fúsel", ao qual tem sido atribuída a percepção de "corpo" ou “profundidade”. Um conhaque pouco encorpado tem cerca de 0,60-0,75 g/L de óleo fúsel; o médio tem 0,75-0,90 g/L e o pesado de 0,90-1,00 g/L (Guymon, 1972). O 2-feniletanol, formado a partir da fenilalanina, pode melhorar consideravelmente o sabor das bebidas alcoólicas por apresentar um odor suave de rosas (Nykänen & Nykänen, 1991).

Em concentrações muito baixas os álcoois superiores desempenham um papel desejável nas qualidades sensoriais (Amerine et al., 1972a). Contudo, Filipello (citado por Amerine et al., 1972a) achou uma correlação negativa entre o conteúdo de álcoois superiores e as qualidades sensoriais. Almeida & Barreto (1971) relataram que maiores teores de n-propanol estão correlacionados com aguardentes de qualidade inferior.

Amerine (citado por Amerine et al., 1972a) sugere que os álcoois superiores podem ser importantes não apenas por causa dos seus odores próprios, mas pela sua ação solvente sobre outras substâncias odoríferas, interferindo na volatilidade das mesmas e conseqüentemente nos seus “thresholds” sensoriais. O valor do “threshold” de odor para o isobutanol relatado na literatura é de 75 mg/L e para o álcool isoamílico, 6,5 mg/L (Salo et al., 1972).

Várias relações numéricas baseadas nos teores de álcoois superiores têm sido propostas como critério de diferenciação entre as bebidas alcoólicas. As relações entre álcool amílico/álcool isoamílico e propanol/isobutanol ocasionaram um alto grau de diferenciação entre bebidas alcoólicas de diferentes tipos e procedências (Lisle et al., 1978).

Singer (1966a, 1966b) observou que as proporções de álcoois C3, C4 e C5, expressas como uma relação entre o isopentanol/isobutanol e n-propanol/isobutanol, se situam em faixas distintas e típicas para cada bebida. Estas relações têm como objetivo a elucidação da origem, falsificação e identidade das bebidas alcoólicas, não se aplicando à avaliação da qualidade das mesmas. A relação álcool amílico/isoamílico é particularmente característica; o conhaque de boa qualidade e o de qualidade inferior apresentam relação de 0,19-0,24 e 0,24-0,26 respectivamente; e de 0,36-0,44 para o uísque. Esta relação foi determinada ser, em média, de 0,34 para uísques, 0,22 para brandies e 0,20 para runs Smedt & Liddle (1975).

Almeida & Barreto (1972) analisaram 60 amostras de aguardentes, provenientes de diferentes regiões do Brasil, e em todas identificaram os álcoois n-propanol, isobutanol e isoamílico; os teores variaram de um mínimo de 7,00, 6,40 e 19,60 a um máximo de 65,20, 36,60 e 98,50 mg/100 mL da amostra respectivamente. Segundo os autores as aguardentes classificadas, por seus caracteres organoléticos como de boa qualidade, apresentaram somente os 3 álcoois superiores acima referidos. As amostras de qualidade inferior apresentaram um teor elevado de n-propanol; em muitas foi identificado n-butanol e em algumas foi verificada a presença de 2-butanol e um composto não identificado que provavelmente era o 2-metil-butanol.

Mecanismo de Formação

O mecanismo de formação dos álcoois fúsel nas bebidas alcoólicas está bem esclarecido. Webb & Ingraham (1963) fizeram uma extensa revisão sobre o assunto. Os álcoois superiores são formados a partir de carboidratos e de aminoácidos, respectivamente na rota de biossíntese de aminoácidos e na de catabolismo dos mesmos (NyKänen & Suomalainen, 1983; Berry, 1984; Pigott et al., 1989). A formação de álcoois superiores a partir dos aminoácidos ocorre através de reações de descarboxilação e desaminação (Webb & Ingraham, 1963; Nykänen, 1986; Nykänen & Nykänen, 1991).

Ambas rotas podem ocorrer simultaneamente na fermentação, com desvio da rota degradativa para a rota biossintética quando os aminoácidos do mosto tiverem sido metabolizados (Reazin et al., 1970; Korhola et al. 1989; Berry, 1995).

Além disso, as leveduras são capazes de reduzir os aldeídos a álcoois durante a fermentação. Então os álcoois alifáticos de cadeia longa e os álcoois aromáticos, os quais ocorrem em menores quantidades em muitas bebidas destiladas, são formados provavelmente desta maneira (Nykänen & Nykänen, 1991). O mecanismo de formação dos álcoois superiores é similar ao envolvido na formação de etanol através do piruvato e a enzima que é envolvida na etapa final, álcool desidrogenase (ADH1), parece ser não

específica e ser responsável pela redução dos aldeídos a álcoois durante a formação de todos alcóois superiores (Reazin et al., 1970).

Na via catabólica de Ehrlich, os aminoácidos presentes no mosto são absorvidos pelas leveduras e transaminados para dar os α -cetoácidos, os quais são descarboxilados e reduzidos a álcool (Figura 2). Na via anabólica o piruvato e acetil-CoA formados pelo metabolismo dos carboidratos do mosto agem como precursores na biossíntese de aminoácidos. O penúltimo estágio na biossíntese de todos os aminoácidos é a produção do α -cetoácido apropriado, o qual é transaminado para formar o respectivo aminoácido. Como ocorre na via de Ehrlich, a descarboxilação e redução destes α -cetoácidos são responsáveis pela formação dos álcoois superiores. No caso dos álcoois superiores, tais como n-propanol, para o qual não há aminoácidos equivalentes encontrados naturalmente, a via anabólica é a única maneira de síntese (Mac Donald et al., 1984). Webb & Ingraham (1963) relatam que o n-propanol é formado em conexão com a treonina, o isobutanol com a valina, o álcool amílico opticamente ativo com a isoleucina e o álcool isoamílico com a leucina, pelas vias anabólicas e catabólicas.

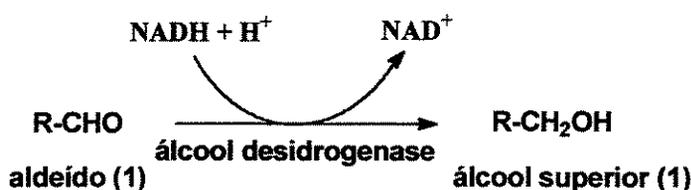


Figura 2. Esquema de formação de álcoois superiores nas leveduras pela via de Ehrlich (catabólica)

2.3.3. Aldeídos

A fração mais volátil das bebidas alcoólicas é composta de compostos carbonílicos (Nykänem, 1986). Compostos carbonílicos, tais como o diacetil e aldeídos (como por exemplo o acetaldeído) desempenham um papel importante no desenvolvimento de sabores. Aldeídos, que possuem um “threshold” muito baixo, tendem a ser considerados como “off-flavours” (Berry, 1995).

O acetaldeído é um subproduto normal da fermentação alcoólica e tem um odor pronunciado. Em cervejas o acetaldeído em excesso concede um sabor descrito como “gramíneo”, “maçãs esmagadas”, ou “cidra” (MacDonald et al., 1984). Berg et al. (1955a) relataram que o “threshold” do acetaldeído é de 1,3 a 1,5 mg por litro de água. Mas em vinhos de mesa Hinreiner et al. (1955) encontraram “threshold” de 0,1 a 0,125 mg.

Um grande número de aldeídos alifáticos tem sido identificado nas bebidas alcoólicas. Dentre estes, o acetaldeído é usualmente o composto encontrado em maior quantidade e representa mais que 90% do conteúdo de aldeídos nas bebidas. Por outro lado, como seu “threshold sensorial” é relativamente alto, pequenas variações no seu conteúdo dificilmente afetarão o odor das bebidas. Entretanto, o baixo conteúdo de acetaldeído nas bebidas é mais frequentemente associado com uma melhora da qualidade (Nykänen & Suomalainen, 1983). O acetaldeído e outros aldeídos alifáticos de cadeia curta possuem odor pungente o que pode aumentar o sabor picante das bebidas (Nykänen, 1986; Nykänen & Nykänen, 1991). Outros aldeídos saturados, desde o formaldeído (C₁) até o dodecanal (C₁₂), foram detectados em brandies e conhaques Marché et al. (citados por Nykänen & Nykänen, 1991). Muitos destes aldeídos podem também ser encontrados em uísque e rum (Nykänen & Suomalainen, 1983).

Além dos aldeídos saturados, deve ser levado em consideração o efeito potencial de alguns aldeídos insaturados no sabor das bebidas alcoólicas. Quando Kahn et al. (1968) determinaram por cromatografia gasosa um composto de baixo ponto de ebulição na fração de cabeça de um destilado de cerveja canadense, encontraram a acroleína. Eles sugeriram que a acroleína, que tem um odor penetrante e propriedades lacrimogênicas, é responsável pelo aroma apimentado (“peppery smell”) em uísques.

O furfural e o hidroximetilfurfural podem aparecer no caldo de cana, quando a colheita da cana é precedida da queima da folhagem, o que acarreta a desidratação parcial de uma pequena fração de açúcares presentes. A desidratação parcial de pentoses, leva ao 2-furfuraldeído (ou furfural); a desidratação de hexoses, leva ao 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (ou hidroximetilfurfural) (Novaes et al., 1974).

Nascimento et al. (1997) quantificaram o furfural e 5-hidroximetilfurfural em 56 aguardentes de cana brasileiras e encontraram teores médios de 0,40 e 0,49 mg/100 mL de etanol absoluto, respectivamente. Determinaram também, por cromatografia líquida, dezoito aldeídos em 56 aguardentes de cana e em 19 brandies de categoria internacional. Os

aldeídos mais importantes quantificados (mg/100 mL de etanol absoluto) nas aguardentes de cana, foram o formaldeído (0,01-1,20), 5-hidroximetilfurfural (nd-1,86), acetaldeído (3,3-20), acroleína (nd-0,70), furfural (nd-2,6), propionaldeído (nd-0,06), butiraldeído (nd-2,0), benzaldeído (nd-0,60), isovaleraldeído (nd-0,20) e n-valeraldeído (nd-0,20). O aldeído encontrado em maior quantidade em todas as aguardentes de cana foi o acetaldeído. As quantidades de aldeídos nos destilados internacionais foram significativamente maiores, comparadas com as aguardentes brasileiras.

Mecanismo de Formação

A maior parte do acetaldeído e de outros aldeídos alifáticos de cadeias curtas, encontrados em vinhos e bebidas destiladas, é formada durante a fermentação. Junto com os 2-cetoácidos eles são compostos chave nas reações bioquímicas de produção de álcoois fúsel, a partir de aminoácidos e açúcares, pelas leveduras. São formados dentro das células e então transferidos ao meio de fermentação (Nykänen, 1986). Há evidências que os cetoácidos servem como intermediários na síntese de aldeídos pelas leveduras durante a fermentação (Nykänen & Suomalainen, 1983).

Os aldeídos podem também ser formados durante a fermentação através da oxidação de álcoois (particularmente durante a maturação das bebidas), degradação oxidativa de Strecker de aminoácidos e autoxidação de ácidos graxos insaturados (Nykänen & Suomalainen, 1983).

O acetaldeído é formado no penúltimo estágio da via glicolítica ou via de Embden-Meyerhof-Parnas pela descarboxilação do piruvato, e redução a etanol pelo NADH^+ numa reação catalisada pela desidrogenase alcoólica. Além de ser reduzido a etanol, uma pequena parcela do acetaldeído produzida é oxidada a ácido acético, reação esta influenciada pela concentração do etanol presente (MacDonald et al., 1984).

2.3.4. Acetais

Álcool e acetaldeído reagem lentamente para formar acetal, um composto com odor um tanto pronunciado (Amerine et al., 1972b). O acetaldeído dietil acetal ou 1,1-dietoxietano é o composto naturalmente encontrado em maior quantidade entre os acetais (Nykänen & Nykänen, 1991)

Mecanismo de Formação

A formação de acetal ocorre na presença de álcool, em duas etapas consecutivas; na primeira fase, o aldeído combina com a molécula de álcool para formar o hemiacetal; na segunda fase, uma molécula adicional de álcool é acrescentada para formar o acetal. A reação é reversível, e os acetais formados podem ser hidrolisados a aldeído e álcool em soluções alcoólicas diluídas. Ambas as reações, de formação e hidrólise dos acetais são catalisadas por ácidos (Nykänen & Nykänen, 1983).

A formação de acetais reduz o conteúdo de aldeídos livres nos destilados; conseqüentemente, os acetais formados podem suavizar o odor pungente causado pelos aldeídos. Por causa da sua formação ser muito rápida em destilados, eles são compostos frequentemente encontrados nas bebidas destiladas (Nykänen & Nykänen, 1991).

2.3.5. Dicetonas

O composto carbonílico mais extensivamente estudado é o diacetil (2,3-butanediona) o qual dá uma contribuição importante para o sabor das cervejas tipo “larger”, vinhos tintos e algumas bebidas destiladas como o uísque e o rum. Embora sua presença seja considerada essencial para um sabor adequado, a sua produção excessiva pode causar o aparecimento de “off-flavours” (Berry, 1995). É um componente importante do sabor, sendo reconhecido em muitas bebidas alcoólicas, por causa do seu baixo valor de “threshold”, e do seu odor parecido com manteiga (Nykänen, 1986; Nykänen & Nykänen,

1991). Seu odor é tão intenso que o mesmo é detectado em misturas alcoólicas na quantidade de 3 µg por litro (Suomalainen, 1971).

Mecanismo de Formação

O diacetil é produzido pela descarboxilação oxidativa de hidroxiácidos. Nos últimos estágios da fermentação, o diacetil pode ser metabolizado pelas leveduras a acetoína e “2,3 butanodiona”. A síntese de diacetil e “2,3 pentanodiona” pode também ser resultante da contaminação da fermentação por certas bactérias tais como *Pediococcus* e *Lactobacillus* (Berry, 1995).

2.3.6. Ácidos Orgânicos

Os ácidos orgânicos encontrados nas bebidas alcoólicas são importantes sob vários aspectos. Primeiro, são componentes de um dos principais grupos do sabor. Todos ácidos orgânicos têm o atributo da acidez em grau variado, mas alguns têm suas características próprias de sabor. Por exemplo o ácido cítrico tem um sabor “ácido fresco” (“fresh acid”) diferente do ácido málico; o ácido succínico tem um sabor salgado “salty” incomum, amargo, além da sua acidez. Em segundo lugar, os ácidos diferem muito na sua utilização metabólica por microrganismos, particularmente pelas bactérias lácticas; o ácido succínico não é facilmente metabolizado anaerobio e aerobiamente, enquanto o ácido málico e cítrico são prontamente metabolizados anaerobiamente o que ocasiona mudanças no sabor das bebidas (Whiting, 1976).

Whiting (1976) relata ainda, que o ácido acético apresenta aroma característico e efeito no palato posterior, enquanto cada um dos homólogos de cadeia maior apresenta seus aromas característicos desagradáveis nas bebidas. Boza & Horii (1998) verificaram que a acidez influi negativamente no sabor da aguardente.

Segundo Whiting (1976) os principais ácidos orgânicos não voláteis encontrados nas bebidas alcoólicas são os oxiácidos (principalmente ácido pirúvico e 2-oxoglutarato), ácido L(-) málico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido citramálico, ácido D(-)2-metilmálico, ácidos 2,3-dihidroxi-butírico substituídos, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido L-pirrolidonecarboxílico (5-oxoproline), ácidos glicosídicos (ácido glicônico), glicolato e ácido glutárico.

Os ácidos graxos voláteis contribuem indubitavelmente para o sabor das bebidas destiladas, apesar de por si mesmos, serem apenas capazes de aumentar razoavelmente a acidez. A maioria dos ácidos presentes em bebidas destiladas, é de ácidos monocarboxilados comuns, formados durante a fermentação. O termo acidez volátil está completamente difundido, mas refere-se a compostos que podem ser vaporizados com o álcool e água e coletados no destilado, apesar de apresentarem ponto de ebulição mais alto do que a água. (Nykänen & Nykänen, 1991). Na acidez volátil das bebidas alcoólicas, além do ácido acético e láctico que são subprodutos normais da fermentação alcoólica estão presentes também os ácidos, fórmico, butírico, propiônico, e outros em quantidades ínfimas (Amerine et al., 1972a).

Os ácidos graxos voláteis que são produzidos durante a fermentação e que destilam, constituem o mais importante grupo de compostos do sabor em malte uísque e outras bebidas destiladas. Os mais importantes dentre os 31 ácidos identificados em uísques incluem os ácidos: propiônico (1,5%), isobutírico (4,9%), butírico (1,5%), isovalérico (5,9%), hexanóico (4,2%), octanóico (26,7%), decanóico (31,6%), dodecanóico (16,2%), tetradecanóico (2,2%) e 9-hexadecenóico (2,01%). Os valores em parênteses representam a percentagem em relação aos ácidos totais, excluindo o ácido acético, em um uísque escocês típico (Berry, 1984).

Ácidos graxos de cadeia média (C₆-C₁₀) podem representar 85-90% dos ácidos graxos totais das cervejas. A produção de ácidos graxos de cadeia média durante a fermentação para produção de cerveja, é associada com o sabor “caprílico” (“goaty”) ou

“de sabão/gordura”. É interessante notar que os nomes triviais dos três ácidos, capróico, caprílico e cáprico, respectivamente, são derivados do vocábulo latino “caper”, que significa cabra (MacDonald et al., 1984). Berry (1995) também relata que ácidos graxos de cadeia média podem ser excretados no meio e conferir um odor desagradável característico, às bebidas; ácidos graxos de alto peso molecular tendem a ser incorporados na estrutura das células, normalmente na forma de fosfolipídeos.

Apesar de haver uma grande variação na proporção relativa de ácido acético nas diferentes bebidas, esse ácido normalmente representa de 60 a 95% da acidez total ((Nykänen & Suomalainen, 1983). Segundo Nykänen et al. (1968) esse ácido representou 40-95% do total de ácidos voláteis em uísque, 75-90% em conhaques e brandies e 75-90% em rum). No entanto Lehtonen & Jounela-Eriksson (1983) relata que a composição da fração de ácidos graxos, excluindo o acético, é surpreendentemente invariável nas diferentes bebidas. Em vinhos a quantidade de ácido acético, produzido durante a fermentação alcoólica, é pequena, normalmente menor que 30 mg por 100 mL (Amerine et al., 1972a). Dentre algumas amostras de brandies, uísques, conhaques e runs, analisadas por Nykänen et al. (1968), o rum apresentou a maior quantidade de ácidos voláteis (600 mg/L), enquanto uma marca de uísque escocês apresentou o menor valor (90 mg/L).

Lehtonen & Jounela-Eriksson (1983) observaram diferenças mínimas nas proporções relativas de ácidos graxos em uísque, conhaque e rum. Relataram que há relativamente muito mais ácido propiônico, butírico e valérico em rum do que em uísque e conhaque, que contêm muito pouco ácido valérico. O conteúdo de ácidos graxos de cadeia ramificada, como o isobutírico, apresentou o mesmo nível em cada uma das bebidas, enquanto as proporções de ácido hexanóico e ácidos de cadeia maior foram ligeiramente menores em rum do que em outras bebidas.

Nykänen et al. (1968) verificaram que o ácido acético, caprílico, cáprico e láurico, foram os mais abundantes em amostras de brandies, conhaques e uísques. O rum conteve a maior quantidade de ácidos graxos de baixo peso molecular, particularmente os ácidos

propiónico e butírico. Suomalainen et al. (1974) relatam que os ácidos propiônicos, isobutírico, butírico, 2-metilbutírico e isovalérico apesar de estarem relativamente em menores quantidades, contribuem significativamente para o aroma das bebidas, pois possuem odores individuais muito mais fortes do que o ácido acético.

De acordo com Nykänen & Nykänen (1983) vinte e oito ácidos graxos monocarboxílicos já foram identificados em bebidas alcoólicas. Praticamente todos os ácidos monocarboxílicos de cadeia linear até o ácido octadecanóico, estão presentes nas bebidas destiladas. Além disso, ácidos de cadeia ramificada têm sido identificados em uísque, conhaque e rum (Nykänen et al., 1968). Segundo Leauté (1990) os ácidos graxos dão corpo às bebidas destiladas e são fixadores de vários compostos aromáticos. Os valores de “threshold” dos ácidos encontrados em bebidas alcoólicas variaram entre 0,7 a 20 ppm, em solução alcoólica a 10% (Suomalainen, 1971).

Nascimento et al. (1998) identificaram e quantificaram, em 20 amostras de aguardentes de cana brasileiras, o ácido acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, isocaprílico, caprílico, heptanóico, n-caprílico, n-capríco, láurico, mirístico e palmítico. Do total dos ácidos quantificados, 95,14% eram correspondentes ao ácido acético.

Mecanismo de Formação

Segundo Berry (1995) alguns ácidos orgânicos excretados no meio de fermentação são derivados de vias metabólicas intermediárias, como por exemplo o acético, málico e succínico; contudo, a maioria dos ácidos graxos de cadeia longa é derivada da via biossintética dos ácidos graxos. O ácido acético é o principal ácido orgânico excretado no meio de crescimento. É produzido pela oxidação do acetaldeído, com remoção de hidrogênios, na reação que é oposta à redução normal do acetaldeído a etanol.

A biossíntese de ácidos orgânicos durante a fermentação de várias bebidas alcoólicas foi revisada por Whiting (1976). Inicialmente os ácidos orgânicos formados na fermentação são resultantes do metabolismo de aminoácidos, que produzem α -cetoácidos. Posteriormente, a formação dos ácidos é devida ao metabolismo de carboidratos, via Embden-Meyerhof-Parnas e em certas reações no ciclo de Krebs (MacDonald, 1984).

Tem sido demonstrado em fermentações de uísques, que os ácidos voláteis podem originar-se tanto a partir de carboidratos como de aminoácidos. A maior parte do ácido acético é derivada de carboidratos mas os ácidos n-butírico e isovalérico são em parte derivados da leucina (Reazin et al., 1970).

O mecanismo mais provável de formação de ácidos graxos pelas leveduras parece ser o descrito por Lynen (1967). De acordo com esse pesquisador, a biossíntese de ácidos graxos ocorre em várias fases consecutivas. A reação inicial é a formação de acetil-coA, pela descarboxilação oxidativa do ácido 2-oxopropanóico ou pela ativação do acetato derivado da oxidação do álcool etílico. A próxima fase envolve a formação de um intermediário N-carboxibiotinil seguido pelo acoplamento do grupo carboxil com a acetil-coA para formar o malonil-coA reativo; então dois átomos de carbono derivados do malonil-coA são adicionados em ciclos sucessivos a acil-coA. Logo, os ácidos graxos que são formados têm número par de átomos de carbono. Quando ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono são formados, a etapa inicial começa com propanoil-CoA, ao invés de acetil-CoA.

Os ácidos insaturados são também formados por um mecanismo similar (Nykänen & Suomalainen, 1983). A ocorrência de ácidos graxos insaturados parece depender das condições de fermentação. Fermentações conduzidas em condições aeróbicas produzem quantidades significativamente maiores de ácidos graxos insaturados do que as fermentações estritamente anaeróbicas (Nykänen & Nykänen, 1991).

2.3.7. Ésteres

Os ésteres formam o mais interessante e o maior grupo de compostos do sabor em bebidas destiladas (Nykänen & Nykänen, 1991; Berry, 1995). É evidente que a sua quantidade e proporções relativas são de grande importância na percepção do aroma das bebidas (Nykänen & Nykänen, 1991). Nykänen & Suomalainen (1983) identificaram 242 ésteres de ácidos monocarboxílicos alifáticos em bebidas alcoólicas; destes, 61 foram encontrados em rum. Como compostos voláteis que concedem um odor agradável, são de grande importância para o aroma das bebidas alcoólicas. Parece, entretanto, que as propriedades particulares do aroma somente raramente podem ser associadas a um éster específico (Nykänen, 1986).

Os ésteres contribuem para um aroma de frutas no “bouquet” da bebida (Cole & Noble, 1995). O éster etílico, isobutílico, isoamílico e os ésteres de ácidos graxos de cadeia curta têm um aroma agradável de frutas e são os principais componentes que interferem na percepção do aroma (Suomalainen & Lehtonen, 1979; Lehtonen & Jounela-Eriksson, 1983).

Os ésteres mais importantes encontrados nas cervejas são o acetato de etila (aroma de frutas, parecido com solvente, “solvent-like”), acetato de isoamila (aroma de pera), acetato de isobutila (aroma de banana), caproato de etila (aroma de maçã) e acetato de 2-fenil (aroma de mel, frutas, flores) (Peddie, 1990). O “threshold” para odor dos ésteres é baixo, variando entre 0,2 ppm para o acetato de isoamila a 17 ppm para o acetato de etila (Suomalainen, 1971).

Em geral, o nível de acetato de etila em bebidas destiladas é alto (Nykänen & Nykänen, 1991). Considerando o conteúdo total de ésteres, o acetato de etila geralmente excede 50%; em brandies e conhaques a proporção de acetato de etila pode ser tão alta como 90 a 95% Adam (citado por Nykänen & Nykänen, 1991) e em uísques americanos, 56 a 72% (Schoeneman & Dyer, 1968).

Os ésteres exercem um papel importante nos odores de vinhos e conhaques. Em vinhos, o acetato de etila em concentrações abaixo de 200 mg por litro parece ter um odor desejável, mas em concentrações maiores é associado a uma característica de deterioração (Amerine et al., 1972a). Nos conhaques, o acetato de etila é o éster mais comum, sendo também relatados ésteres de álcoois propílico e butílico, que em pequenas concentrações não são desagradáveis (Amerine et al., 1972b).

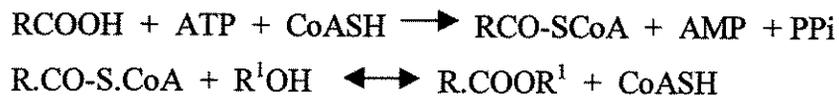
Nykänen & Nykänen (1983) relatam que em rum a quantidade de acetato de etila varia entre 20 a 400 mg/L, mas existem runs que contêm menos do que 5 mg/L ou mais do que 1000 mg/L. Em uísque escocês seu conteúdo médio é de 145mg/L. Em uísque canadense ou japonês seu conteúdo é menor que 100 mg/L (Lehtonen & Jounela-Eriksson, 1983).

Praticamente todos os ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia linear saturada, desde o ácido acético até o ácido octadecanóico foram identificados em uísques, conhaques, brandies e runs. Além disso, a complexidade da fração éster é aumentada pelo fato das frações de sabor conterem um grande número de ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia ramificada, ácidos graxos insaturados, hidroxiácidos e ácidos dibásicos, assim como ésteres com a unidade de álcool maior do que o etanol (Nykänen & Nykänen, 1991).

Llistó et al.(1979) detectaram em 11 amostras de aguardentes de cana, a presença dos ésteres acetato de butila, acetato de etila, butirato de etila e acetato de isoamila. Os teores encontrados variaram de um mínimo de 26,71; 31,75; 35,77 e 41,23 a um máximo de 68,68; 67,20; 84,85 e 86,51 mg por 100 mL da amostra, respectivamente.

Mecanismo de Formação

A formação de ésteres, pelas leveduras, é extensamente discutida na literatura. Os primeiros estudos detalhados sobre a biossíntese de ésteres pelas leveduras, foram conduzidos por Nordström (1961, 1962, 1963, 1964 a. 1964b). O autor propôs que os ésteres são formados pela alcoólise da acil-coenzima A (-CoA) dentro das células de levedura:



onde,

AMP Adenosina-5'-monofosfato; CoASH Coenzima A; RCO-SCoA acil Coenzima A; RCOOH ácidos; RCOOR ésteres; PPI pirofosfato inorgânico

Os compostos envolvidos na produção de ésteres são o etanol ou álcoois superiores, ácidos graxos, coenzima A e uma enzima sintetizante que foi descrita pela primeira vez por Nordström (1962). O composto acil-CoA mais comum é o acetil-CoA, que é formado pela descarboxilação oxidativa do piruvato e tem um papel central no metabolismo das leveduras. Os compostos acil-CoA maiores são intermediários do metabolismo de ácidos graxos (MacDonald et al., 1984).

Posteriormente Nordström (1963, 1964a) propôs que os álcoois tornam-se esterificados pela reação com os ácidos graxos que sofreram uma ativação prévia pela combinação com CoASH. E concluiu que apesar da acetil-CoA poder ser formada pela descarboxilação oxidativa do piruvato, a maioria dos outros compostos acil-CoA é proveniente da acilação da CoASH pela ação da acil-CoA sintetase. É nesta forma ativada que os compostos acil-CoA podem agir como doador do grupo acil.

A unidade ácida dos ésteres voláteis pode ser obtida das 3 maneiras seguintes:

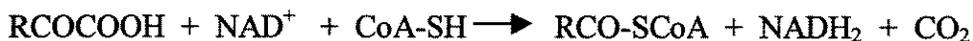
1) Pela ativação dos ácidos monocarboxilados



onde

ATP Adenosina-5' trifosfato

2) A partir de 2-oxiácidos por descarboxilação oxidativa

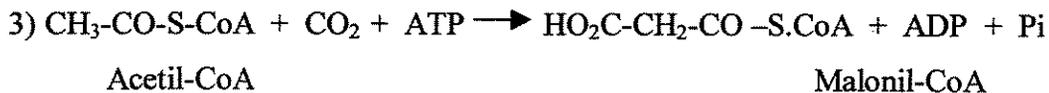


onde,

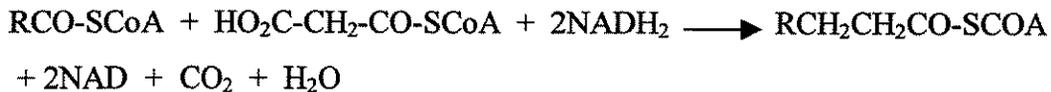
NAD^+ e NADH_2 Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (difosfopiridina-nucleotídeo) e sua forma reduzida

De acordo com este mecanismo, a acil-coenzima-A funciona como um composto - chave na biossíntese de ésteres. Durante a fermentação, as leveduras produzem acil-CoA dentro das células através da ativação de ácidos graxos ou através da descarboxilação oxidativa de cetoácidos. Os dois primeiros mecanismos diferem principalmente na capacidade de utilizar ATP, o primeiro requer ATP e o segundo não.

Além destas reações, o terceiro mecanismo envolve uma fase intermediária similar à que foi descrita para a síntese de ácidos graxos, que corresponde ao alongamento da cadeia carbônica. A primeira fase de síntese de ésteres é também a formação de malonil-CoA; em um complexo multienzimático, malonil-CoA então se une ao acil-CoA, o qual foi formado em um ciclo anterior, e transfere duas unidades de carbono à cadeia carbônica do ácido. A etapa final é a clivagem da enzima do complexo. Na presença de álcool, a reação produz um éster, enquanto na presença da água, o resultado é um ácido graxo livre (Nykänen & Nykänen, 1991).



onde, ADP Adenosina-5' difosfato; Pi Fosfato inorgânico



A quantidade de ésteres específicos produzidos é dependente da abundância relativa dos álcoois correspondentes e da acil-CoA produzida pelas leveduras. Desde que a acetil-CoA e o etanol são os mais abundantes, o acetato de etila é normalmente o éster predominante (Berry, 1995).

Yoshioka & Hashimoto (1981) mostraram que as leveduras de cerveja, de saké e de vinhos de uva, sintetizam acetato de isoamila a partir do álcool isoamílico somente na presença de acetil-CoA. Em contraste, estas leveduras produzem acetato de etila a partir de etanol e ácido acético assim como de etanol e acetil-CoA. Os autores sugeriram que a formação de acetato de isoamila depende exclusivamente da ação do álcool acetiltransferase, enquanto a formação de acetato de etila depende tanto do álcool acetiltransferase como da reação reversa das estereases. Uma das leveduras que sintetizam ésteres utilizando as enzimas estereases é a *Hansenula anomala*, que pode sintetizar mais de 400 ppm de acetato de etila através desta reação (Peddie, 1990). A enzima acetiltransferase mostrou-se fortemente inibida por ácidos graxos insaturados, metais pesados e compostos sulfidrílicos.

O acetato de etila aparentemente é também formado por reações químicas durante o armazenamento das bebidas alcoólicas, o que pode ser evidenciado pelo aumento no seu nível nos uísques envelhecidos em comparação com os não envelhecidos (Brandt, 1982).

Thurston (citado por Peddie, 1990) sugeriu que durante a fermentação há duas induções na síntese de éster. Durante o início da fermentação a síntese de éster é muito lenta devido à alta demanda metabólica por acetil-CoA para o crescimento da levedura (Yoshioka & Hashimoto, 1981). Nesta etapa o oxigênio e a acetil-CoA são rapidamente consumidos na produção de ácidos graxos insaturados. Imediatamente após esta etapa é estabelecido um equilíbrio entre o consumo de acetil-CoA para a síntese de ácidos graxos e de esteróis e para produção de éster. Isto representa a primeira indução para a síntese de ésteres e ocorre após aproximadamente 8 horas de fermentação. Quando a síntese de ácidos graxos e esteróis finalmente acaba, há um pico no nível celular de acetil-CoA e na carga de acetil (a taxa entre [acetil-CoA] e [acetil-CoA + CoASH]), neste ponto ocorre a segunda indução na síntese de ésteres. Isto acontece aproximadamente no meio da fermentação (entre 20 e 30 horas) e tem relativamente uma pequena duração. Entretanto, contribui significativamente para a síntese total de ésteres.

Os ésteres podem ser formados para remover, das células de leveduras, os ácidos graxos tóxicos, ésteres de cadeia curta de ácidos graxos (por ex., C_2 - C_6) podem também ser produzidos pela mesma razão de desintoxicação celular (Nordström, 1962 e 1964a e 1964b). Segundo Rainbow (1970) os ácidos graxos com o comprimento da cadeia entre C_8 - C_{14} são tóxicos para as leveduras, e exibem uma forte atividade antimicrobiana; e se estes forem insaturados o efeito é intensificado.

De acordo com Nykänen & Nykänen (1991) os ésteres de baixo ponto de ebulição, principalmente acetato de etila, de 2-metilpropila e de 3-metilbutila, assim como os ésteres correspondentes ao ácido butanóico são voláteis mesmo à temperatura ambiente e, além disso apresentam valores de “threshold” um tanto baixo para odor. Portanto, mesmo quando estão presentes em baixas concentrações é possível reconhecê-los nas análises sensoriais por seus odores característicos.

Os outros ésteres, que podem aumentar o odor característico das bebidas destiladas, incluem ésteres etílicos desde o hexanoato ao dodecanoato de etila. Apesar da sua baixa

volatilidade, eles são fatores marcantes do sabor em uísques, conhaques, brandies e rum devido aos seus valores relativamente baixos de “threshold” (Nykänen & Nykänen, 1991).

2.3.8. Outros constituintes

2.3.8.1. Glicerol

A maioria dos enologistas aponta o glicerol como um composto de considerável importância sensorial por causa do seu sabor doce e sua oleosidade. Berg et al. (1955a) estabeleceram um “threshold” de 0,38 a 0,44 % em água. Nas aguardentes de cana o teor de glicerol pode chegar a 10% da concentração de etanol (cerca de 0,7% p/v) de acordo com Maia (1994). A importância do glicerol está relacionada com a qualidade das bebidas alcoólicas como relatado por Rankine & Bridson (1971) para vinho de uva, e por Parfait & Jouret (1980) para rum. Por causa do seu gosto adoçado similar a glicose, um alto conteúdo de glicerol pode ter um efeito favorável no gosto dos vinhos (Radler & Schutz, 1982).

2.3.8.2. Compostos sulfurados

Os compostos sulfurados apresentam odores desagradáveis e um “threshold” baixo, portanto têm um efeito negativamente marcante no aroma das bebidas (Suomalainen & Lehtonen, 1979).

A maioria dos 50 compostos sulfurados já identificados em bebidas alcoólicas, é oriunda diretamente das matérias-primas. Contudo, alguns são derivados do metabolismo das leveduras. O sulfeto de hidrogênio pode ser produzido durante a degradação da metionina e cisteína, liberadas durante a autólise das leveduras, do “reciclo” de proteínas, ou a partir do enxofre inorgânico presente no meio. As leveduras podem também produzir dimetil sulfeto (DMS) a partir de alguns precursores como S-metil-metionina e D-dimetil-sulfóxido, quando presentes no meio. As leveduras não são consideradas fonte importante

de DMS, o qual provavelmente está presente em altas quantidades em matérias- primas, tal como na cevada malteada (Berry, 1995).

Normalmente, o sulfeto de hidrogênio produzido durante a fermentação é eliminado com o dióxido de carbono formado; entretanto fermentações lentas e com longos períodos de espera no final da fermentação podem ocasionar autólise das células de levedura e haver desenvolvimento de odores de enxofre (Berry, 1995). O sulfeto de hidrogênio, formado durante a fermentação e destilado com o conhaque, pode reagir com álcoois formando mercaptanas, composto com um odor e sabor muito desagradável (Amerine et al., 1972b).

A possível relação dos teores de enxofre com a qualidade sensorial inferior das aguardentes de cana destiladas na ausência do cobre foi apontada por Faria (1989). Isique et al. (1998) analisaram amostras de aguardentes brasileiras e verificaram haver correlação negativa significativa ($p \leq 0,05$) entre os teores de enxofre e a aceitabilidade das mesmas, ressaltando o papel negativo dos compostos sulfurados, presentes nas aguardentes.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHVENAINEN, J. Lipid composition of aerobically and anaerobically propagated brewer's bottom yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 88, p. 367-370, 1982.
2. ALMEIDA, M. E. W., BARRETO, H. H. C. Álcoois superiores em aguardente de cana por cromatografia gasosa. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 31, p. 117-123, 1972.
3. AMERINE, M.A.; BERG, H.W.; CRUESS, W.V. **The Technology of wine making**. 3.ed. Westport: The Avi publishing Company Inc., 1972a. cap. 5: Chemistry of fermentation and composition of wines: p. 177-244.

4. AMERINE, M.A.; BERG, H.W.; CRUESS, W.V. **The Technology of wine making**. 3.ed. Westport: The Avi publishing Company Inc., 1972b. cap.17: Brandy Production: p. 600-644.
5. ANDERSON, R.G.; KIRSOP, B.H. The control of volatile ester synthesis during the fermentation of wort os high specific gravity. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 80, p. 48-53, 1974.
6. BERG. H.W.; FILEPELLO, F.; HINREINER, E.; WEBB. A.D. Evaluation of thresholds and minimum difference concentrations for various constituents of wines. I. Water solutions of pure substances. **Food Technology**, Chicago, p. 23-26, 1955a.
7. BERG. H.W.; FILEPELLO, F.; HINREINER, E.; WEBB. A.D. Evaluation of thresholds and minimum difference concentrations for various constituents of wines. II. Sweetness: The effect of ethyl alcohol, organic acids and tannin. **Food Technology**, Chicago, p. 138-140, 1955b.
8. BERRY, D.R. The physiology and microbiology of scotch whisky production . In: BUSHELL, M.E.(Ed.) **Progress in Industrial Microbiology: modern applications of traditional biotechnologies**. Amsterdam: Elsevier, 1984. v. 19, p. 199-243.
9. BERRY, D.R. Alcoholic beverage fermentations. In: LEA, A.G.H.; PIGGOTT, J.R. **Fermented Beverage Production**. 1 ed. London: Blackie academic & professional, 1995. Cap 2, p. 32-44.
10. BOZA, Y. E. A.G. **Influência da condução da destilação sobre a composição e a qualidade sensorial da aguardente de cana**. Piracicaba, 1996. 143p. Tese (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

11. BRANDT, D.A. Distilled beverage alcohol. In: REED, G. (Ed.) PRESCOTT, S.C.; DUNN, C.G. **Industrial Microbiology**. 4 ed. Westport: The AVI Publishing Company Inc., 1982, p. 468-91.

12. BRASIL. Decreto nº 2.314 do Ministério da Agricultura de 04 de setembro de 1997. Dispõe sobre o registro, classificação, padronização, produção e fiscalização das bebidas. **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 de set. 1997.

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

14. CASTOR, J.G.B.; GUYMON, J.F. On the mechanism of formation of higher alcohols during alcoholic fermentation **Science**, Washington, v.115. n.8, p. 147-149, 1952.

15. CHAVES, J.B.; PÓVOA, M. E. B. A qualidade da aguardente da cana de açúcar. In: MUTTON, M. J.R., MUTTON, M. A. **Aguardente de cana**; produção e qualidade. Jaboticabal: Funep, 1992. p. 93-132.

16. COLE, V.C.; NOBLE, A.C. Flavor chemistry and assessment. In: LEA, A.G.H.; PIGGOTT, J.R. **Fermented Beverage Production**. 1ed. London: Blackie Academic & Professional, 1995. cap. 14, p. 361-385, 1995.

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

18. CROWELL, E.A.; GUYMON, J.F. Influence of aeration and suspended material on higher alcohols, acetoin, and diacetyl during fermentation. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 14, n. 4, p. 214-222, 1963.
19. de RIJKE, R.; ter HEIDE, R. Flavour compounds in rum, cognac and whisky. In : PIGGOTT, J.R.(Ed.) **Flavour of distilled beverages: Origin and Development**. Florida: Verlag Chemie International, INC., 1983. p. 79-92. (Ellis Horwood series in food science and technology).
20. FARIA, J.B. **A influência do cobre na qualidade das aguardentes de cana (*Saccharum officinarum*, L.)**. São Paulo, 1989. 88p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
21. FARIA, J.B.; DELIZA, R.; ROSSI, E.A. Compostos sulfurados e a qualidade das aguardentes de cana (*Saccharum officinarum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.13, n.1, p. 90-93, 1993.
22. FLEET, G.H.; LAFON-LAFOURCADE, S.; REBÉREAU-GAYON, P. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of bordeaux wines. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, n. 5, p. 1034-1038, 1984.
23. FURTADO, S.M.B. **Avaliação sensorial descritiva de aguardente de cana. Influência da composição em suas características sensoriais e correlação entre as medidas sensoriais e físico-químicas**. Campinas, 1995. 99p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
24. GIUDICI, P.; ROMANO, P.; ZAMBONELLI, C. A biometric study of higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 36, p. 61-64, 1990.

25. GUTIERREZ, L.E. Produção de glicerol por linhagens de *Saccharomyces* durante fermentação alcoólica. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luíz Queiroz**, Piracicaba, v. 48, p. 55-69, 1991.
26. GUYMON, J.F. Higher alcohols in beverage brandy. **Wines & Vines**, San Francisco, v.1, p. 37-40, 1972.
27. GUYMON, J. F. Chemical aspects of distilling wines into brandy. In: WEBB, A.D. (Ed.). **Chemistry of Winemaking**. Dallas: American Chemical Society, 1973. p. 232-253.
28. GUYMON, J. F., INGRAHAM, J.L.; CROWELL, E.A. Influence of aeration upon the formation of higher alcohols by yeasts. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 12, n. 2, p. 60-66, 1961.
29. HINREINER, E.; FILIPELLO, F.; BERG, H.W.; WEBB, A.D. Evaluation of thresholds and minimum difference concentrations for various constituents of wines. IV. Detectable differences in wine. **Food Technology**, Chigago, p. 489-490, 1955.
30. ISIQUE, W.D.; CARDELLO, H.M.A.B.; FARIA, J.B. Teores de enxofre e aceitabilidade de aguardentes de cana brasileiras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v.18, n.3, p. 356-359, 1998.
31. KAHN, J.H.; LAROE, E.G.; CONNER, H.A. Whiskey composition: identification of components by single-pass gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 33, p. 395-400, 1968.
32. KORHOLA, M.; HARJU, K. & LEHTONEN, M. Fermentation. In: PIGGOTT, J.R.; SHARP, R.; DUNCAN, R.E.B. **The science and technology of wiskies**. London: Longman Scientific & Technical, 1989. cap.4, p. 89-117.

33. LAING, D.G. & JINKS, A. Flavour perception mechanisms. **Food Science & Technology**, v.7, n.12, p. 387-389, 1996.
34. LÉAUTÉ, R. Distillation in alambic. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 41, n. 1, p. 90-103, 1990.
35. LEHTONEN, M. & JOUNELA-ERIKSSON, P. Volatile and non-volatile compounds in the flavour of alcoholic beverages. In: PIGGOTT, J.R. **Flavour of distilled beverages: Origin and Development**. Flórida: Verlag Chemie International Inc., 1983. p. 64-78.
36. LIMA, U.A. **Estudo dos principais fatores que afetam os componentes do coeficiente não álcool das aguardentes de cana**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luís Queiroz da USP, 1964. 141 P. (Tese, concurso efetivo ao cargo de professor catedrático – ESALQ).
37. LISLE, D.B.; RICHARDS, C.P.; WARDLEWORTH, D.F. The identification of distilled alcoholic beverages. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 84, p. 93-96, 1978.
38. LLISTÓ, A.M.S.M; SOUZA, L.G.; MISCHAN, M.M. Alguns componentes do coeficiente não-álcool das aguardentes de cana: ésteres. **Brasil açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 92, n.5, p. 341-6, 1979
39. LONGO, E.; VELÁZQUEZ, J.B.; SIEIRO, C.; CANSADO, J., CALO, P.; VILLA, T.G. Production of higher alcohols, ethyl acetate, acetaldehyde and other compounds by 14 *Saccharomyces cerevisiae* wine strains isolated from the same region (Salnés, N.W. Spain). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 8, p. 539-541, 1992.

40. LURTON, L., SNAKKERS, G.; ROULLAND, C.; GALY, B. Influence of the fermentation yeast strain on the composition of wine spirits. **Journal of the Science and Food and Agriculture**, London, v. 67, p. 485-491, 1995.
41. LYNEN, F. Proceedings of the biochemical society. International symposium on lipids. Enzyme systems for fatty acid synthesis. **The Biochemical Journal**, London, v. 128, n. 1, p. 1-2, 1972.
42. MACDONALD, J.; REEVE, P.T.V.; RUDDLESDEN, J.D.; WHITE, F.H. Current approaches to brewery fermentations. In: BUSHELL, M. E. (Ed.). **Progress in industrial microbiology: modern applications of traditional biotechnologies**. Amsterdam: Elsevier, 1984. v. 19, p. 48-198.
43. MAIA, A. B. R. Componentes secundários da Aguardente. **STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.12, n.6, p. 29-34, 1994.
44. MAIA, A. B. R. A. **1º Curso AMPAQ de produção artesanal de aguardente de qualidade**. Belo Horizonte, 1995. 106p.(apostila).
45. MATEO, J.J., JIMENEZ, M.; HUERTA, T.; PASTOR, A. Contribution of different yeasts isolated from musts of monastrell grapes to the aroma of wine. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 14, p.153-160, 1991.
46. MATEO, J.J., JIMENEZ, M.; HUERTA, T.; PASTOR, A. Comparison of volatiles produced by four *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from monastrell musts. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 43, n. 2, p. 206-209, 1992.
47. MEILGAARD, M.C.; PEPPARD, T.L. The flavour of beer. In: MORTON, I.D.; MACLEOD, A.J.(Eds). **Food Flavours. Part B. The flavour of Beverages**. New

York: Elsevier Science Publishing Company, INC., 1986. cap IV, p. 99-170.
(Developments in Food Science 3B).

48. MORAIS, P.B.; ROSA, C. A., LINARDI, V. R.; PATARO, C.; MAIA, A.B.R.A. Short communication: characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of brazilian sugar-cane aguardente. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 13, p. 241-243, 1997.
49. NASCIMENTO, R.F. **Aldeídos, ácidos e compostos sulfurados em aguardentes de cana-de-açúcar (*Saccharum ssp*)**. São Carlos, 1997. 126p. Tese (Doutor em Ciências-Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
50. NASCIMENTO, R.F.; MARQUES, J.C.; NETO, B.S.L.; KEUKELEIRE, D.; FRANCO, D. W. Qualitative and quantitative high-performance liquid chromatographic analysis of aldehydes in Brazilian sugar cane spirits and other distilled alcoholic beverages. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, 782, p. 13-23, 1997.
51. NASCIMENTO, R.F.; CERRONI, J.L.; CARDOSO, D.R.; LIMA NETO, B.S.; FRANCO, D.W. Comparação dos métodos oficiais de análise e cromatográficos para determinação dos teores de aldeídos e ácidos em bebidas alcoólicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 350-355, 1998.
52. NONATO, E.A. **Identificação e quantificação de compostos secundários em aguardentes de cana por CG/EM**. Belo Horizonte, 1999.114 p. Tese (Mestre em Química-Química Orgânica) – Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais.

53. NORDSTRÖM, K. Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 67, p. 173-181, 1961.
54. NORDSTRÖM, K. Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast II. Kinetics of formation from ethanol and influence of acetaldehyde. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 68, p. 188-196, 1962.
55. NORDSTRÖM, K. Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast IV. Metabolism of acetyl-coenzyme A. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 69, p. 142-153, 1963.
56. NORDSTRÖM, K. Formation of esters from acids by brewer's yeast II. Formation from lower fatty acids. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 70, p. 42-55, 1964a.
57. NORDSTRÖM, K. Formation of esters from acids by brewer's yeast IV. Effect of higher fatty acids and toxicity of lower fatty acids. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 70, p. 233-242, 1964b.
58. NOVAES, F.V.; STUPIELLO, J.P.; OLIVEIRA, E.R.; VALSECHI, O. **I Curso de Extensão em Tecnologia de Aguardente de Cana**. (apontamentos), Piracicaba, 1974. 104 p (apostila).
59. NYKÄNEN, L. Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 37, n. 1, p. 84-96, 1986.
60. NYKÄNEN, L.; NYKÄNEN, I. Production of esters by different yeast strains in sugar fermentations. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 83, p. 30-31, 1977.

61. NYKANEN, L.; NYKANEN, I. Rum flavour. In: PIGGOTT, J.R.(Ed.) **Flavour of distilled beverages: Origin and development.** Florida: Verlag Chemie International, INC., 1983. p. 49-63. (Ellis Horwood series in food science and technology).
62. NYKANEN, L. & NYKANEN, I. Distilled beverages. In: MAARSE, H.(Ed.) **Volatile compounds in food and beverages.** New York: Marcel Dekker, INC., 1991. p. 548-580.
63. NYKANEN, L.; PUPUTTI, E.; SUOMALAINEN, H. Volatile fatty acids in some brands of whisky, cognac and rum. **Journal of food Science**, Chicago, v. 33, p. 88-92, 1968.
64. NYKANEN, L. & SUOMALAINEN, H. **Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages.** Berlin: Akademik-Verlag, 1983. 413p.
65. PARFAIT, A.; JOURET, C. Formation of higher alcohols in rum. **Annales de Technologie Agricole**, Paris, v.24, p.421-36, 1975.
66. PARFAIT, A.; JOURET, C. Le glycerol dans la fermentation alcoolique des mélasses et des jus de cannes a sucre. **Industries Alimentaires et Agricoles**, Paris, v.97, n.(7/8), p. 721-724, 1980.
67. PATARO, C.; SANTOS, A.; CORREA, S.R.; MORAIS, P.B.; LINARDI, V.R.; ROSA, C.A. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in an aguardente distillery. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, n. 29, p. 69-73, 1998.
68. PATARO, C.; GUERRA, J.B.; PETRILLO-PEIXOTO, M.L.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; LINARDI, V.R.; ROSA, C.A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal

- fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, p. 1-9, 2000.
69. PEDDIE, H.A.B. Ester formation in brewery fermentations. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 96, p. 327-331, 1990.
70. PEPE, P.R. Dois anos de PBDAC valeu?. **Boletim do Programa de Desenvolvimento da Aguardente de Cana, Caninha ou Cachaça**, São Paulo, nov. 1999, n.1, Informativo PBDAC, p. 1-4.
71. RADLER, F.; SCHÜTZ, H. Glycerol production of various strains of *Saccharomyces*. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 33, n. 1, p. 36-40, 1982.
72. RAINBOW, C. Brewer's yeasts. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. **The Yeasts**. London: Academic Press, 1970. cap. 4, v.3., p. 147-224.
73. RAMSAY, C.M.; BERRY, D.R. The effect of inoculum level on the formation of higher alcohols, fatty acids and esters in the malt whisky fermentation. **Food Microbiology**, London, v. 1, p. 111-115, 1984a.
74. RAMSAY, C.M.; BERRY, D.R. Effect of temperature and pH on the formation of higher alcohols, fatty acids and esters in the malt whisky fermentation. **Food Microbiology**, London, v.1, p. 117-121, 1984b.
75. RANKINE, B.C.; BRIDSON, D.A. Glycerol in australian wines and factors influencing its formation. **Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.22, p. 6-12, 1971.
76. REAZIN, G.; SCALES, H.; ANDREASEN, A. Mechanism of major congener formation in alcoholic grain fermentations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 18, n. 4, p. 585-589, 1970.

77. REED, G. & NAGODAWITHANA, T.W. **Yeast technology**. New York: An avi Book Published by Nostrand Reinhold, 1991. cap. 5, p. 225-259: Distiller's yeasts.
78. RIBEIRO, C. A. F. **Potencialidades de diferentes linhagens de levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* na tecnologia de aguardente de cana**. Piracicaba, 1997. 107 p. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
79. RUSSEL, I.; JONES, R.; GRAHAM, G., STEWART, G.G. **Yeast - The primary Industrial microorganism**. In: STEWART, G.; RUSSEL, I.; KLEIN, R.; HIEBSCH, R. **Biological research on industrial yeasts**. v. 1, CRC Press, Inc., 1987.
80. SALO, P.; NYKÄNEN, L.; SUOMALAINEN, H. Odor thresholds and relative intensities of volatile aroma components in an artificial beverage imitating whisky. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 37, p.394-398, 1972.
81. SANNI, A.I. ; LONNER, C. Identification of yeasts isolated from Nigerian traditional alcoholic beverages. **Food Microbiology**, London, v. 10, p. 517-523, 1993.
82. SCHOENEMAN, R.L., DYER, R.H. Alcoholic Beverages: Analytical profile of cistern room whiskies. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, Arlington, v.51, n.5, p. 973-987, 1968.
83. SHEHATA, A.M.E. Yeasts isolated from sugar cane and its juice during the production of aguardente de cana. **Applied Microbiology**, Washington, v. 8, p. 73-75, 1960.
84. SIMPSON, A.C. Manufacture of brandy. **Process Biochemistry**, London, p. 25-27, 1971.

85. SINGER, D.D. The analysis and composition of potable spirits: Determination of C₃, C₄ and C₅ alcohols in whisky and brandy by direct gas chromatography. **Analyst**, London, v. 91, p. 127-134, 1966a.
86. SINGER, D.D. The proportion of 2-methylbutanol and 3-methylbutanol in some brandies and whiskies as determined by direct gas chromatography. **Analyst**, London, v. 91, p. 790-794, 1966b.
87. SMEDT, P.; LIDDLE, P. Differentiation between runs and other spirits. **Annales de Technologie Agricole**, Paris, v. 24, p. 269-286, 1975.
88. SOLES, R.M.; OUGH, C.S.; KUNKEE, R.E. Ester concentration differences in wine fermented by various species and strains of yeasts. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 33, n. 2, p. 94-98, 1982
89. STONE, H.; SIDEL, J.L. **Sensory evaluation practices**. 2.ed. San Diego: Academic Press Inc., 338 p. 1993. Serie (Food Science and Technology).
90. SUOMALAINEN, H. Yeast and its effect on the flavour of alcoholic beverages. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 77, p. 164-177, 1971.
91. SUOMALAINEN, H.; NYKÄNEN, L. The aroma components produced by yeast in nitrogen-free sugar solution. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 72, p. 469-479, 1966.
92. SUOMALAINEN, H.; NYKANEN, L.; ERIKSSON, K. Composition and consumption of alcoholic beverages- a review. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 25, n. 4, p.179-187, 1974.
93. SUOMALAINEN, H.; LEHTONEN, M. The production of aroma compounds by yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 85, p. 149-156, 1979.

94. TILBURY, R.H. Occurrence and effects of lactic acid bacteria in the sugar industry. In: CARR, J.G.; CUTTING, C.V.; WHITING, G.C. **Lactic acid bacteria in beverages and food**. London: Academic Press Inc., 1975. p.177-191.
95. VARGAS, E.A. **Qualidade da aguardente de cana produzida, engarrafada e/ou comercializada em Minas Gerais**. Belo Horizonte, 1995. 81p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas
96. WATSON, D. C. Factors influencing the congener composition of malt whisky new spirit. In: PIGGOTT, J.R.(Ed.) **Flavour of distilled beverages: Origin and Development**. Florida: Verlag Chemie International, INC., 1983. p. 79-92. (Ellis Horwood series in food science and technology).
97. WEBB, A.D.; INGRAHAM, J. Fusel oil. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v.5, p. 317-353, 1963.
98. WHITING, G.C. Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages – a review. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 82, p. 84-92, 1976.
99. WILLIAMS, A.A. Flavour effects of ethanol in alcoholic beverages. **Flavour Industry**, London, v.3, p. 604-607, 1972.
100. WILLIAMS, A.A.; ROSSER, P.R. Aroma enhancing effects of ethanol. **Chemical Senses**, Oxford, v.6, n.2, p. 149-153, 1981.
101. YOSHIOKA, K.; HASHIMOTO, N. Ester formation by alcohol acetyltransferase from brewers' yeast. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 45, n. 10, p. 2183-2190, 1981.

CARACTERÍSTICAS FERMENTATIVAS DE LEVEDURAS ISOLADAS DE FERMENTAÇÕES EM DESTILARIAS ARTESANAIS DE AGUARDENTE DE CANA

Evelyn Souza Oliveira¹, Carlos A. Rosa², Marcelo Antonio Morgano³ e Gil Eduardo Serra⁴

¹Departamento de Alimentos/Faculdade de Farmácia, UFMG; ²Departamento de Microbiologia/Instituto de Ciências Biológicas, UFMG; ³Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas; ⁴Departamento de Tecnologia de Alimentos/ Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

RESUMO

Foram avaliadas 30 linhagens de leveduras quanto às suas características fermentativas, visando a produção de aguardente de cana, isoladas em sua maioria em destilarias artesanais de aguardente, sendo 24 *Saccharomyces cerevisiae* e 6 pertencentes aos gêneros *Candida* (3), *Kloeckera*, *Pichia* e *Schizosaccharomyces*. As leveduras estudadas apresentaram diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros fermentativos de rendimento da fermentação, conversão de substrato, eficiência de conversão de substrato em etanol, fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{p/s}$), em células ($Y_{x/s}$), em ácidos orgânicos ($Y_{ac/s}$) e em glicerol ($Y_{g/s}$), e velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{max}). De uma maneira geral as linhagens de *S. cerevisiae* apresentaram bom potencial fermentativo, com rendimento entre 83 a 91%, μ_{max} entre 0,450 a 0,640 h⁻¹, e várias delas foram comparáveis à levedura de alto desempenho utilizada na produção industrial de etanol e adotada como referencial. As linhagens não-*Saccharomyces* destacaram-se por apresentar elevada eficiência de conversão de substrato em etanol, comparáveis às linhagens de *S. cerevisiae*; no entanto, o rendimento em etanol destas linhagens foi muito baixo, e foram altos os valores de conversão de substrato em acidez ($Y_{ac/s}$) e de substrato em glicerol ($Y_{g/s}$). Uma exceção foi a linhagem de *Pichia subpelliculosa* que se comportou de maneira similar às linhagens de *S. cerevisiae*. A análise multivariada (Análise de Agrupamento Hierárquico) permitiu a separação das linhagens em

5 grupos, de acordo com sua similaridade. A análise de Componente Principal mostrou que o rendimento da fermentação (ou a conversão de substrato) foi o parâmetro que mais contribuiu para a separação das linhagens nos diferentes grupos. As linhagens *Saccharomyces* resultaram em vinho com concentrações mais elevadas de etanol e consequentemente estas linhagens apresentam maior potencial de dominar o processo fermentativo.

Palavras chave: fermentação alcoólica, aguardente de cana, cachaça, levedura, *Saccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*..

FERMENTATIVE CHARACTERISTICS OF YEASTS ISOLATED FROM SMALL SUGARCANE LIQUOR DISTILLERIES

SUMMARY

Thirty yeast strains were evaluated with respect to their fermentative characteristics, viewing the production of sugarcane liquor or “cachaça”, twenty-four being *Saccharomyces cerevisiae* strains and six belonging to the following genera: *Candida* (3), *Kloeckera*, *Pichia* and *Schizosaccharomyces*. They were isolated from small sugarcane liquor distilleries (27), industrial sugarcane liquor distilleries (2) and one sugarcane alcohol distillery. The yeasts studied presented statistically significant differences for the fermentation parameters of yield, substrate conversion, efficiency of conversion of substrate into ethanol, conversion factors of substrate into ethanol ($Y_{p/s}$), cells ($Y_{x/s}$), organic acids ($Y_{ac/s}$) and glycerol ($Y_{g/s}$), and the maximum specific growth rate (μ_{max}). In general the *S. cerevisiae* strains showed good fermentation potential, with yields between 83 and 91% and μ_{max} between 0.450 and 0.640 h⁻¹, several of them being comparable with the high performance yeast used in the industrial production of ethanol, which was adopted as a reference. The non-*Saccharomyces* strains were distinguished by their high efficiency in converting substrate into ethanol, comparable to that of the *S. cerevisiae* strains, although the yield in ethanol from these species was very low, and the values for $Y_{ac/s}$ and $Y_{g/s}$ were

very high. One exception was the strain *Pichia subpelliculosa* which behaved in a very similar way to that of the *S. cerevisiae* strains. The Hierarchical Cluster Analysis and the Principal Component Analysis showed the separation of the strains into 5 groups, being the fermentation yield (or substrate conversion) the parameter which most contributed to the separation of the strains into different groups. The *Saccharomyces* strains fermented better, the wine reached higher ethanol concentrations, consequently this strains have an higher ethanol tolerance and an higher potential for dominating the fermentative process.

Key Words: alcoholic fermentation, sugarcane liquor, cachaça, yeasts, *Saccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*.

1. INTRODUÇÃO

A aguardente de cana, caninha ou cachaça é uma bebida típica brasileira, e vem conquistando uma parcela crescente do mercado internacional de bebidas destiladas por seu sabor e aroma especiais. A produção brasileira de aguardente de cana é estimada em 1,3 bilhão de litros por ano. A produção artesanal de aguardente de cana é realizada por produtores rurais, com pequena capacidade (10.000 a 200.000 litros por safra), sendo a destilação conduzida em alambiques intermitentes, de cobre, e o produto é bastante diferenciado daquele obtido em maior escala de produção com o uso de colunas de destilação em aço inoxidável. O Estado de Minas Gerais vem se destacando na produção de aguardente artesanal, liderando na sua divulgação e agregando um conceito de qualidade típica para essa bebida, permitindo aos produtores sair da economia informal. O preço de algumas marcas atinge até sessenta vezes aquele de aguardentes comercializadas sem a conotação de qualidade artesanal. Naquele Estado existem mais de 8.000 destilarias artesanais que produzem cerca de 130 milhões de litros/ano, funcionando no período de maio a dezembro.

A fermentação artesanal de aguardente de cana caracteriza-se por ser conduzida por uma microbiota mista de leveduras, com predominância de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Leveduras apiculadas (principalmente *Kloeckera japonica*) e espécies de *Candida*, *Kluyveromyces* e *Pichia* são também freqüentemente isoladas (Morais et al., 1997; Pataro et al., 2000). As leveduras presentes nessas fermentações estão em constante sucessão, devido à introdução de microrganismos que acompanham o caldo de cana, e também devido às condições de processo (Pataro et al., 1998).

Com o progresso da tecnologia de fermentação alcoólica e da taxonomia de leveduras, foi possível verificar também que a linhagem predominante é a que possui características mais propícias de adaptação às diferentes condições de processo tais como teor de açúcar do mosto/teor de etanol no vinho, acidez do vinho, operação de clarificação do caldo, temperatura do mosto, "armadilhas" nos equipamentos e no modo de condução da fermentação etc. Quando se alteram condições de processamento, certamente dá-se condições para o estabelecimento de um novo equilíbrio entre as linhagens de leveduras, com o surgimento de outra linhagem dominante. A simples inoculação de uma linhagem selecionada, ou de uma linhagem dominante isolada de uma determinada destilaria não é capaz de garantir a sua permanência e/ou melhorar a eficiência de outras destilarias (Basso, 1993; Andrietta et al., 1997). A alteração e a adequação de procedimentos tecnológicos de processo, certamente é um passo preliminar importante para alterar a microbiota e a(s) levedura(s) com condições de dominância no processo. É importante observar que não ocorrem leveduras dominantes *per si*, mas leveduras dominantes em determinadas condições ou processos. A seleção de uma microbiota mais eficiente e de maior rendimento, sem perder de vista a qualidade da bebida, deve ser buscada com adoção de processo adequado e que opere em condições as mais estáveis possíveis. A comunidade de leveduras presente numa fermentação de aguardente artesanal apresenta diversas espécies e linhagens, mostrando a ocorrência de leveduras com amplas diferenças em seus parâmetros fermentativos e na produção de compostos secundários. O que realmente interessa do ponto de vista empresarial é a ocorrência de uma flora microbiana em geral, e de leveduras em particular, que conduza a um elevado rendimento fermentativo e melhor qualidade da

bebida, em termos comparativos com os resultados de destilarias reconhecidamente eficientes, não importando se a(s) linhagem(s) presente(s) são as mesmas ou não.

Dentre os parâmetros fermentativos, o rendimento em etanol, a produtividade e a velocidade específica máxima de crescimento celular, são considerados essenciais para o bom desempenho de um processo fermentativo. No Brasil, estes e outros parâmetros são freqüentemente utilizados na caracterização de leveduras utilizadas na produção de álcool industrial (Oliveira, 1988; Andrietta et al., 1995; Andrietta et al., 1999). Entretanto, na produção de aguardente essas informações ainda são bastante escassas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento fermentativo de leveduras isoladas de fermentações de aguardente artesanal, oriundas de destilarias de qualidade reconhecida, do Estado de Minas Gerais. O conhecimento dos parâmetros fermentativos dessas leveduras, bem como de sua variação nas linhagens estudadas, serão também oportunamente avaliados com relação às fermentações artesanais e à seleção de linhagens presentes.

A aplicação de métodos estatísticos multivariados teve por finalidade verificar se as leveduras isoladas estavam distribuídas em agrupamentos diferenciados, e quais os parâmetros mais importantes para sua diferenciação. Foi também objetivo detectar a variabilidade dos parâmetros fermentativos em condições padronizadas de cultivo e sua distribuição dentro do conjunto de leveduras estudadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 30 linhagens de leveduras, sendo 24 *Saccharomyces cerevisiae* e 6 pertencentes a outros gêneros (Tabela 1).

TABELA 1- Origem, ano de coleta e identificação das linhagens isoladas

Destilarias	Safras			
	1996		1997	
Brumado Velho (MG)	Sc1	UFMG-A957	Sc3	UFMG-A1605
	Sc2	UFMG-A968	Sc4	UFMG-A1667
			Sc5	UFMG-A1656
			Sc6	UFMG-A1676
			Sc7	UFMG-A1683
			Ps	UFMG-A960
			Ca	UFMG-A972
Germana (MG)	Sc8	UFMG-A905	Sc13	UFMG-A1492
	Sc9	UFMG-A1119	Sc14	UFMG-A1497
	Sc10	UFMG-A1127	Sc15	UFMG-A1607
	Sc11	UFMG-A1278	Sc16	UFMG-A1626
	Sc12	UFMG-A1265	Sc17	UFMG-A1632
			Sc18	UFMG-A1641
			Cg	UFMG-A882
			Kj	UFMG-A893
			Cg	UFMG-A1029
			Sp	UFMG-A1113
Vale Verde (MG)			Sc19	UNICAMP-V1
			Sc20	UNICAMP-V2
			Sc21	UNICAMP-V3
Rosa (SP)			Sc22	UNICAMP-R1
			Sc23	UNICAMP-R2
Clealco (SP)			Sc24	UNICAMP-CL14/97

Estas linhagens foram isoladas de três destilarias de produtores artesanais de aguardente de cana no Estado de Minas Gerais, com exceção das linhagens Sc22/23 que provêm de destilaria de aguardente industrial e Sc24 de destilaria de álcool, ambas situadas no Estado de São Paulo. Esta última foi considerada como "referência" por apresentar

características desejáveis para a fermentação alcoólica (Andrietta et al., 1997). Todas as linhagens foram identificadas por metodologia padrão através de testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos (Kurtzman & Fell, 1998).

As linhagens codificadas como Sc são linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, Ca - *Candida apicola-like*, Cf-*Candida famata*, Cg-*Candida guilliermondii*, Kj-*Kloeckera javanica*, Ps-*Pichia subpelliculosa* e Sp-*Schizosaccharomyces pombe*. As linhagens foram isoladas de amostras coletadas em diversas épocas nas destilarias. As linhagens de *S. cerevisiae* apresentavam concentrações na faixa de 10^7 a 10^9 células viáveis por mL de mosto, enquanto as de outros gêneros se situavam entre 10^5 a 10^6 .

Os ensaios para a determinação dos parâmetros de fermentação foram conduzidos em triplicata, em frascos de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo estéril (glicose 150 g/L; fosfato diácido de potássio 5,0 g/L; cloreto de amônio 5,0 g/L; sulfato de magnésio heptahidratado 1,0 g/L; cloreto de potássio 1,0 g/L; extrato de levedura 6,0 g/L, pH 6,0). O fechamento dos frascos foi feito com rolha de borracha com orifício central, onde foi introduzido um tubo de vidro em “L” (com filtro de algodão), para a saída de CO₂.

O inóculo foi preparado por ressuspensão, em água destilada, das leveduras mantidas em “slants”, em meio GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1%, NaH₂PO₄ 0,2% e agar 2%), por 24 h a 32°C. Os frascos foram inoculados com um volume equivalente a 10% do meio a ser fermentado, e incubados em “shaker” à temperatura de $32 \pm 1^\circ\text{C}$, a 150 rpm durante 24 horas.

Decorrido o tempo de incubação foi centrifugada uma amostra de cada frasco. No sobrenadante foram determinados o teor de glicose, glicerol e acidez total (expressa em ácido acético). Para a determinação do etanol, as amostras dos meios fermentados foram previamente destiladas por arraste de vapor, em microdestilador. Foram determinadas também as concentrações de glicose inicial, a massa seca celular no inóculo, e da massa seca celular no vinho. Os ensaios para a determinação da velocidade específica máxima de

crescimento celular (μ_{\max}) foram realizados em frascos agitados em meio de cultivo estéril, contendo 40 g/L de glicose. O crescimento celular foi acompanhado pela leitura da absorbância a 600 nm, e o μ_{\max} foi determinado pelo cálculo do coeficiente angular da reta correspondente à fase exponencial de crescimento celular (Pirt, 1985). Os seguintes parâmetros foram determinados submetendo-se os frascos em fermentação a um balanço de massa: rendimento da fermentação; conversão de substrato; eficiência; fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{p/s}$), em células ($Y_{x/s}$), em ácido acético ($Y_{ac/s}$), e em glicerol ($Y_{g/s}$); a velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{\max}).

A concentração de etanol foi determinada espectrofotometricamente pelo método do dicromato de potássio modificado (Salik & Povoh, 1993), a glicose pelo método da glicose oxidase-peroxidase (Henry et al., 1974), o glicerol utilizando-se o Kit de Triglicerídeos Labtest (Fossati & Prencipe, 1982; MacGowan et al., 1983), a acidez total por titulometria, e a massa celular por secagem em estufa a 55°C até peso constante.

O tratamento estatístico dos parâmetros cinéticos foi feito por análise dos componentes principais – ACP e análise por agrupamento hierárquico – AAH, com o programa computacional PIROUETTE, 1997. Foi realizada também análise de variância (ANOVA) e aplicado o teste de Tukey para comparação das médias dos parâmetros fermentativos (Programa Estatístico SAS).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O dendrograma da Figura 1 mostra a similaridade entre as linhagens de levedura, segundo os parâmetros fermentativos: rendimento da fermentação, conversão de substrato, eficiência, $Y_{x/s}$ e μ_{max} (Tabela 2) A escala (0 a 1) representa o índice de similaridade.

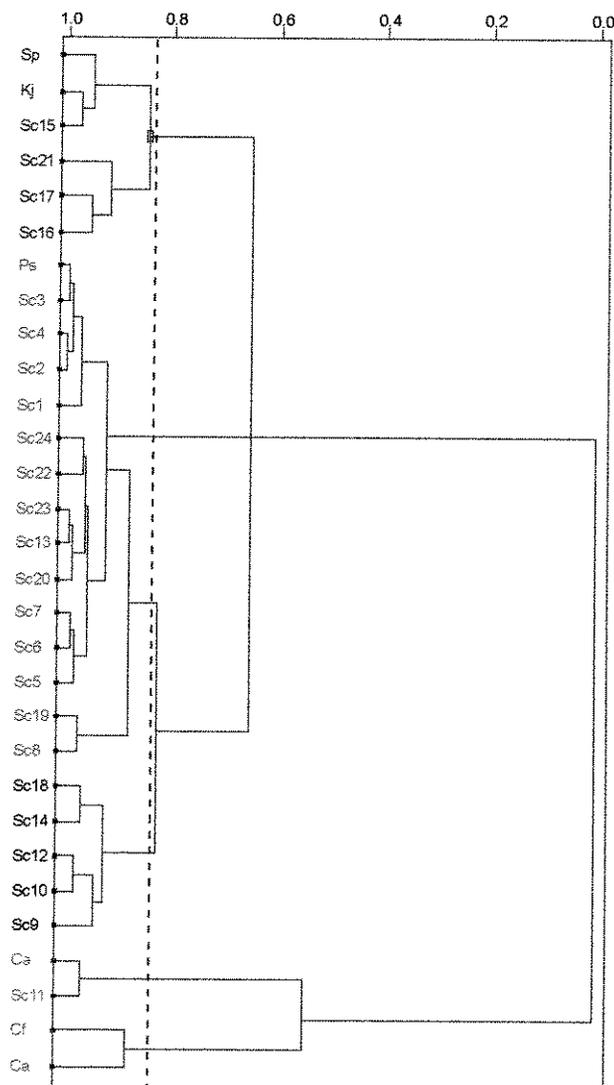


FIGURA 1. Dendrograma elaborado a partir dos parâmetros fermentativos das 30 linhagens de leveduras estudadas.

As leveduras distribuíram-se em cinco grupos com similaridade de 0,83. Os grupos 2 e 3 contêm a maior parte das linhagens de *S. cerevisiae* (63,3%) e a de *P. subpelliculosa*. O grupo 1 se constitui de linhagens de *S. cerevisiae*, juntamente com a linhagem de *Schizosaccharomyces pombe* e a de *Kloeckera javanica*. Os grupos 4 e 5 englobam as linhagens de *Candida*, com exceção de uma *Saccharomyces* (Sc11) e não apresentam similaridade com os demais grupos, indicando que estas leveduras são bastante diferentes dos outros grupos com relação aos parâmetros analisados. A análise estatística realizada com a inclusão dos fatores Yac/s e Yg/s, não resultou em alteração no resultado.

A maioria das linhagens de *S.cerevisiae* avaliadas foi proveniente das destilarias Brumado Velho (7 linhagens) e Germana (11linhagens). As linhagens isoladas da destilaria Brumado Velho apresentaram menor variabilidade nos valores dos parâmetros fermentativos e todas foram pertencentes ao grupo 2, assim como as linhagens Sc22 e 23, provenientes de aguardente industrial (não artesanal). Essas linhagens possuem características similares à da linhagem de referência (Sc24), que é uma linhagem utilizada na produção industrial de álcool por possuir boas características fermentativas. Esses resultados mostram que nessa destilaria ocorreu a seleção de linhagens de maior rendimento, possivelmente em decorrência da condução do processo em condições operacionais estáveis.

As linhagens da destilaria Germana foram distribuídas nos 5 grupos, apresentando, portanto, grande variabilidade nas características fermentativas, desde linhagens com rendimento muito alto (Sc8) até com rendimento muito baixo (Sc11).De forma semelhante Andrietta et al. (1999) observaram que as leveduras isoladas de duas destilarias de álcool apresentaram comportamento completamente diferente; em uma das usinas as leveduras apresentaram comportamento bastante homogêneo quanto aos parâmetros fermentativos enquanto, na outra, as leveduras apresentaram grande variabilidade. Esse resultado também indica que condições de processo influem na seleção das linhagens de leveduras, e que condições não estáveis de processo conduzem a uma população de leveduras mais heterogênea nas suas características fermentativas, com a produção de uma cachaça menos padronizada ao longo da safra e rendimentos oscilantes.

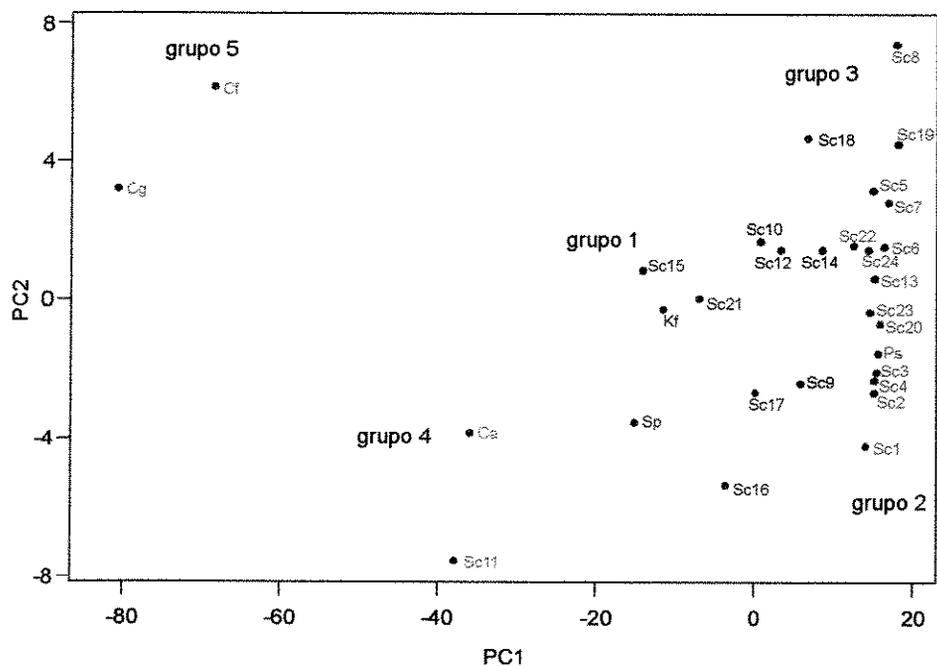


FIGURA 2. Gráfico de *scores* (CP1 versus CP2) para as leveduras estudadas.

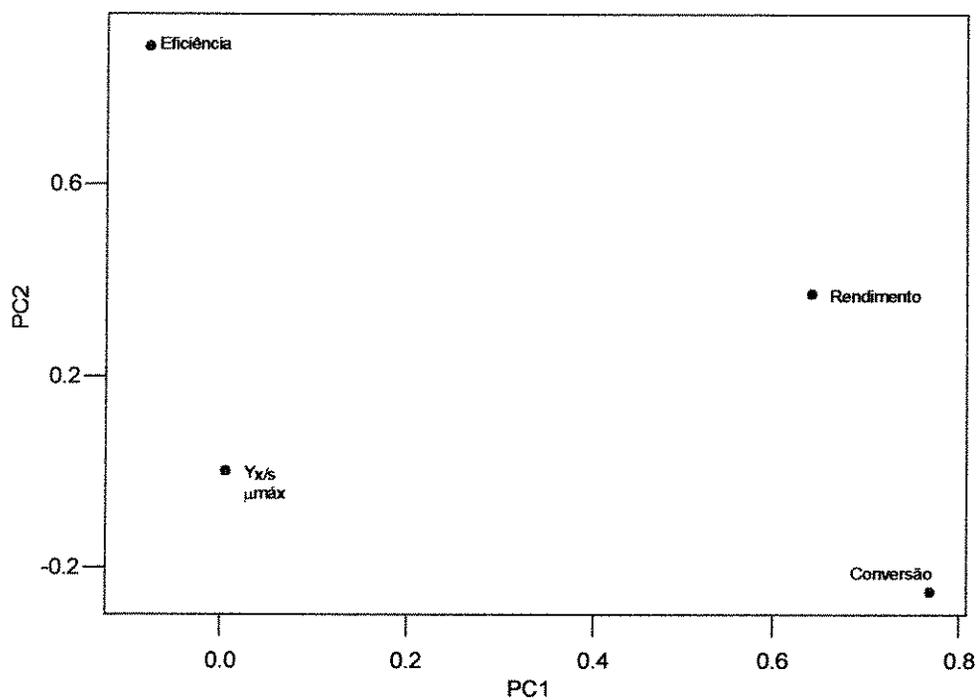


FIGURA 3. Gráfico de *loadings* (CP1 versus CP2) para as variáveis utilizadas.

A separação entre as linhagens de leveduras foi descrita na primeira Componente Principal, como pode ser visualizado na Figura 2 (CP1 versus CP2), a qual descreveu 98% da variância total dos dados. Quando as Figuras 2 e 3 são comparadas entre si, a separação entre as linhagens é quase totalmente atribuída ao rendimento (ou à conversão de substrato, uma vez que as mesmas são variáveis dependentes, como mostra o coeficiente de correlação $r=+0,99$, $p\leq 0,001$). Analisando conjuntamente os *scores* e os *loadings* para as duas primeiras CP, nas Figuras 2 e 3, respectivamente, pode ser visto que as linhagens dos grupos 2 e 3 apresentam *score* positivo na CP1, enquanto os demais grupos têm *score* negativo. Os grupos 2 e 3 têm *score* positivo por apresentar valores considerados como de níveis Médio, Alto e Muito Alto para rendimento (Tabela 3), significando agrupamentos onde o rendimento é um atributo maximizado; os demais grupos apresentam valores de rendimentos classificados como Baixo e Muito Baixo.

A Análise de Componentes Principais (ACP) mostrou que o rendimento (ou a conversão) foi o parâmetro que determinou a separação das leveduras nos cinco agrupamentos (Figura 1). A segunda componente principal (CP2) descreveu apenas cerca de 2% da variância dos dados, e a eficiência da fermentação foi o parâmetro mais significativo, e o responsável pela separação das linhagens que constituem o grupo 5.

Os resultados das médias dos parâmetros fermentativos apresentados na Tabela 2, foram classificados em níveis variáveis de Baixo a Muito Alto (Tabela 3) sendo as linhagens de levedura agrupadas nos mesmos. Esses níveis foram definidos considerando-se a amplitude, a análise estatística dos resultados (Teste F e teste Tukey de comparação de médias), e adaptando-se a classificação proposta por Andrietta et al. (1999) que agrupa as leveduras utilizadas na produção industrial de álcool segundo os parâmetros fermentativos em níveis "Baixo" e "Alto" de acordo com as seguintes faixas: conversão de substrato, $<90,0$ e $>98,5$; fator de conversão de substrato em etanol (Y_p/s), $<0,42$ e $>0,45$; fator de conversão de substrato em células (Y_x/s), $<0,041$ e $>0,044$; velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), $<0,45$ e $>0,55$.

Consultando as Tabelas 2 e 3 observa-se que em relação ao rendimento a maioria das linhagens (63%) situou-se na faixa de 70,1 a 87,0% (nível Baixo a Médio), e somente 13% apresentou rendimento entre 87,1 a 91,0% (nível Alto a Muito Alto). As linhagens Sc8 e Sc19 foram as que apresentaram maiores rendimentos (90,5 e 89,3%, respectivamente), superando inclusive a linhagem de referência Sc24 (88,4%). As leveduras não pertencentes à espécie *S. cerevisiae* apresentaram rendimentos mais baixos (24,0 a 70,0%) juntamente com as linhagens Sc11 e Sc15. Uma exceção foi a da linhagem *P. subpelliculosa* que apresentou nível de rendimento Médio (84,5%).

O rendimento da fermentação é uma importante característica de economia da produção, e no caso da aguardente pode afetar diretamente a sua qualidade. Vinhos com teores alcoólicos padronizados, oriundos de mostos e condições de fermentação também padronizadas, certamente originam destilados igualmente mais padronizados. Na fabricação de aguardente de cana é importante que o produtor conheça o desempenho de seu processo ao longo da safra. Estas avaliações de desempenho da destilaria são importantes para o planejamento e controle das operações e para a composição do custo de produção (Chaves & Póvoa, 1992).

Observa-se também (Tabelas 2 e 3) que a linhagem de *Candida famata* (Cf) e de *Candida guilliermondii* (Cg) apresentaram os valores de rendimento mais baixos (33,5 e 24,3%), porém os mais altos de eficiência (99,2 e 97,7%, respectivamente). Isto indica que estas leveduras consomem muito pouco do substrato disponível, mas apresentam alta eficiência de conversão do substrato consumido em etanol.

TABELA 2 – Média dos parâmetros fermentativos obtidos para as leveduras isoladas

Linhagens	Parâmetros Fermentativos							
	Rend (%)	Conv (%)	Efic (%)	Yp/s (g/g)	Y x/s (g/g)	Yac/s (g/g)	Y g/s (g/g)	μ_{max} (h ⁻¹)
Sc8	90,5	98,8	91,8	0,469	0,044	0,0092	0,037	0,570
Sc19	89,3	100,0	89,3	0,456	0,056	0,0098	0,043	0,610
Sc24	88,4	100,0	88,4	0,452	0,046	0,0116	0,035	0,607
Sc7	87,7	99,7	88,0	0,450	0,052	0,0089	0,036	0,597
Sc6	86,7	99,7	87,0	0,445	0,049	0,0095	0,035	0,622
Sc5	86,6	98,1	88,3	0,451	0,041	0,0110	0,038	0,622
Sc13	85,4	98,9	86,3	0,441	0,047	0,0133	0,045	0,546
Sc20	85,3	100,0	85,2	0,435	0,051	0,0114	0,042	0,559
Ps	84,5	100,0	84,5	0,432	0,052	0,0131	0,038	0,661
Sc23	84,5	98,8	85,6	0,437	0,053	0,0086	0,029	0,609
Sc22	84,4	96,7	87,3	0,446	0,046	0,0082	0,032	0,530
Sc3	84,1	100,0	84,1	0,430	0,048	0,0171	0,034	0,554
Sc4	83,9	100,0	83,9	0,429	0,049	0,0113	0,034	0,592
Sc2	83,7	100,0	83,7	0,428	0,054	0,0127	0,036	0,615
Sc1	82,4	100,0	82,4	0,421	0,046	0,0114	0,040	0,544
Sc18	82,2	91,1	90,3	0,461	0,052	0,0100	0,041	0,454
Sc14	81,9	93,7	87,4	0,447	0,043	0,0103	0,041	0,556
Sc12	78,6	89,4	88,0	0,450	0,048	0,0116	0,043	0,641
Sc9	78,1	92,5	84,5	0,432	0,043	0,0120	0,040	0,485
Sc10	77,1	87,4	88,2	0,451	0,042	0,0094	0,047	0,538
Sc17	74,5	88,0	84,7	0,432	0,049	0,0106	0,047	0,455
Sc21	71,2	81,3	87,6	0,448	0,070	0,0121	0,045	0,533
Sc16	71,0	85,9	82,6	0,422	0,050	0,0110	0,049	0,460
Kj	68,3	77,9	87,6	0,448	0,062	0,0143	0,068	0,505
Sc15	67,4	76,0	88,7	0,453	0,057	0,0108	0,058	0,455
Sp	64,7	76,1	85,0	0,435	0,040	0,0212	0,083	0,382
Ca	51,6	59,8	86,4	0,442	0,072	0,0176	0,084	0,554
Sc11	48,9	58,8	83,2	0,425	0,039	0,0099	0,061	0,471
Cf	33,5	33,9	99,2	0,507	0,045	0,0232	0,092	0,585
Cg	24,3	25,0	97,7	0,499	0,066	0,0148	0,117	0,414
TesteF(5%)	*	*	*	*	*	*	*	*
CV(%)	3,83	2,75	3,67	3,68	8,15	9,91	9,27	3,60
DMS	9,26	7,68	10,2	0,053	0,013	0,004	0,015	0,081

Rend-Rendimento; Conv- Conversão; Efic-Eficiência; Sc24-levedura de referência;
CV-Coefficiente de variação; DMS-Diferença Mínima Significativa (5%)

TABELA 3 – Faixas de variação dos níveis Muito Alto, Alto, Médio, Baixo e Muito Baixo, dos parâmetros fermentativos das leveduras estudadas.

Parâmetros	Níveis				
	Muito Baixo	Baixo	Médio	Alto	Muito Alto
Rendimento (%)	24,0-70,0 Sc11,15,Ca, Cf,Cg,Kj,Sp (7)	70,1-83,0 Sc1,9,10,12,14, 16,17,18,21 (9)	83,1-87,0 Sc 2,3,4,5,6,13, 20,22,23,Ps (10)	87,1-89,0 Sc 7,24 (2)	89,1-91,0 Sc 8,19 (2)
Conversão (%)	25,0-60,0 Sc11, Ca, Cf,Cg (4)	60,1-90,0 Sc10,12,15, 16,17,21,Kj, Sp (8)	90,0-97,0 Sc 9,14,18,22 (4)	97,1-99,0 Sc 5,8,13,23 (4)	99,1-100,0 Sc1,2,3,4,6,7, 19,20,24, Ps (10)
Eficiência (%)			82,0-88,0 Sc1,2,3,4,6,7,9,11,12, 13,14,16,17,20,21,22, 23,Ca, Kj, Ps, Sp (21)	88,1-95,0 Sc 5,8,10, 15,18,19,24 (7)	95,1-99,5 Cf, Cg (2)
Y p/s (g/g)			0,420-0,450 Sc1,2,3,4,6,7,9,11,12, 13,14,16,17,20,21,22, 23,Ca,Kj ,Ps,Sp (21)	0,451-0,490 Sc5,8,10,15,18, 19,24 (7)	0,491-0,510 Cf, Cg (2)
Y x/s (g/g)		0,039-0,040 Sc11,Sp (2)	0,041-0,043 Sc5,9,10,14 (4)	0,044-0,060 Sc1,2,3,4,6,7,8, 12,13,15,16,17, 18, 19,20,22,23, 24,Cf, Ps (20)	0,061-0,072 Sc21,Ca,Cg, Kj (4)
Y ac/s (g/g)			0,0080-0,0130 Sc1,2,4,5,6,7,8,9,10, 11,12,14,15,16,17,18, 19,20,21,22,23,24 (22)	0,0131-0,0200 Sc3,13,Ca,Cg, Kj,Ps (6)	0,0201-0,0240 Cf, Sp (2)
Y g/s (g/g)		0,029-0,040 Sc1,2,3,4,5,6,7, 8,9,22,23,24,Ps (13)	0,041-0,050 Sc10,12,13,14,16,17, 18,19,20,21 (10)	0,051-0,080 Sc11,15,Kj (3)	0,081-0,0120 Ca,Cf,Cg,Sp (4)
μ max (h⁻¹)		0,380-0,450 Cg, Sp (2)	0,451-0,550 Sc1,9,10,11,13,15,16, 17,18,21,22, Kj (12)	0,551-0,600 Sc3,4,7,8,14,20, Ca,Cf (8)	0,601-0,670 Sc2,5,6,12,19, 23, 24,Ps (8)

Nota: Valores entre parênteses correspondem ao número de linhagens em cada nível

A Tabela 3 mostra também que o fator de conversão de substrato em etanol - $Y_{p/s}$ (g etanol/g glicose consumida), ou eficiência (%) da levedura, para a maioria das linhagens (70%) encontra-se no nível Médio. A quase totalidade das linhagens de *S. cerevisiae* (91,7%) também apresentou nível Médio de $Y_{ac/s}$, enquanto as pertencentes a outros gêneros se situaram nos níveis de Alto a Muito Alto. Com relação ao $Y_{g/s}$ pode-se observar que 91,7% das linhagens de *S. cerevisiae* apresentaram níveis de Baixo a Médio, enquanto as linhagens de outros gêneros apresentaram níveis de Alto a Muito Alto, com exceção da *P. subpelliculosa* que apresentou um valor baixo de $Y_{g/s}$.

Para as linhagens estudadas foi observada correlação negativa entre o rendimento da fermentação e os fatores $Y_{g/s}$ e $Y_{ac/s}$, com coeficientes de correlação de $r=-0,93$ ($p\leq 0,001$) e $r=-0,59$ ($p\leq 0,001$), respectivamente, significando uma redução no rendimento sempre que uma maior quantidade de açúcar é desviado para a produção de glicerol e ácidos orgânicos. Por outro lado, as linhagens *Saccharomyces* mostraram menor formação de glicerol e ácidos orgânicos, como visto anteriormente. Foi também verificada haver correlação positiva entre os parâmetros $Y_{g/s}$ e $Y_{ac/s}$, com $r=+0,67$ ($p\leq 0,001$), indicando que ambos os produtos são sintetizados proporcionalmente pelas leveduras durante a fermentação.

Observa-se também que 40% das linhagens apresentaram valores de μ_{max} na faixa de nível Médio, e 53,3% entre o nível Alto a Muito Alto; as linhagens de *C. guilliermondii* e *S. pombe* apresentaram os valores mais baixos de μ_{max} (0,414 e 0,382 h^{-1} , respectivamente). Subden (1990) também se refere à *S. pombe* como uma levedura de baixa velocidade de crescimento. A correlação positiva entre o rendimento e μ_{max} , para as leveduras estudadas, com $r=+0,50$ ($p\leq 0,01$), mostra que a seleção de linhagens que apresentam rendimentos mais altos também seleciona aquelas de maior velocidade específica máxima de crescimento e, portanto, com maior potencial de dominar a fermentação.

Os resultados de velocidade específica máxima de crescimento mostram que a quase totalidade das leveduras isoladas possui μ_{max} acima do nível Médio, indicando a

importância deste parâmetro nas linhagens dominantes ou de maior frequência na fermentação. O μ_{\max} fornece um indicativo da capacidade que uma dada linhagem possui de dominar o processo. Quanto maior for seu valor maior será a possibilidade desta linhagem permanecer no processo ao longo da safra. Isto não ocorrerá se alguma condição operacional ou da instalação, como: floculação, tamanho, ou menor resistência a condições adversas não favorecer a sua permanência

A elevada correlação entre rendimento da fermentação e o teor de etanol no vinho, para as leveduras estudadas, com $r=+0,99$ ($p \leq 0,001$), mostra o caminho para a seleção de leveduras com maiores rendimentos e fermentações mais rápidas, ou seja, a manutenção de teor elevado de etanol no vinho assegura a seleção das linhagens mais produtivas. Por sua vez, este maior teor alcoólico do vinho é obtido pelo preparo de mostos com concentrações mais altas de açúcar. A utilização de mosto contendo teor mais alto em açúcar redundará em vinho mais rico em álcool, o que requer sempre um período para adaptação e crescimento das linhagens nessas condições, que apresentarão maior tolerância ao açúcar e etanol do meio, e acabarão por dominar a fermentação.

A linhagem de *Pichia subpelliculosa* (Ps) mostrou características fermentativas similares às de *Saccharomyces cerevisiae*, destacando-se sua maior conversão em ácidos orgânicos (Yac/s) e elevada velocidade específica de crescimento ($0,661 \text{ h}^{-1}$). O potencial de dominância do processo fermentativo por essa linhagem pode ser amparado em resultado relatado por Pataro et al. (2000) que observou a presença de *P. anomala* em concentrações da ordem de 4×10^9 células/mL em fermentação artesanal de cachaça.

Leveduras do gênero *Kloeckera* são pouco tolerantes ao etanol e o início da inibição ocorre com cerca de 4% de etanol no vinho (Subden, 1990). A linhagem estudada de *K. javanica* produziu pouco etanol, mostrando também baixa conversão de açúcar.

4. CONCLUSÕES

As linhagens de *S. cerevisiae* e de outras espécies, isoladas de fermentações artesanais de aguardente de cana, exibiram parâmetros fermentativos bastante diferenciados. Os métodos estatísticos mostraram que o rendimento da fermentação (ou a conversão de substrato) foi o parâmetro mais importante na diferenciação entre as linhagens.

O rendimento da fermentação, o teor de etanol no vinho e a velocidade específica máxima de crescimento celular foram identificados experimentalmente, como parâmetros importantes para a seleção de linhagens que possam dominar a fermentação, agregando maior rendimento.

Várias linhagens isoladas de *S. cerevisiae* apresentam valores dos parâmetros fermentativos similares aos de linhagens de fermentação industrial de produção de álcool. As linhagens de leveduras não-*Saccharomyces* apresentam parâmetros que mostram baixo potencial para produção de etanol e de competição com as *Saccharomyces* (com exceção da *Pichia subpelliculosa*), além de uma produção mais elevada de ácidos orgânicos. A baixa população e pequena atividade fermentativa dessas leveduras, em fermentação alcoólica onde competem com linhagens *Saccharomyces*, minimizam sua importância mesmo na hipótese de apresentarem melhor desempenho em meio de caldo de cana.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.S.; RODRIGUES, M.I. Método de caracterização de leveduras de processo utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. **STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 13, n. 4, p. 22-25, 1995.

2. ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.S.; SERRA, G.E. Leveduras não fermentativas – Processo de instalação e forma de detecção e eliminação **STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 15, n. 6, p. 32-35, 1997.
3. ANDRIETTA, S.R.; MIGLIARI, P.C.; ANDRIETTA, M.G.S. Classificação das cepas de levedura de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa. **STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, V. 17, n. 5, p. 54-59, 1999.
4. BASSO, L.C.; OLIVEIRA, A.J.; ORELLI, V.F.S.M.; CAMPOS, A.A.; GALLO, C.R.; AMORIN, H.V. Dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliadas pela técnica de cariotipagem. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 5., 1993, Águas de São Pedro. **Anais**. Piracicaba: STAB,1993. p. 245-250.
5. CHAVES, J.B.; PÓVOA, M. E. B. A qualidade da aguardente da cana de açúcar. In: MUTTON, M. J. R., MUTTON, M. A. **Aguardente de cana; produção e qualidade**. Jaboticabal: Funep, 1992. p. 93-132.
6. FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clinical Chemistry**, v.28, n.10, p. 2077-2080, 1982
7. HENRY, R.J.; CANNON, D.C.; WINKELMAN, J. **Clinical Chemistry Principles and Techniques**, 2a ed. New York: Harper and Row Publishers Inc. 1974, p. 128
8. KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The Yeast: a Taxonomic Study**, Amsterdam: Elsevier Science Publisher. 1998, p. 1055

9. MCGOWAN, M.W.; ARTISS, J.D.; STRANDBERGH, D.R.; ZAK, B. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. **Clinical Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 538-542, 1983.
10. MORAIS, P.B.; ROSA, C.A.; LINARDI, V.R.; PATARO, C.; MAIA, A.B.R.A. Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of brazilian sugar-cane aguardente. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v, 13, p. 241-243, 1997.
11. OLIVEIRA, E.S. **Efeito da adição de suplementos nutricionais na fermentação alcoólica de melão de cana-de-açúcar em diferentes temperaturas.** Viçosa, 1988, 63p. Dissertação ("Magister Scientiae") – Universidade Federal de Viçosa.
12. PATARO, C.; SANTOS, A.; CORREA, S.R.; MORAIS, P.B.; LINARDI, V.R.; ROSA, C.A. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in an aguardente distillery. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, n. 29, p. 69-73, 1998.
13. PATARO, C.; GUERRA, J.B.; PETRILLO-PEIXOTO, M.L.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; LINARDI, V.R.; ROSA, C.A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 24-31, 2000.
14. PIROUETTE, Multivariate Data Analysis for IBM PS Systems, version 2.1, 1977. Infometrix, Seattle, WA, USA.
15. PIRT, S.J. **Principles of microbe and cell cultivation.** Oxford: Blackwell, 1985, 274p.

16. SALIK, F.L.M.; POVOH, N.P. Método espectrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 5., Águas de São Pedro. **Anais**. Piracicaba: STAB, 1993, p. 262-266.
17. SAS Institute. **SAS User's Guide: statistics**. Cary, USA, 1993.
18. SUBDEN, R.E. Wine yeast: selection and modification. In: Panchal, C.J. **Yeast strain selection**. 1a ed. New York: Marcel Dekker, 1990. Cap. 5, p. 113-137.

AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS EM DESTILARIAS ARTESANAIS DE AGUARDENTE DE CANA EM FUNÇÃO DA FORMAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

Evelyn Souza OLIVEIRA¹, Carlos A. ROSA², Marcelo Antonio MORGANO³ e Gil Eduardo SERRA⁴

¹Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, UFMG; ²Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG; ³Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada, ITAL; ⁴Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

RESUMO

Linhagens de leveduras isoladas em destilarias artesanais de aguardente de cana, pertencentes à espécie *Saccharomyces cerevisiae* (24 linhagens) e a outros gêneros (6), foram avaliadas quanto à capacidade de formação dos principais compostos voláteis, a saber: acetaldeído, acetato de etila, propanol, isobutanol, álcool isoamílico, ácido acético e glicerol, utilizando-se um meio sintético. As linhagens *Saccharomyces* mostraram uma variação limitada em torno de 50% da taxa média de produção de cada composto. A Análise de Agrupamento Hierárquico e de Componentes Principais mostrou a separação das linhagens em diversos grupos, sendo a capacidade de produção de ácido acético a variável de maior impacto na diferenciação das linhagens. As linhagens *Saccharomyces* fermentaram melhor, fornecendo vinhos com maior teor alcoólico, sendo, portanto mais tolerantes ao etanol, o que lhes confere maior potencial de dominar o processo fermentativo. Deste modo, leveduras não-*Saccharomyces* apresentando um perfil qualitativo e quantitativo de compostos voláteis, considerado semelhante ao das *Saccharomyces*, para efeitos práticos na qualidade da aguardente, pode-se dizer que as não-*Saccharomyces*, em vista de sua pouca tolerância ao etanol, e conseqüentemente pequena população além de reduzida atividade fermentativa em vinhos a partir de um determinado teor em etanol, devem provocar pouca alteração no perfil de compostos voláteis do vinho e da aguardente final.

Palavras-chave: fermentação alcoólica, aguardente de cana, cachaça, voláteis, leveduras, *Sacharomyces*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*.

THE PRODUCTION OF VOLATILE COMPOUNDS OF YEASTS ISOLATED FROM SMALL SUGARCANE LIQUOR DISTILLERIES

SUMMARY

Thirty yeast strains were evaluated with respect to their fermentative characteristics, viewing the production of sugarcane liquor or *cachaça*, twenty-four being *Saccharomyces cerevisiae* strains and six belonging to the following genera: *Candida* (3), *Kloeckera*, *Pichia* and *Schizosaccharomyces*. They were isolated from small sugarcane liquor distilleries (27), industrial sugarcane liquor distilleries (2) and one sugarcane alcohol distillery. They were evaluated with respect to the main volatile compounds produced in a synthetic media. These compounds are acetaldehyde, ethyl acetate, propanol, isobutanol, iso-amyl alcohol, acetic acid and glycerol. The *Saccharomyces* strains showed a limited variation of the rate of production of each volatile compound, ranging near 50% of the average rate. The Hierarchical Cluster Analysis (HCA) and the Principal Component Analysis (PCA) showed the separation of the strains into several groups, being the rate of acetic acid production that one of greater impact to differentiate the strains. The *Saccharomyces* strains fermented better, the wine reached higher ethanol concentrations, due to the strains higher ethanol tolerance, and so with a higher potential for dominating the fermentative process. In a practical approach basis, viewing *cachaça* quality, the non-*Saccharomyces* strains showed a qualitative and quantitative profile of the volatile compounds similar to that of *Saccharomyces* strains. So the non-*Saccharomyces* probably will promote little changes on the profile of volatile compounds of the wine and *cachaça*, once they being low ethanol tolerant their population is restricted and shows an also lower fermentative activity in wines with ethanol content above certain limit.

Key Words: alcoholic fermentation sugarcane liquor, cachaça, yeasts, volatile *Saccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*.

1 – INTRODUÇÃO

Vários pesquisadores têm investigado a influência de espécies ou linhagens de leveduras na formação de compostos do sabor, em fermentações conduzidas em meios sintéticos ou naturais, na produção de diferentes bebidas alcóolicas, tais como vinho, cerveja, uísque, conhaque, rum (Nykänen & Nykänen, 1977; Soles et al., 1982; Cabrera et al., 1988; Giudici et al., 1990; Mateo et al., 1991; Mateo et al., 1992; Longo et al., 1992; Lurton et al., 1995). No entanto, na literatura científica ainda existem poucos trabalhos sobre a influência de linhagens de leveduras na formação de compostos voláteis e na qualidade da aguardente de cana.

Durante a fermentação alcoólica as leveduras produzem etanol, dióxido de carbono, e um grande número de compostos voláteis, sendo os mais abundantes os álcoois superiores; porém, muitos compostos presentes em menores quantidades também desempenham um papel importante no desenvolvimento do sabor das bebidas (Lehtonen & Jounela-Eriksson, 1983). Compostos carbonílicos tais como o acetaldeído e diacetil estão presentes em pequenas concentrações; mas tendo “threshold” muito baixo, podem desempenhar papéis chave no sabor das bebidas (Berry, 1995). Apesar de diferirem quantitativamente, esses compostos estão presentes em todas as bebidas destiladas (Suomalainen & Lehtonen, 1979), porém, é muito raro que um composto específico possa ser relacionado a um sabor específico (Nykänen, 1986). Estes compostos podem ser divididos em diferentes categorias e têm origem no metabolismo da célula (Berry, 1995). Segundo Nykänen (1986) cerca de 1300 compostos voláteis já foram identificados nas bebidas alcoólicas, e se forem incluídos os compostos não voláteis, este número será bem maior.

Os principais álcoois superiores produzidos pelas leveduras são os álcoois alifáticos, n-propanol, isobutanol (2-metil-1-propanol), álcool amílico ativo (2-metil-1-butanol), álcool isoamílico (3-metil-1-butanol) e os álcoois aromáticos como o hexanol e 2-feniletanol. Por causa do seu aroma característico, os constituintes do óleo fúsel exercem uma grande influência no sabor das bebidas destiladas (Nykänen, 1986; Nykänen &

Nykänen, 1991). O álcool isoamílico é o álcool dominante nessas bebidas, sendo seu conteúdo aproximadamente metade do total da fração denominada óleo fúsel (Lehtonen & Jounela-Eriksson, 1983).

O acetaldeído é usualmente o composto carbonílico encontrado em maior quantidade nas bebidas destiladas e representa 90% do conteúdo de aldeídos em uísque, conhaque e rum. Por causa do seu odor pungente, também característico de outros aldeídos alifáticos de cadeia curta, pode aumentar o sabor penetrante das bebidas (Nykänen, 1986; Nykänen & Nykänen, 1991).

Os ésteres formam o mais interessante e numericamente maior grupo de compostos responsáveis pelo sabor das bebidas destiladas, e conferindo às mesmas um aroma agradável (Nykänen & Nykänen, 1991). Os ésteres, etílico, isobutílico, isoamílico e os ésteres de ácidos graxos de cadeia curta têm um aroma agradável de frutas e estão entre os principais componentes do aroma (Suomalainen & Lehtonen, 1979; Lehtonen & Jounela-Eriksson, 1983). Parece, entretanto, que as propriedades particulares dos aromas raramente podem ser associadas a um éster específico (Nykänen, 1986). De acordo com Berry (1995) o acetato de etila normalmente é o éster predominante nas bebidas alcóolicas.

O ácido acético é o principal ácido orgânico excretado no meio de crescimento, apesar de sua proporção relativa variar extensamente nas diferentes bebidas. Na maioria dos casos representa de 60 a 95% da acidez total ((Nykänen & Suomalainen, 1983).

Os produtores de aguardente de cana brasileiros, têm buscado nos últimos anos uma imagem fortemente vinculada à qualidade da bebida e investido no desenvolvimento de um mercado consumidor mais exigente, de modo a diversificar e desvincular de sua linha tradicional de bebida popular, e procurado também competir no mercado externo. Torna-se portanto evidente a necessidade de conhecer melhor e controlar os fatores que influenciam a qualidade da aguardente de cana. Este trabalho teve por objetivo estudar a influência de

diferentes linhagens de leveduras, isoladas de fermentações de aguardente de cana artesanal, na formação dos principais compostos voláteis.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 30 linhagens de leveduras, sendo 24 *Saccharomyces cerevisiae* e 6 pertencentes a outros gêneros (Tabela 1). Estas linhagens foram isoladas de 3 destilarias de produtores artesanais de aguardente de cana no Estado de Minas Gerais, com exceção das linhagens Sc22 e Sc23 que foram provenientes de uma destilaria de aguardente industrial, e a Sc24 de uma destilaria de álcool. A linhagem Sc24 foi utilizada como "referência" por apresentar características consideradas desejáveis para a fermentação alcoólica (Andrietta et al., 1997). Todas as linhagens foram identificadas na Universidade Federal de Minas Gerais, utilizando-se testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos (Kurtzman & Fell, 1998).

As linhagens codificadas como Sc são linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, Ca-*Candida apicola-like*, Cf-*Candida famata*, Cg-*Candida guilliermondii*, Kj- *Kloeckera javanica*, Ps-*Pichia subpelliculosa*, Sp-*Schizosaccharomyces pombe*. As linhagens de *S. cerevisiae* apresentaram concentrações na faixa de 10^7 a 10^9 células viáveis por mL de vinho, enquanto as dos outros gêneros situaram-se entre 10^5 a 10^6 .

Os ensaios para a determinação dos compostos voláteis foram conduzidos em duplicata, em frascos de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo estéril (glicose 150 g/L; fosfato diácido de potássio 5,0 g/L; cloreto de amônio 5,0 g/L; sulfato de magnésio heptahidratado 1,0 g/L; cloreto de potássio 1,0 g/L; extrato de levedura 6,0 g/L, pH 6,0). O fechamento dos frascos foi feito utilizando-se rolhas de borracha contendo orifício central por onde era introduzido um tubo de vidro em "L" (com filtro de algodão) para saída de CO₂. Os inóculos foram preparados por ressuspensão em água destilada, das culturas de leveduras mantidas em tubos de ensaio com ágar inclinado "slants" em meio GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1%, NaH₂PO₄ 0,2% e ágar 2%) por

24 h a 32°C. Os frascos foram inoculados com um volume equivalente a 10% do meio a ser fermentado, e a seguir incubados à temperatura de $32 \pm 1^\circ\text{C}$ e 150 rpm, durante 24 horas.

TABELA 1- Origem, ano de coleta e identificação das linhagens isoladas

Destilarias	Safras			
	1996		1997	
Brumado Velho (MG)	Sc1	UFMG-A957	Sc3	UFMG-A1605
	Sc2	UFMG-A968	Sc4	UFMG-A1667
			Sc5	UFMG-A1656
			Sc6	UFMG-A1676
			Sc7	UFMG-A1683
			Ps	UFMG-A960
			Ca	UFMG-A972
Germana (MG)	Sc8	UFMG-A905	Sc13	UFMG-A1492
	Sc9	UFMG-A1119	Sc14	UFMG-A1497
	Sc10	UFMG-A1127	Sc15	UFMG-A1607
	Sc11	UFMG-A1278	Sc16	UFMG-A1626
	Sc12	UFMG-A1265	Sc17	UFMG-A1632
			Sc18	UFMG-A1641
			Cg	UFMG-A882
			Kj	UFMG-A893
			Cg	UFMG-A1029
			Sp	UFMG-A1113
Vale Verde (MG)			Sc19	UNICAMP-V1
			Sc20	UNICAMP-V2
			Sc21	UNICAMP-V3
Rosa (SP)			Sc22	UNICAMP-R1
			Sc23	UNICAMP-R2
Clealco (SP)			Sc24	CL14/97

Decorrido o tempo de incubação uma amostra era centrifugada e no vinho delevurado determinado o glicerol. Outra amostra era destilada por arraste de vapor em microdestilador, e no destilado era determinado etanol, acetaldeído, acetato de etila, ácido acético, propanol, isobutanol e álcool isoamílico. O etanol foi determinado espectrofotometricamente pelo método do dicromato de potássio (Salik & Povoh, 1993), o

glicerol utilizando-se o Kit de triglicerídeos Labtest (Fossati & Prencipe, 1982; MacGowan et al., 1983), e os demais compostos voláteis por cromatografia gasosa. Os compostos voláteis totais não incluem o glicerol, produzido em proporções significativamente maiores que os demais.

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás Varian modelo 3400, com detetor de ionização de chama, utilizando-se uma coluna capilar HP-innowax (60m x 0,32mm x 0,5 μ m), empacotada com polietileno glicol, nas seguintes condições: temperatura do injetor 210 ° C , do detector 220 ° C; fluxo do gás de arraste (hidrogênio) 1,0 mL/min; vazão dos gases no detector, hidrogênio 30 mL/min e ar sintético 300 mL/min. As injeções foram feitas sem divisão de fluxo (splitless), e a programação da temperatura da coluna foi: 50°C (8 min), 15°C/min até 170°C (6 min). Os componentes foram determinados por injeção direta de 1,0 μ L das amostras.

Os compostos voláteis foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões. Inicialmente cada um dos padrões foi injetado separadamente para obtenção de seu tempo de retenção. A solução padrão foi preparada com concentrações conhecidas de cada composto, e do padrão interno, diluídos em uma solução hidroalcoólica a 4% v/v (concentração aproximada de álcool etílico nas amostras). Para quantificação dos compostos voláteis foram construídas curvas de calibração para cada um deles, obtidas pela razão de sua área pela área do padrão interno, em função da concentração de cada composto. O álcool n-amílico foi utilizado como padrão interno.

Os resultados obtidos foram submetidos a Análise por Agrupamento Hierárquico – AAH e Análise de Componentes Principais – ACP, utilizando-se o programa computacional PIROUETT (1997). Foram submetidos também à análise de variância e ao teste de Tukey para comparação das médias (SAS, 1993). Os resultados foram expressos em mg / 100 mL de álcool anidro, ou seja, equivalentes a um fator que exprime a relação entre a produção de um determinado composto volátil e a produção de etanol (mg de composto volátil produzido por 100 mL de etanol produzido).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fermentação artesanal de aguardente de cana caracteriza-se por ser conduzida por uma microbiota mista de leveduras, com predominância de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Leveduras apiculadas (principalmente *Kloeckera japonica*) e espécies de *Candida*, *Kluyveromyces* e *Pichia* são também freqüentemente isoladas (Morais et al., 1997; Pataro et al., 2000). As leveduras presentes nessas fermentações estão em constante sucessão, devido à introdução de microrganismos que acompanham o caldo de cana, e também devido às condições de processo (Pataro et al., 1998). A presença de leveduras não-*Saccharomyces*, geralmente apiculadas (*Kloeckera*), caracteriza a fase inicial das fermentações espontâneas de mosto de uva, e podem fermentar o mosto até um teor de etanol máximo de 5%; posteriormente as linhagens *Saccharomyces*, mais tolerantes ao etanol e mais vigorosas, assumem a fermentação (Zironi et al., 1993).

Acetaldeído, acetato de etila, ácido acético, propanol, isobutanol e álcool isoamílico, são os compostos secundários mais estudados na fermentação alcoólica destinada a produção de bebidas destiladas e outras (Lisle et al., 1978; Lehtonen & Jounela-Eriksson, 1983; Pons et al., 1989; Longo et al., 1992;). No caso da aguardente de cana tem sido também os mais determinados para avaliar a sua qualidade (Vargas, 1995; Boza, 1996; Brasil, 1997).

Na Tabela 2 as linhagens estudadas estão listadas em ordem decrescente do teor de etanol no vinho (2,1 a 8,3%, v/v), e pode-se observar que as linhagens apresentaram variações estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) para a produção dos diversos compostos voláteis. As linhagens de leveduras do gênero *Saccharomyces* produziram compostos voláteis dentro de limites proporcionais ao seu teor no vinho, ou seja, variando em torno de 50% do teor médio de cada componente. A proporção em compostos voláteis (mg / 100 mL de álcool anidro) produzido pelas linhagens *Saccharomyces* variou: acetaldeído entre 12 a 49, com média de 25; o acetato de etila entre 8 a 14, com média de 10; o propanol entre 25 a 78, com média de 41; o isobutanol entre 16 a 34, com média de 24; o álcool isoamílico entre 102 a 218, com média de 151; os álcoois superiores entre 161 a 329, com média de

217; o glicerol entre 5.273 a 10.949, com média de 7348; o ácido acético entre 360 a 1.152, com média de 559. As linhagens estudadas de leveduras não-*Saccharomyces* (*Candida*, *Kloeckera*, *Pichia* e *Schizosaccharomyces*) em geral apresentaram proporções, de alguns componentes, fora dos limites das *Saccharomyces*: acetaldeído, de 16 a 96; acetato de etila, de traços a 14; propanol, de traços a 38; isobutanol, de traços a 57; álcool isoamílico, de 31 a 202; álcoois superiores, de 31 a 257; glicerol, de 7.062 a 17.778; ácido acético, de 38 a 717

Para facilitar a análise dos resultados, as linhagens de levedura estudadas foram classificadas em níveis que variaram de Muito Baixo a Muito Alto (Tabela 3), conforme a variação na proporção ou taxa de formação de compostos voláteis e considerando-se também os resultados da análise estatística (teste F e teste Tukey de comparação de médias, $p \leq 0,05$). Pode-se observar que a maioria das linhagens (86,7%) situou-se nas faixas de Baixa a Média produção de acetaldeído e de acetato de etila. A maioria das linhagens ficou também nas faixas de Média a Alta produção de propanol (80% das linhagens), isobutanol (70%) e álcool isoamílico (63%). Diferentemente das linhagens *Saccharomyces*, as linhagens de *C. famata*, *C. guilliermondii* e *S. pombe*, não produziram propanol em níveis detectáveis. A maioria das linhagens (87%) também ficou nos níveis de Média a Alta produção de ácido acético.

A linhagem Sc21 diferenciou-se das demais por produzir as maiores quantidades de propanol (78 mg/100 mL de aa), de álcool isoamílico (218 mg/100 mL aa) e de álcoois superiores (329 mg/100 mL aa). Sabe-se que os álcoois superiores têm grande importância por influenciar o sabor das bebidas alcoólicas, e que a eles tem sido atribuída a percepção de “corpo ou profundidade” em uísques e conhaques (Guymon, 1972). Esta linhagem também apresentou outras características desejáveis para a qualidade da aguardente, em relação a outras *Saccharomyces*, como menor formação de ácido acético e maior produção de glicerol.

A linhagem *S. pombe* também apresentou um comportamento bem diferente das demais linhagens, não produziu propanol e isobutanol em níveis detectáveis, menor quantidade de álcool isoamílico (31 mg/100 mL aa), uma quantidade baixa de acetato de etila, e acetaldeído em um nível Muito Alto, bem superior às outras linhagens (96 mg/100 mL aa). Estes resultados estão de acordo com os de Parfait & Jouret (1975), que relataram que *S. pombe* produz concentrações muito pequenas de compostos voláteis, relativamente pouca quantidade de álcoois superiores, mas altas concentrações de ácido pirúvico, acetaldeído e ácido α -cetoglutárico. A presença dessa linhagem pode influenciar negativamente o sabor da aguardente, especialmente se não houver separação da fração de cabeça, já que o odor penetrante do acetaldeído pode ocasionar aumento do sabor pungente das bebidas alcoólicas (Nykänen, 1986; Nykänen & Nykänen, 1991).

As linhagens apresentaram ampla faixa de variação na formação de ácido acético (38 a 1.152 mg/100 mL aa), sendo que as linhagens Sc4 e Sc13 produziram as maiores quantidades (1.073 e 1.152 mg/100 mL de aa, respectivamente); e as linhagens de *C. apicola* e *K. javanica* produziram as menores quantidades de ácido acético (38 e 63 mg/100 mL aa, respectivamente). Nas bebidas alcoólicas como uísques, conhaques e runs, a proporção de ácido acético é bastante elevada, em relação à quantidade de ácidos voláteis totais (Nykanen et al., 1968). A elevada correlação encontrada entre os compostos voláteis totais e o ácido acético ($r = +0,985$, $p \leq 0,001$), indica que a síntese dos principais componentes voláteis é acompanhada pela síntese de ácido acético.

As linhagens não-*Saccharomyces* (Tabela 2) produziram as maiores quantidades de glicerol, com exceção da *P. subpelliculosa*; Zironi et al. (1993) também relataram que linhagens apiculadas (*Kloeckera*), formam grandes quantidades de glicerol em mosto de uva. A quantidade de glicerol formado pelas linhagens de leveduras estudadas variou de 5.273 a 17.778 mg/100 mL de álcool anidro. Segundo Radler & Schütz (1982) a quantidade de glicerol, produto secundário formado em maior proporção na fermentação alcoólica, é bastante dependente da linhagem de levedura; diferentes linhagens de *S. cerevisiae* formaram quantidades de glicerol variando entre 4,2 a 10,4 g/L de vinho. A

importância do glicerol na fermentação alcoólica está relacionada com a qualidade das bebidas alcoólicas, como relatado por Parfait & Jouret (1980) para rum; esses autores relatam que as bactérias lácticas (tipo *Leuconostoc mesenteroides*) podem metabolizar o glicerol dando origem à acroleína, que pode conferir características sensoriais negativas ao rum. De acordo com Rankine & Bridson (1971), o glicerol influencia a qualidade do vinho, particularmente conferindo maciez e viscosidade.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

TABELA 2 - Etanol % (v/v) no vinho, e produção de compostos voláteis (mg/100 mL de álcool anidro) pelas linhagens de leveduras.

Linhagens	Etn	Glic	Actad	AcEtil	HAc	Prop.	Isob	Isoam	AlSup	Cvt
Sc8	8,3	6.368	16,0	7,6	323,9	25,3	16,0	115,7	157,0	504,4
Sc7	8,1	6.323	21,9	11,4	360,2	41,5	21,9	156,7	220,1	613,6
Sc6	8,0	6.211	19,5	9,7	537,9	41,5	34,3	176,2	251,9	819,0
Sc5	8,0	6.639	20,1	11,2	606,0	31,6	22,4	135,1	189,1	826,4
Sc24	7,9	6.053	11,9	8,4	574,8	36,6	22,1	142,1	200,7	795,9
Sc3	7,9	6.272	14,8	9,3	666,3	36,7	22,7	199,8	259,1	949,5
Sc19	7,8	7.520	15,9	10,7	516,7	32,0	32,1	183,7	274,8	818,1
Sc4	7,8	6.315	20,8	12,2	1.073,3	43,1	21,4	162,6	227,1	1.333,4
Sc2	7,8	6.642	16,7	10,3	507,4	37,6	22,9	207,7	268,2	802,6
Sc1	7,7	7.575	15,8	13,8	814,7	41,5	29,4	184,9	255,7	1.100,0
Sc13	7,6	8.087	18,0	7,6	1151,9	55,2	19,0	140,2	214,4	1.391,9
Sc20	7,5	7.585	13,5 ¹	10,4	775,8	44,8	27,6	174,5	246,9	1.046,5
Ps	7,4	7.062	16,3	9,5	717,0	36,2	23,3	142,7	202,2	945,0
Sc23	7,4	5.273	18,4	6,9	276,0	38,9	18,3	131,0	188,3	489,5
Sc22	7,4	5.632	22,2	8,2	411,1	30,7	23,8	131,8	186,3	627,8
Sc18	7,3	7.042	26,3	9,3	291,6	39,7	26,1	107,6	173,4	500,6
Sc14	7,3	7.200	29,2	8,2	679,1	53,5	20,3	164,8	238,6	955,1
Sc9	7,2	7.299	27,9	10,8	534,9	35,4	22,8	114,5	172,7	746,3
Sc12	7,0	7.541	18,0	9,2	451,1	34,7	19,8	133,9	188,3	666,6
Sc10	6,9	8.282	39,7	7,6	354,6	38,4	18,8	129,3	186,6	588,3
Sc17	6,6	8.556	37,9	8,7	719,4	46,4	29,1	142,2	217,7	983,8
Sc16	6,3	9.143	46,2	10,7	440,5	36,2	18,8	142,6	197,6	695,0
Sc21	6,2	7.936	26,0	8,0	377,7	78,4	33,0	217,5	328,8	740,5
Kj	5,9	11.937	34,3	12,2	63,0	26,3	56,9	163,5	246,8	356,3
Sc15	5,9	9.903	49,2	7,9	581,9	39,2	20,6	101,8	161,1	800,1
Sp	5,6	14.945	96,1	6,4	590,8	nd	nd	31,4	31,4	724,7
Ca	4,5	14.650	29,1	14,4	38,4	37,7	24,4	159,8	221,9	303,8
Sc11	4,4	10.949	48,4	11,8	379,9	42,5	27,4	137,1	207,0	647,1
Cf	2,9	13.844	21,5	nd	268,4	nd	39,6	121,5	161,1	451,0
Cg	2,1	17.778	31,7	nd	347,8	nd	54,5	202,4	256,9	636,4
F (5%)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CV (%)	3,7	7,4	9,9	10,5	8,1	8,7	8,1	4,4	3,8	5,5
DMS	0,8	1989	11,2	4,2	172,1	14,3	8,9	27,1	33,2	172,3

Sc24 - levedura de referência (destilaria de álcool); nd - não detectado; CV = Coeficiente de Variação; DMS = Diferença mínima significativa; Rend = Rendimento da fermentação (%); Etn = Etanol; Glic = Glicerol; Actald = Acetaldeído; AcEtil = Acetato de etila; HAc = Ácido acético; Prop = Propanol; Isob. = Isobutanol; Isoam = Álcool isoamílico; Al.Sup. = Álcoois superiores totais; Cvt = Compostos voláteis totais (exclusive o glicerol).

TABELA 3 - Níveis de produção¹ (mg / 100 mL álcool anidro) dos compostos voláteis formados pelas linhagens de leveduras.

Compostos	Níveis				
	Muito Baixo	Baixo	Médio	Alto	Muito Alto
Acetaldeído		11,0-25,0 ¹ Sc1,2,3,4,5,6,7,8 12,13,19,20,22 23,24,Cf,Ps (17)	25,1-40,0 Sc9,10,14,17,18,21 Ca,Cg,Kj (9)	40,1-60,0 Sc 11,15,16 (3)	60,1-100,0 Sp (1)
	Traços-5,0 Cf,Cg (2)	5,01-8,0 Sc8,10,13,15 21,23, Sp (7)	8,01-13,0 Sc2,3,4,5,6,7,9,11 12,14,16,17,18,19 20,22 24,Kj,Ps (19)	13,01-15,0 Sc 1,Ca (2)	
Acetato Etila	Traços-5,0 Cf,Cg,Sp (3)	5,1-30,0 Sc8, Kj (2)	30,1-40,0 Sc2,3,5,9,10,12,15 16,18,19,22 ,23 24, Ca,Ps (15)	40,1-60,0 Sc1,4,6,7,11,13 14,17,20 (9)	60,1-80,0 Sc21 (1)
	Traços-5,0 Sp (1)	5,1-20,0 Sc8,10,12,13 16,23 (6)	20,1-30,0 Sc1,2,3,4,5,7,9,11 14,15,17,18,20,22 24, Ca, Ps (17)	30,1-40,0 Sc 6,19,21,Cf (4)	40,1-60,0 Cg,Kj (2)
Isobutanol	30,0-80,0 Sp (1)	80,1-130,0 Sc8,9,10,15,18 Cf (6)	130,1-160,0 Sc5,7,11,12,13,16 17,22,23,24, Ca,Ps (12)	160,1-190,0 Sc1,4,6,14, 19,20,Kj (7)	190,1-220,0 Sc2,3,21,Cg (4)
	Traços-5,0 Sp (1)	30,0-100,0 Ca,Kj (2)	100,1-500,0 Sc7,8,10,11,12,16, 18,21,22,23,Cf,Cg (12)	500,1-900,0 Sc1,2,3,5,6,9,14 15,17,19,20,24 Ps,Sp (14)	900,1-1200,0 Sc4,13 (2)
Ácido Acético	30,0-120,0 Sp (1)	120,1-200,0 Sc5,8,9,10,12,15 16,18,22,23,Cf (11)	200,1-250,0 Sc4,7,11,13,14,17 20,24,Ca,Kj,Ps (11)	250,1-300,0 Sc1,2,3,6,19,Cg (6)	300,1-330,0 Sc21 (1)
	Traços-5,0 Sp (1)	5200-7000 Sc2,3,4,5,6,7,8 22,23,24 (10)	7001-9900 Sc1,9,10,12,13,14 16,17,18,19,20,21 Ps (13)	9901-12000 Sc11,15 Kj (3)	12001-18001 Ca,Cf,Cg,Sp (4)
Álcoois Superiores	30,0-120,0 Sp (1)	120,1-200,0 Sc5,8,9,10,12,15 16,18,22,23,Cf (11)	200,1-250,0 Sc4,7,11,13,14,17 20,24,Ca,Kj,Ps (11)	250,1-300,0 Sc1,2,3,6,19,Cg (6)	300,1-330,0 Sc21 (1)
	Traços-5,0 Sp (1)	5200-7000 Sc2,3,4,5,6,7,8 22,23,24 (10)	7001-9900 Sc1,9,10,12,13,14 16,17,18,19,20,21 Ps (13)	9901-12000 Sc11,15 Kj (3)	12001-18001 Ca,Cf,Cg,Sp (4)
Glicerol	30,0-120,0 Sp (1)	120,1-200,0 Sc5,8,9,10,12,15 16,18,22,23,Cf (11)	200,1-250,0 Sc4,7,11,13,14,17 20,24,Ca,Kj,Ps (11)	250,1-300,0 Sc1,2,3,6,19,Cg (6)	300,1-330,0 Sc21 (1)
	Traços-5,0 Sp (1)	5200-7000 Sc2,3,4,5,6,7,8 22,23,24 (10)	7001-9900 Sc1,9,10,12,13,14 16,17,18,19,20,21 Ps (13)	9901-12000 Sc11,15 Kj (3)	12001-18001 Ca,Cf,Cg,Sp (4)

Valores entre parênteses correspondem a quantidade de linhagens em cada nível

A análise exploratória de Agrupamento Hierárquico e de Componentes Principais foi realizada com as 30 linhagens de leveduras e 7 variáveis (taxas de produção de acetaldeído, acetato de etila, ácido acético, propanol, isobutanol, álcool isoamílico e álcoois superiores). O dendrograma (Figura 1) mostra a similaridade entre as linhagens de leveduras segundo as variáveis escolhidas. A escala variando de 0,0 a 1,0 representa os índices de similaridade entre as linhagens e as letras (a,b ou c) após o código de cada linhagem indica as repetições. Observa-se a formação de 6 grupos distintos, e que dentro de cada grupo as linhagens apresentam índice de similaridade na faixa de 0,78 a 0,90. Os grupos 4 e 6 contêm as linhagens de leveduras mais similares 0,85 e 0,90 , respectivamente. A grande maioria das linhagens situou-se nos grupos 1 (33%), 5 (30%), e 3 (20%). Observa-se que a linhagem de *S. pombe* formou um grupo distinto (grupo 2), e as linhagens *C. apicola* e *K. javanica* formaram um grupo comum (grupo 6), assim como a Sc13 e Sc4 (grupo4). O grupo 1 é formado somente por linhagens de *S. cerevisiae*. As leveduras não-*Saccharomyces* mais similares entre si foram *C. apicola* e *K. javanica*, com índice de similaridade de cerca de 0,95. A linhagem de *P. subpelliculosa* apresentou características gerais mais similares às linhagens *S. cerevisiae* do que com as linhagens não-*Saccharomyces*.

A Análise de Componentes Principais mostrou que 93,1% da variância dos dados foi explicada pela Componente Principal 1 (CP 1), e somente 6,3% pela CP 2. A separação entre as linhagens foi descrita pela CP 1, como pode ser visualizado na Figura 2 (CP1 versus CP2). Analisando conjuntamente os gráficos de *scores* e de *loadings* (Figuras 2 e 3), nota-se que as linhagens pertencentes aos grupos 2, 3 e 4 têm *scores* positivos na CP 1, enquanto as linhagens do grupo 5 e 6 têm *scores* negativos e as do grupo 1 têm *scores* próximo a zero com valores ligeiramente positivos ou negativos. Quando comparados entre si, observa-se que a separação entre as linhagens é, em grande parte, devida aos altos teores e amplitude de variação do ácido acético. As linhagens do grupo 4 têm *scores* mais positivos, por apresentarem altos teores de ácido acético e as do grupo 6 têm *scores* mais negativos, por apresentarem os mais baixos teores de ácido acético. O acetaldeído, acetato de etila, propanol, isobutanol, álcool isoamílico e álcoois superiores totais não contribuíram

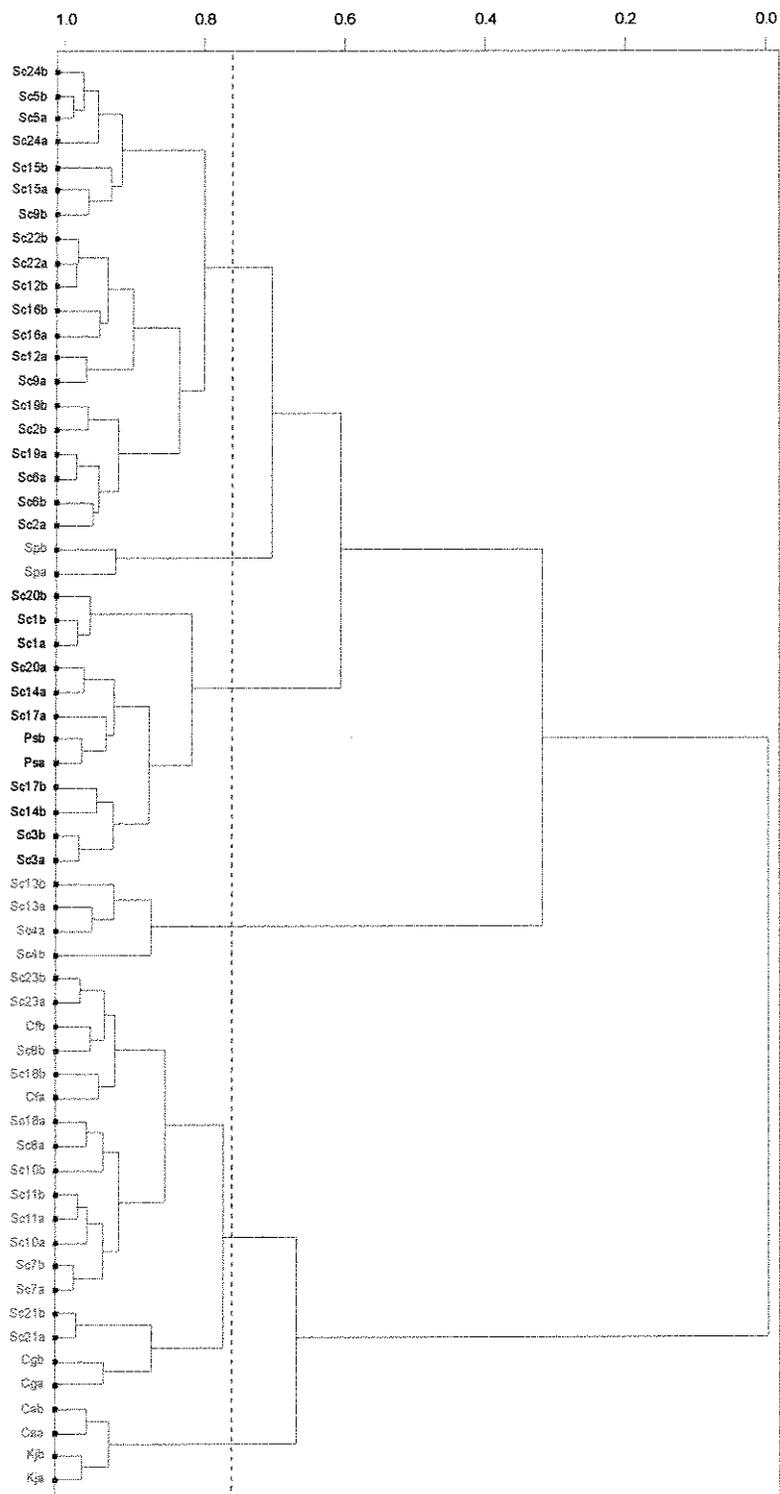


FIGURA 1 - Dendrograma obtido para as 30 linhagens de leveduras, em função do teor de compostos voláteis no vinho

na separação dos grupos na CP 1. O grupo 2 contendo somente a linhagem *S. pombe* teve o *score* mais negativo na CP 2 devido aos altos teores de acetaldeído. A levedura Sc21 pertencente ao grupo 5 apresenta o *score* mais positivo na CP 2 devido ao alto teor de álcoois superiores. A levedura de referência Sc24 se encontra no grupo 1 que contém somente linhagens de *S. cerevisiae* e apresenta *score* próximo a zero tanto na CP 1 como na CP 2.

4- CONCLUSÕES

As linhagens de levedura pertencentes ao gênero *Saccharomyces* produziram compostos voláteis dentro de limites proporcionais ao seu teor no vinho, ou seja, com uma variação limitada em torno de 50% do teor médio de cada componente. A Análise de Agrupamento Hierárquico e de Componentes Principais mostrou a separação das linhagens em diversos grupos, sendo a capacidade de produção de ácido acético a variável de maior impacto na diferenciação das linhagens.

As linhagens não-*Saccharomyces* se diferenciaram bastante, principalmente pela apresentação de quantidade elevada de glicerol, o que conta expressivamente para o menor rendimento da fermentação dessas leveduras. A maior formação de glicerol foi uma característica em todas as linhagens não-*Saccharomyces*, com exceção daquela de *P. subpelliculosa*. Dentre estas, a linhagem de *S. pombe* foi a única a não mostrar características desejáveis para a produção de aguardente de cana por produzir quantidade muito baixa de álcoois superiores e elevada de acetaldeído. As linhagens de *C. famata* e *C. guilliermondii* não produziram acetato de etila e propanol em quantidades detectáveis, o mesmo ocorrendo com a de *S. pombe* para propanol e isobutanol; o meio sintético utilizado deve ser deficiente em nutriente essencial para a síntese desses compostos. As linhagens de *P. subpelliculosa* e de *K. javanica* apresentaram um perfil de formação de compostos

voláteis semelhante às *Saccharomyces*, porém, aquela última com produção extremamente menor de ácido acético.

As linhagens *Saccharomyces* fermentaram melhor, fornecendo vinhos com maior teor alcoólico, revelando-se, portanto, mais tolerantes ao etanol, o que lhes confere maior potencial de dominar o processo fermentativo. Deste modo, uma vez que as não-*Saccharomyces* apresentam um perfil qualitativo e quantitativo de compostos voláteis considerado semelhante ao das *Saccharomyces* para efeitos práticos na qualidade da aguardente, pode-se dizer que as não-*Saccharomyces* em vista de sua pouca tolerância ao etanol, e conseqüentemente pequena população além de reduzida atividade fermentativa em vinhos a partir de determinado teor em etanol, deve provocar pouca alteração no perfil de compostos voláteis do vinho.

As linhagens *Saccharomyces* isoladas de fermentações em pequenas destilarias, destinadas a produção de aguardente artesanal, mostraram grande similaridade na produção de compostos voláteis em comparação com uma linhagem referencial de produção de etanol isolada em destilaria de álcool, e com outras duas linhagens provenientes de destilaria industrial de aguardente. As linhagens isoladas nas destilarias de aguardente artesanal apresentaram uma ampla variação no teor de etanol do vinho, reflexo das condições igualmente variadas no processo, que mostram a seleção de linhagens adaptadas a menores teores de açúcar do mosto, ou fermentações com fase inicial mais lenta com manutenção de menores teores alcoólicos no vinho durante maior tempo. Entre as linhagens *Saccharomyces*, a Sc21 produziu o mais elevado teor de propanol, álcool isoamílico e de álcoois superiores. Esta linhagem apresenta, portanto, características que a torna interessante na produção de aguardente, especialmente em condições de mosto com menor teor de açúcar ou de etanol no vinho, devido à sua menor tolerância ao etanol. As linhagens Sc13 e Sc4 diferenciaram-se por produzirem altos teores de ácido acético.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.S.; SERRA, G.E. Leveduras não fermentativas – Processo de instalação e forma de detecção e eliminação. **STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 15, n. 6, p. 32-35, Jul./Ago., 1997.
2. BERRY, D. R. Alcoholic beverage fermentations In: LEA, A.G.H. & PIGGOT, J.R. **Fermented beverage production**, Blackie academic & professional, 1995, p. 32-44.
3. BOZA, Y. E. A.G. **Influência da condução da destilação sobre a composição e a qualidade sensorial da aguardente de cana**. Piracicaba, 1996. 143p. Tese (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
4. BRASIL. Decreto nº 2.314 do Ministério da Agricultura de 04 de setembro de 1997. Dispõe sobre o registro, classificação, padronização, produção e fiscalização das bebidas. **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 de set. 1997.
5. CABRERA, M. J.; MORENO, J.; ORTEGA, J.M.; MEDINA, M. Formation of ethanol, higher alcohols, esters, and terpenes by five yeast strains in musts from Pedro Ximénez grapes in various degrees of ripeness. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 39, n. 4, p. 283-287, 1988.
6. FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clinical Chemistry**, Berlin, v.28, n.10, p. 2077-2080, 1982
7. GIUDICI, P.; ROMANO, P.; ZAMBONELLI, C. A biometric study of higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 36, p. 61-64, 1990.

8. GUYMON, J.F. Higher alcohols in beverage brandy. **Wines & Vines**, San Francisco, v.1, p. 37-40, 1972.
9. KURTZMAN, C.P; FELL, J.W. **The Yeast: a Taxonomic Study**, Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1998. 1005p.
10. LEHTONEN, M. & JOUNELA-ERIKSSON, P. Volatile and non-volatile compounds in the flavour of alcoholic beverages. In: PIGGOTT, J.R. **Flavour of distilled beverages: Origin and Development**. Florida: Verlag Chemie International Inc., 1983. p. 64-78.
11. LISLE, D.B.; RICHARDS, C.P.; WARDLEWORTH, D.F. The identification of distilled alcoholic beverages. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v.84, p.93-96, 1978.
12. LONGO, E.; VELÁZQUEZ, J.B.; SIEIRO, C.; CANSADO, J., CALO, P.; VILLA, T.G. Production of higher alcohols, ethyl acetate, acetaldehyde and other compounds by 14 *Saccharomyces cerevisiae* wine strains isolated from the same region (Salnés, N.W. Spain). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 8, p. 539-541, 1992.
13. LURTON, L., SNAKKERS, G.; ROULLAND, C.; GALY, B. Influence of the fermentation yeast strain on the composition of wine spirits. **Journal of the Science and Food and Agriculture**, London, v. 67, p. 485-491, 1995.
14. MCGOWAN, M.W.; ARTISS, J.D.; STRANDBERGH, D.R.; ZAK, B. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. **Clinical Chemistry**, Berlin, v. 29, n. 3, p. 538-542, 1983.
15. MATEO, J.J., JIMENEZ, M.; HUERTA, T.; PASTOR, A. Contribution of different yeasts isolated from musts of monastrell grapes to the aroma of wine.

International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v. 14, p.153-160, 1991.

16. MATEO, J.J.; JIMENEZ, M.; HUERTA, T.; PASTOR, A. Comparison of volatiles produced by four *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from monastrell musts. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 43, n. 2, p. 206-209, 1992.
17. MORAIS, P.B.; ROSA, C. A., LINARDI, V. R.; PATARO, C.; MAIA, A.B.R.A. Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of brazilian sugar-cane aguardente. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 13, p. 241-243, 1997.
18. NYKÄNEN, L. Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 37, n. 1, p. 84-96, 1986.
19. NYKÄNEN, L. & NYKÄNEN, I. Production of esters by different yeast strains in sugar fermentations. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 83, p. 30-31, 1977.
20. NYKÄNEN, L. & NYKÄNEN, I. Rum flavour. In: PIGGOTT, J.R. **Flavour of distilled beverages: Origin and Development**. Florida: Verlag Chemie Internacional, Inc., 1983. p. 49-63.
21. NYKÄNEN, L. & NYKÄNEN, I. Distilled beverages. In: MAARSE, H. **Volatile compounds in food and beverages**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1991 p. 548-580.
22. NYKANEN, L.; PUPUTTI, E.; SUOMALAINEN, H. Volatile fatty acids in some brands of whisky, cognac and rum. **Journal of Food Science**, Chicago, v.33, p.88-92, 1968.

23. NYKÄNEN, L. & SUOMALAINEN, H. **Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages.** Berlin: Akademic-Verlag, 1983. 413p.
24. PATARO, C.; SANTOS, A.; CORREA, S.R.; MORAIS, P.B.; LINARDI, V.R.; ROSA, C.A. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentatiton in an aguardente distillery. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, n. 29, p. 69-73, 1998.
25. PATARO, C.; GUERRA, J.B.; PETRILLO-PEIXOTO, M.L.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; LINARDI, V.R.; ROSA, C.A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, p. 1-9, 2000.
26. PARFAIT, A.; JOURET, C. Formation of higher alcohols in rum. **Annales de Technologie Agricole**, Paris, v.24, p.421-36, 1975.
27. PARFAIT, A.; JOURET, C. Le glycerol dans la fermentation alcoolique des mélasses et des jus de cannes a sucre. **Industries Alimentaires et Agricoles**, Paris, v.97, n.(7/8), p. 721-724, 1980.
28. PIROUETT, **Multivariate Data Analysis for IBM PS Systems**, version 2.1, 1997. Infometrix, Seattle, WA, USA.
29. PONS, M.N.; PICHON, D.; AUTHIER, M. Monitoring of alcoholic fermentations of fruit juices via a gas membrane sensor. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.68, p.282-285, 1989.
30. RADLER, F.; SCHÜTZ, H. Glycerol production of various strains of *Saccharomyces*. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 33, n. 1, p. 36-40, 1982.

31. RANKINE, B.C.; BRIDSON, D.A. Glycerol in australian wines and factors influencing its formation. **Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.22, p. 6-12, 1971.
32. SALIK, F.L.M.; POVOH, N.P. Método espectrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 5., Águas de São Pedro. **Anais**. Piracicaba: STAB, 1993, p. 262-266.
33. SAS Institute. **SAS User's Guide: statistics**. Cary, USA, 1993.
34. SOLES, R.M.; OUGH, C.S.; KUNKEE, R.E. Ester concentration differences in wine fermented by various species and strains of yeasts. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 33, n. 2, p. 94-98, 1982
35. SUOMALAINEN, H.; LEHTONEN, M. The production of aroma compounds by yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 85, p. 149-156, 1979.
36. VARGAS, E.A. **Qualidade da aguardente de cana produzida, engarrafada e/ou comercializada em Minas Gerais**. Belo Horizonte, 1995. 81p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas
37. ZIRONI, R.; ROMANO, P.; SUZZI, G.; BATTISTUTA, F.; COMI, G. Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequencial cultures of *Hanseniaspora guilliermondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 15, n.3, p. 235-238, 1993.

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES LINHAGENS DE LEVEDURA NA COMPOSIÇÃO E QUALIDADE SENSORIAL DA AGUARDENTE DE CANA

Evelyn Souza Oliveira¹; Helena Maria André Bolini Cardello²; Elson Luiz Rocha Souza³ e Gil Eduardo Serra⁴

¹ Departamento de Alimentos-Faculdade de Farmácia, UFMG; ² Departamento de Nutrição-Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP; ³ Laboratório de Análises de Bebidas e Vinagres de Andradas, Ministério da Agricultura e do Abastecimento- Responsável Técnico; ⁴ Departamento de Tecnologia de Alimentos- Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

RESUMO

Foram produzidas 10 aguardentes de cana (cachaça) utilizando-se diferentes linhagens de leveduras, sendo seis *Saccharomyces cerevisiae*, além de *Candida apicola-like*, *Kloeckera javanica*, *Pichia subpelliculosa* e *Schizosaccharomyces pombe*. O caldo de cana fermentado (vinho) foi destilado em um alambique de cobre com capacidade útil de 30 litros, obtendo-se aproximadamente 4 a 6 litros de aguardente a 39 % (v/v); a temperatura e velocidade da destilação foram padronizadas, bem como separada uma fração de cabeça correspondente a 5% do volume da aguardente. As linhagens não-*Saccharomyces* apresentaram rendimento da fermentação similar às linhagens *Saccharomyces*. Nas aguardentes foram determinados acetaldeído, acetato de etila, propanol, isobutanol, álcool isoamílico, a acidez volátil e o grau alcoólico, assim como o teor de etanol no vinho. As aguardentes obtidas apresentaram variações nos teores dos compostos secundários, mas estas variações não ocasionaram diferenças ($p \leq 0,05$) em relação aos atributos sensoriais de aroma, sabor e impressão global. Entre os compostos voláteis determinados nas aguardentes somente o propanol apresentou correlação positiva ($p \leq 0,05$) com os resultados da análise sensorial para sabor e impressão global. A aguardente obtida com a linhagem de *S. pombe* mostrou baixos teores para praticamente todos os compostos voláteis, e não se mostrou adequada para a produção de aguardente, obtendo as notas mais baixas na análise

sensorial. A Análise Exploratória de Agrupamento Hierárquico, em função dos compostos voláteis determinados, mostrou a separação das aguardentes em 5 grupos e a Análise de Componentes Principais mostrou que 93% da variação (CP 1) ocorrida entre as amostras foi explicada pelos compostos voláteis individuais e a soma dos compostos secundários totais, excetuando-se o álcool isoamílico, e apenas 7% foi associada a (CP 2) devido a acidez volátil. A constatação de correlações negativas entre todos os compostos voláteis na aguardente e o etanol no vinho, com exceção do acetaldeído, é resultado do efeito de diluição dos componentes secundários no maior volume de aguardente destilada, e mostra que a variação no teor alcoólico do vinho é um fator importante no processo industrial, para padronização da relação etanol/voláteis e da qualidade das bebidas comercializadas. Os resultados obtidos com as aguardentes foram ainda comparados com a produção de voláteis de outro experimento, que utilizou as mesmas linhagens de levedura, em meio sintético; observou-se que os álcoois superiores e o álcool isoamílico, presentes na aguardente e no meio sintético, apresentaram correlação positiva, mostrando que para o mais abundante grupo de voláteis na aguardente há transposição desses resultados permitindo o uso de meios sintéticos para padronizar a caracterização e triagem de leveduras com relação àqueles componentes.

Palavras-chave: fermentação alcoólica, aguardente de cana, cachaça, compostos secundários, voláteis, análise sensorial, levedura, *Saccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*.

INFLUENCE OF YEAST STRAIN ON THE COMPOSITION AND SENSORY QUALITY OF SUGARCANE LIQUOR OR “CACHAÇA” .

SUMMARY

Six strains of *Saccharomyces cerevisiae*, and one of *Candida apicola*-like, *Kloeckera javanica*, *Pichia subpelliculosa* and *Schizosaccharomyces pombe*, all isolated from distilleries, each by time were inoculated to sugarcane juices. The fermented cane juice (wine) was distilled in a copper still with working capacity of thirty liters, obtaining

juice (wine) was distilled in a copper still with working capacity of thirty liters, obtaining approximately 4 to 6 liters of distilled beverage "cachaça" at 39% ethanol, v/v. The distillation temperature and velocity were standardized, as well the separation of a 5% initial head fraction. The non-*Saccharomyces* strains showed fermentation yields similar to *Saccharomyces*. The beverages were analyzed for ethanol, acetaldehyde, ethyl acetate, propanol, isobutanol and iso-amyl alcohol, as ethanol, volatile acidity and residual sugar in the fermented mash. Variations in the contents of the secondary components were found in the beverages, but did not represent statistically significant differences ($p \leq 0,05$) with respect to the sensory attributes of aroma, flavor and overall impression. Among all secondary compounds, only propanol showed positive correlation ($p \leq 0,05$) with the sensory attributes of taste and overall impression. Beverage from *S. pombe* presented very low secondary compounds, and obtained the lowest scores in the sensory analysis, being not suitable for *cachaça* production. The Hierarchical Cluster Analysis (HCA), related to the secondary compounds, separated the beverages into five groups. The Principal Component Analysis (PCA) showed that 93% of variation between the samples could be explained by the main axis (Principal Component 1) and the total volatile compounds, higher alcohols and iso-amyl alcohol contributed to a greater extent to the variability associate with this axis, and only 7% is associate with Principal Component 2 due mainly volatile acidity. The occurrence statistically significant negative correlation between all secondary compounds in the beverages and ethanol in fermented mash, except for acetaldehyde, is the result of the dilution effect of that compounds in a larger volume of distilled beverage, from mash containing higher ethanol content, concluding that the variation on ethanol content of fermented mash is an important factor in industrial process for standardization of ethanol/volatile rate and quality of *cachaça*. The results of volatile compounds in beverages correlated with volatile from the same yeast strains in synthetic medium laboratory experiment, showed that iso-amyl and higher alcohols correlated positively ($p \leq 0,1$), meaning that synthetic medium can be useful for screening purposes.

Key Words: alcoholic fermentation, sugarcane liquor, *cachaça*, volatile compounds, sensory analysis, yeast, *Saccharomyces*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*.

1. INTRODUÇÃO

A aguardente de cana, cachaça ou caninha é uma bebida alcoólica destilada tipicamente brasileira, com graduação alcóolica entre 38 a 54° GL, obtida pela fermentação do caldo de cana-de-açúcar. As expectativas de um aumento significativo nas exportações da aguardente de cana, para os próximos anos, deve-se a sua boa aceitação no exterior sendo considerada uma bebida saborosa e exótica. A previsão do setor para a próxima década é alcançar US\$ 100 milhões em divisas para o país. A aguardente de cana foi incluída em programas de exportação do governo como o PEE – Programa Especial para Exportação e PNPE – Programa dos Novos Pólos de Exportação e é apontada como a bebida do próximo século, em substituição ao rum e à tequila. O PBDAC – Programa Brasileiro de Desenvolvimento da Aguardente de Cana, Caninha ou Cachaça foi criado oficialmente em 1997 pela Associação Brasileira de Bebidas (ABRABE) e estimula a valorização e a qualidade dos métodos de produção da aguardente de cana (Pepe, 2000). Em Minas Gerais o aumento da produção de cachaça está sendo estimulado pelo Pró-Cachaça e pela Associação Mineira dos Produtores de Aguardente de Qualidade (Ampaq), que criaram um selo de qualidade para os produtores que integram a associação.

São vários os fatores que interferem na qualidade das bebidas alcoólicas destiladas, tais como a matéria-prima, a fermentação, o método de condução do processo fermentativo, a destilação, o envelhecimento etc. No entanto as leveduras e as condições de fermentação têm sido apontadas como os fatores que mais influenciam o sabor das bebidas alcoólicas, pois é durante a fermentação que a maioria dos compostos responsáveis pelo sabor é formada (Suomalainen & Lehtonen, 1979; Lehtonen & Jounela-Eriksson, 1983).

O sabor das bebidas alcoólicas é formado por inúmeros compostos orgânicos voláteis e não voláteis, que conferem às bebidas seu odor e gosto típico. Estes compostos podem ser divididos em vários grupos de acordo com sua natureza química. Álcoois superiores (óleo fúsel), ácidos graxos e ésteres formam quantitativa e qualitativamente os maiores grupos presentes nas bebidas alcoólicas, sendo os álcoois superiores os mais abundantes (Lehtonen & Jounela-Eriksson, 1983; Berry, 1995). Segundo Cole & Noble

(1995) o sabor em um sistema complexo, tal como das bebidas alcoólicas, não pode ser inferido com base em análises; com poucas exceções, o sabor perceptível é resultante de uma combinação de vários componentes, e não devido a um composto de “impacto”. Apesar das diferentes bebidas destiladas serem prontamente distinguidas uma das outras por suas características sensoriais, não se observa grande diferença na sua composição química. As diferenças mais importantes parecem estar relacionadas ao conteúdo quantitativo dos compostos do aroma (Suomalainen & Lehtonen, 1979).

Estudos em alimentos e bebidas, visando relacionar os componentes responsáveis pelo sabor com sua qualidade, são acompanhados com análise sensorial, que continua sendo ainda, a única forma de avaliar a aceitação desses produtos, realizada diretamente através da percepção humana (Stone & Sidel, 1998). Os testes sensoriais são incluídos como garantia de qualidade na indústria de alimentos e bebidas por representarem medida multidimensional integrada, com importantes vantagens, como: ser capaz de identificar a presença ou ausência de diferenças perceptíveis, definir características sensoriais importantes de um produto de forma rápida, ser capaz de detectar particularidades que não podem ser detectadas por outros procedimentos analíticos e ainda, ser capaz de avaliar a aceitação de produtos (Munoz et al., 1992).

A qualidade da aguardente de cana no Brasil é definida pelo Decreto Federal nº 2314 de 04/09/97, e pela Portaria nº 371 do Ministério da Agricultura, de 18/09/1974, que estabelece os seguintes padrões de identidade e qualidade: o teor alcoólico deve ser de 38 a 54 % v/v, a 20° C e o coeficiente de congêneres (aldeídos, ácidos, ésteres, furfural e álcoois superiores) não pode ser inferior a 200 mg/100 mL de álcool anidro, sendo os teores máximos (mg/100 mL de álcool anidro) de 150 para acidez volátil em ácido acético, 200 para ésteres em acetato de etila, 30 para aldeídos em aldeído acético, 5 para furfural e 300 para álcoois superiores. Qualitativamente, os principais componentes do sabor da aguardente são os mesmos, e encontrados nas demais bebidas alcoólicas (Maia, 1994).

Os trabalhos encontrados na literatura relativos a qualidade sensorial da aguardente de cana, se referem principalmente às aguardentes envelhecidas (Cardello & Faria, 1997; Cardello & Faria, 1998; Boscolo, 1996). Em relação às aguardentes recém-destiladas existem poucos trabalhos publicados relacionados com a sua qualidade sensorial, como o de Faria (1989) que estudou a influência do cobre na qualidade sensorial das aguardentes. Posteriormente Faria et al. (1993) supondo que o defeito organoléptico (odor desagradável), nas aguardentes destiladas na ausência de cobre estivesse relacionado com a presença de compostos sulfurados, realizaram estudo comparativo para relacionar resultados da análise sensorial com os teores de enxofre das aguardentes e verificaram haver preferência ($p < 0,01$) pelas amostras destiladas na presença de cobre. Furtado (1995) determinou as propriedades físico-químicas e estudou as características sensoriais do aroma e sabor de aguardentes recém-destiladas utilizando-se análise descritiva quantitativa.

Oliveira (2001) avaliou 24 linhagens de leveduras pertencentes às espécies *Saccharomyces cerevisiae* e 6 pertencentes a outros gêneros, isoladas de fermentações em produtores de aguardente de cana. As linhagens estudadas, em meio sintético, apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) em relação aos parâmetros fermentativos de Rendimento da fermentação, Eficiência de conversão de substrato em etanol, Y_p/s , Y_x/s , μ_{max} dentre outros e também em relação a formação dos principais compostos voláteis (acetaldeído, acetato de etila, propanol, isobutanol, álcool isoamílico, glicerol e ácido acético). A análise estatística multivariada mostrou que estas linhagens se separaram em diferentes agrupamentos de acordo com sua similaridade, em relação aos parâmetros fermentativos (o rendimento foi o parâmetro de maior impacto na diferenciação das linhagens) e em relação à formação de compostos voláteis (o ácido acético foi o componente de maior impacto). Visando dar continuidade a este estudo, foi planejado o presente trabalho a partir da seleção de 10 linhagens de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* pertencentes aos diferentes agrupamentos já citados, com o objetivo de estudar a influência das mesmas na composição e na qualidade sensorial da aguardente de cana recém-destilada, produzida em escala piloto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram produzidas aguardentes com diferentes linhagens de levedura, sendo 6 *Saccharomyces cerevisiae* e 4 não-*Saccharomyces*. Todas as linhagens utilizadas foram isoladas de produtores artesanais de aguardente de cana do Estado de Minas Gerais e selecionadas em trabalhos anteriores em função das suas características fermentativas e de formação de compostos voláteis em meio sintético (Oliveira, 2001). A maioria das linhagens foi proveniente da coleção da Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG: Sc3 (UFMG-A1605) *S. cerevisiae*; Sc4 (UFMG-A1667) *S. cerevisiae*; Sc6 (UFMG-A1676) *S. cerevisiae*; Sc8 (UFMG-A905) *S. cerevisiae*; Sc13 (UFMG-A1492) *S. cerevisiae*; Sc21 (UNICAMP-AV3) *S. cerevisiae*; Ca (UFMG-A972) *Candida apicola-like*; Kj (UFMG-A893) *Kloeckera javanica*; Ps (UFMG-A960) *Pichia subpelliculosa*; Sp (UFMG-A1113) *Schizosacharomyces pombe*. Nas aguardentes obtidas foram determinados o teor de compostos voláteis (acetaldeído, acetato de etila, propanol, isobutanol e álcool isoamílico) e a acidez volátil; no vinho foi determinado o teor alcoólico. Esses resultados foram submetidos a análise estatística de correlação entre si, e também entre os resultados de produção de compostos voláteis pelas mesmas leveduras em meio sintético obtidos em outro experimento (Oliveira, 2001). A Análise Exploratória multivariada de Agrupamento Hierárquico e Análise de Componentes Principais foram aplicadas para verificação da similaridade das aguardentes, segundo o teor dos diversos componentes voláteis que caracterizam cada uma (PIROUETTE, 1997).

As 10 amostras de aguardente foram submetidas à análise de aceitação através de testes sensoriais, utilizando-se escalas hedônicas de nove pontos (Stone & Sidel, 1993). Uma equipe de 41 provadores avaliou as amostras em relação ao aroma, sabor e impressão global. As avaliações foram feitas em cabines individuais, em laboratório de análise sensorial. As amostras foram servidas aos provadores em cálices de vidro incolor, transparentes, cobertos com vidro de relógio e codificados com algarismos de três dígitos. Todas as amostras foram apresentadas de forma monádica, num total de 10 sessões por provador. Com os dados coletados, foi realizada análise de variância (ANOVA) e aplicado o teste de Tukey para comparação das médias das amostras (SAS, 1993), bem como

verificada a distribuição normal das notas dadas pelos provadores em relação à escala hedônica utilizada.

Para o preparo do inóculo cada uma das linhagens mantida em “slants” em meio GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1%, NaH_2PO_4 0,2% e ágar 2%) foi assepticamente transferida para seis frascos de 250 mL contendo 100 mL de meio sintético estéril composto de: glicose 40 g/L; fosfato diácido de potássio 5,0 g/L; cloreto de amônio 5,0 g/L; sulfato de magnésio heptaidratado 1,0 g/L; cloreto de potássio 1,0 g/L; extrato de levedura 6,0 g/L, pH 6,0. Os frascos foram incubados à temperatura de 30° C, a 150 rpm por 24 horas. O conteúdo de cada frasco foi então assepticamente transferido para seis frascos de 2 L contendo 1.000 mL do mesmo meio de cultivo estéril, porém com 60 g/L de glicose, e incubados nas mesmas condições anteriores. A massa celular foi separada por centrifugação, ressuspensa em água destilada, lavada duas vezes, e usada como inóculo nas fermentações do caldo de cana em escala piloto.

O caldo da cana-de-açúcar foi extraído imediatamente após o seu corte, em moenda industrial de um terno; a moenda foi submetida a uma assepsia prévia. Antes da extração, a raiz e as pontas da cana foram excluídas, e a superfície dos colmos foi lavada com água potável. O caldo foi coado em tela para retenção do bagacilho, diluído com água potável para 15° Brix, e inoculado com uma suspensão de células suficiente para se obter em torno de 10^7 a 10^8 células/mL de caldo, com viabilidade celular de cerca de 99%. A partir de cada linhagem foi inoculado um volume de 30 litros de caldo, que fermentado e destilado deu origem às amostras de aguardente. Após a inoculação, o caldo foi homogeneizado e uma amostra coletada para análises de controle, como a determinação do teor de sólidos solúveis (°Brix), açúcares redutores totais (ART), contagem de células e viabilidade celular.

Foi realizada uma única fermentação com cada uma das leveduras, e os resultados foram submetidos a análise exploratória segundo a metodologia de Análise de Agrupamento Hierárquico (AAH) e Análise de Componentes Principais (ACP), utilizando-se como variáveis os teores dos compostos secundários presentes nas aguardentes

produzidas. As fermentações foram efetuadas em sistema de batelada simples, na planta piloto de Processamento do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP. As fermentações foram conduzidas em um tanque cilíndrico de aço inoxidável (diâmetro 50cm e altura 54 cm), com mosto a cerca de 32 ° C, em média. O final da fermentação foi determinado pela estabilização da leitura do °Brix, isto é com a leitura de dois valores iguais e consecutivos, em período de 1 hora entre as amostragens. O tempo médio das fermentações variou de 42 a 64 horas. Ao final das fermentações uma amostra do vinho foi coletada para a determinação do teor de etanol.

A destilação do caldo fermentado foi realizada em um alambique de cobre de capacidade útil de 30 litros, com condensador/resfriador, aquecido a gás; a temperatura do vinho foi controlada entre cerca de 91 a 97°C, para manter a vazão de destilado em torno de 1 litro/hora. A fração de cabeça foi coletada separadamente e de forma padronizada (volume fixo de 250 mL, correspondente a cerca de 5% do volume de aguardente), equalizando o tempo de destilação dos componentes da cabeça. A fração de coração foi coletada em seguida até se obter um grau alcóolico de cerca de 39 % v/v, a 20° C. As aguardentes foram então armazenadas, em garrafas de vidro com tampas e batoque de plástico, e armazenadas em local de temperatura ambiente mais amena e sem variações bruscas, para amostragem e análise sensorial posteriores.

A concentração de açúcares redutores totais no caldo de cana foi determinada pelo método do ácido 3,5 dinitrossalicílico-DNS (Miller, 1959) após hidrólise com ácido clorídrico. O etanol presente no caldo de cana fermentado (vinho) foi determinado pelo método espectrofotométrico do dicromato de potássio modificado.(Salik & Povoh,1993). A contagem de células e sua viabilidade celular foram determinadas utilizando-se um microscópio ótico com câmara de Neubauer e corante eritrosina, segundo Bonneu et al. (1991). Os compostos secundários presentes nas aguardentes foram determinados por cromatografia gasosa

Para a determinação da acidez volátil as amostras de aguardente foram previamente destiladas por arraste de vapor em Destilador Enochimico Gibertini, e tituladas com NaOH

0,1 N e fenolftaleína como indicador. A determinação do grau alcoólico foi realizada em Densímetro A. PAAR, modelo DMA 48.

A determinação do acetaldeído, acetato de etila, propanol, isobutanol e álcool isoamílico, foram realizadas em cromatógrafo a gás Shimadzu modelo GC-17-A, com auto injetor, detector de ionização de chama, e coluna cromatográfica capilar DB-WAX (30m x 0,25mm x 0,25µm). As análises foram conduzidas nas seguintes condições: temperatura do injetor foi de 180°C e do detector de 190°C; programação de temperatura da coluna foi: 40°C (5min), 20°C/min até 120°C (1min), 30°C/min até 180°C (1min), tempo total da corrida de 13 minutos; gás de arraste utilizado foi o nitrogênio e o ar; injeções com divisão de fluxo (split) de 1:15; volume de amostra injetado de 1,0 µL. Os compostos foram quantificados com técnica de padrão externo; os padrões foram preparados em solução de etanol a 40% v/v.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra o teor de etanol no vinho e o rendimento das fermentações em caldo de cana, para obtenção das aguardentes em escala piloto, e também os resultados obtidos por Oliveira (2001) em meio sintético, com frascos agitados. As linhagens de *S. cerevisiae* e *P. subpelliculosa* apresentaram rendimentos mais baixos nas fermentações do caldo de cana em escala piloto, do que em meio sintético. Ao contrário, as leveduras não-*Saccharomyces* (*Candida*, *Kloeckera* e *Schizosaccharomyces*) apresentaram maiores rendimentos nas fermentações em caldo de cana, certamente devido à presença de nutrientes que favoreceram a atividade dessas leveduras, ou também ao menor teor em oxigênio dissolvido (sem agitação).

As linhagens *S. cerevisiae* apresentaram correlação positiva ($r = +0,81$, $p \leq 0,1$) entre os rendimentos das fermentações em escala piloto em caldo de cana e em meio sintético, validando o uso do meio sintético para caracterização e triagem de linhagens de

Saccharomyces (Figura 1); resultado especialmente importante uma vez que é difícil trabalhar com condições padronizadas de composição do caldo de cana. Os rendimentos das fermentações em caldo de cana variaram entre 58,0% (Sc21) e 84,8% (Sp). A linhagem de *S. pombe* foi a que apresentou rendimento mais elevado (84,8%) em caldo de cana dentre as linhagens estudadas. Resultado semelhante foi obtido por Fahrasmane et al. (1986) que obtiveram rendimentos de 79 e 85% com *S. cerevisiae* e *S. pombe*, respectivamente, em caldo de cana. Cleto (1997) obteve rendimentos em fermentações conduzidas em caldo de cana com linhagens de leveduras *S. cerevisiae* isoladas de fermento de panificação, de apenas 54,20 a 55,95%. Novaes (1995) relata que o rendimento da produção de álcool na maioria das destilarias de aguardente varia de 60 a 75% em relação aos açúcares existentes no mosto. As diferenças observadas nos rendimentos nas fermentações em caldo de cana e em meio sintético, podem ser devidas não só às diferenças na composição dos meios, mas também na maneira de conduzir as fermentações. As fermentações em meio sintético foram conduzidas em condições padronizadas de temperatura e pH, em frascos de 250 mL com agitação, enquanto as fermentações do caldo de cana foram efetuadas em escala piloto, sem agitação e sem controle de temperatura.

TABELA 1 - Etanol no vinho e Rendimento da fermentação em caldo de cana e em meio sintético*.

Linhagens	Caldo de Cana		Meio sintético*	
	Etanol (v/v)	Rendimento (%)	Etanol (v/v)	Rendimento (%)
<i>S. cerevisiae</i>				
Sc3	7,9	76,4	7,9	84,1
Sc4	7,2	69,4	7,8	83,9
Sc6	7,1	68,2	8,0	86,7
Sc8	8,2	77,1	8,3	90,5
Sc13	7,1	66,1	7,6	85,4
Sc21	6,1	58,0	6,2	71,2
<i>não-Saccharomyces</i>				
Ca	6,7	66,0	4,5	51,6
Kj	7,3	73,3	5,9	68,3
Ps	7,1	69,1	7,4	84,5
Sp	9,0	84,8	5,6	64,7

* (Oliveira , 2001)

Foram observadas diversas correlações (Figura 2) entre o teor de etanol no vinho das fermentações em caldo de cana e as concentrações de compostos secundários (mg/100 mL álcool anidro) nas respectivas aguardentes. O teor de etanol apresentou correlação negativa com a acidez, acetato de etila, propanol, isobutanol, álcool isoamílico, e ainda com a somatória dos álcoois superiores e compostos voláteis totais. Estas correlações demonstram a importância do teor alcoólico do vinho sobre a concentração dos compostos secundários nas aguardentes. Isto é, quanto maior o teor alcoólico do vinho, maior volume de aguardente será obtida com determinada graduação alcoólica e desta forma os componentes secundários presentes no vinho sofrerão um efeito de diluição; este resultado mostra que a variação no teor alcoólico do vinho é um fator importante no processo industrial, para padronização da relação etanol/voláteis e da qualidade das bebidas comercializadas.

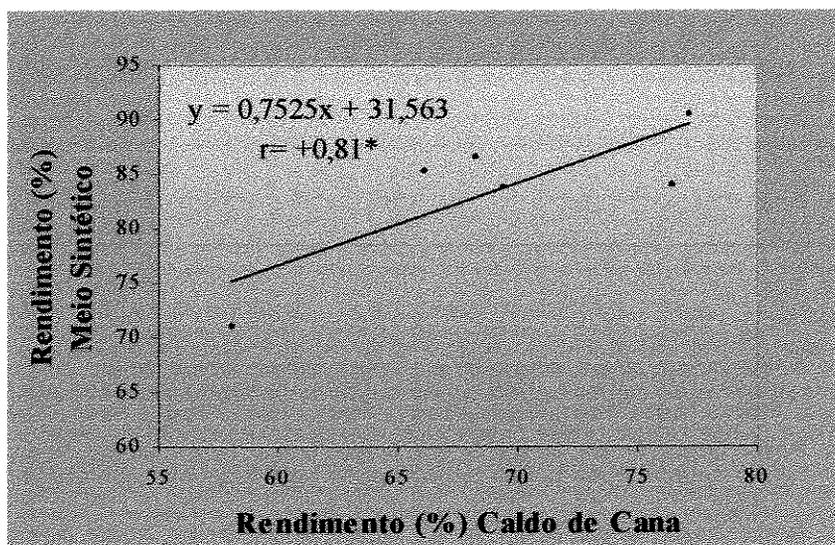


FIGURA 1 - Equação e Coeficiente de correlação (r) entre o Rendimento das fermentações em caldo de cana e em meio sintético para as linhagens *S. cerevisiae*, significativo a 10% (*).

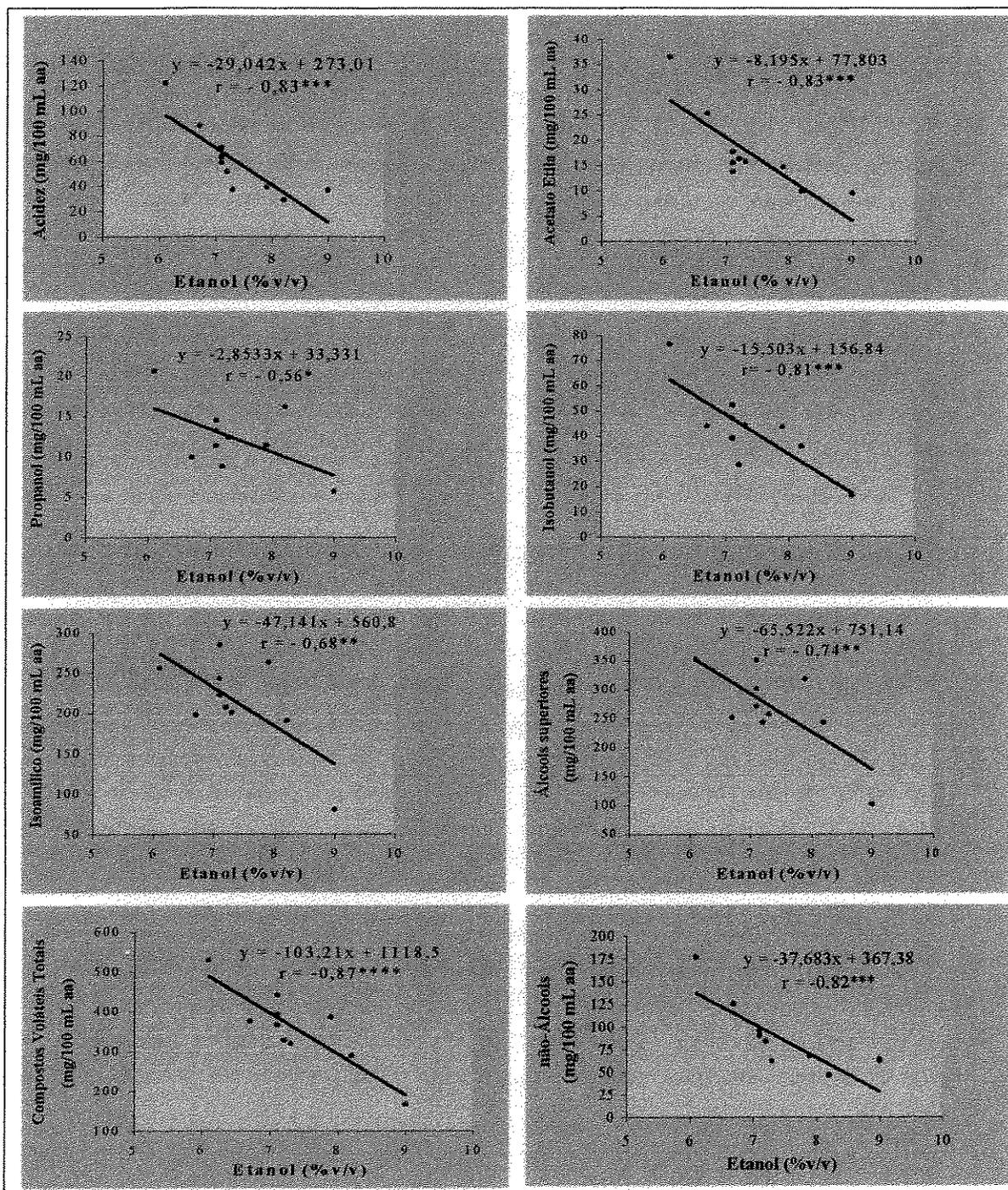


FIGURA 2 - Equações e Coeficientes de Correlação (r) entre o teor de etanol no vinho de caldo de cana e os diversos compostos secundários nas aguardentes, com significância a 0.1% (****), 1% (***), 5% (**) e 10% (*).

Foram também realizadas análises de correlação entre as concentrações dos compostos voláteis presentes nas aguardentes e as concentrações dos mesmos compostos no vinho das fermentações conduzidas em meio sintético (Oliveira, 2001). Verificaram-se correlações positivas entre os álcoois isoamílicos e entre os álcoois superiores totais (Figura 3), mostrando que para o mais abundante grupo de voláteis presentes na aguardente de cana observa-se transposição dos resultados permitindo o uso de meios sintéticos para padronizar a caracterização e triagem de leveduras com relação à presença daqueles componentes na aguardente. Não foram observadas correlações com os produtos de cabeça, acetaldeído e acetato de etila. Para estes compostos a ausência de correlação pode ser explicada pela separação da fração de cabeça durante a destilação (cerca de 5% do volume total de aguardente). A falta de correlação com a acidez também pode ser explicada pelo fato dos ácidos serem compostos que começam a destilar a partir da metade da fração coração, principalmente na fração cauda (Leauté, 1990; Londoño, 1995).

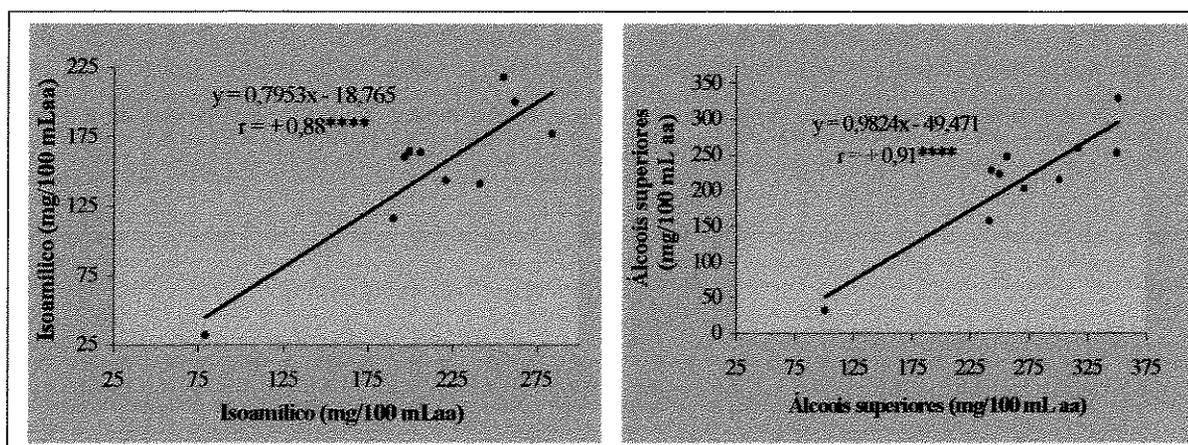


FIGURA 3 - Equações e Coeficientes de Correlação (r) para as taxas de produção de álcool isoamílico e para álcoois superiores, entre os seus resultados na aguardente de cana e no vinho de meio sintético (Oliveira, 2001), com significância a 0,1%(****).

A Tabela 2 apresenta os resultados das análises dos compostos voláteis das aguardentes de cana. O grau alcoólico (% em volume) das aguardentes variou de 38,4 a 39,9; a acidez volátil de 28,4 a 121,4; acetaldeído de 7,4 a 18,2; acetato de etila 9,4 a 36,5;

propanol de 5,6 a 20,5; isobutanol de 16,2 a 76,2; álcool isoamílico de 79,4 a 283,8; álcoois superiores de 101,1 a 351,6; e componentes voláteis totais de 164,0 a 527,7 mg/100 mL de álcool anidro (aa).

Vargas (1995) analisou 683 laudos de análise de aguardente engarrafada e/ou comercializada no Estado de Minas Gerais, emitidos pelo Laboratório Vegetal do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária de Minas Gerais no período de 1989 a 1994 e verificou que os parâmetros de identidade e qualidade apresentavam altos coeficientes de variação (CV), indicando que tais parâmetros são variáveis instáveis, com exceção do grau alcoólico. Os álcoois superiores apresentaram valor médio de 187 mg/100 mL de álcool anidro(aa), com valores mínimo e máximo de 6 e 490. O valor médio encontrado para a acidez volátil foi de 118 mg/100 mL aa, variando de nd a 587. O valor médio encontrado para ésteres foi de 87 mg/100 mL aa e os valores variaram de 2 a 484. Para os aldeídos o valor médio foi de 13,3 mg/100 mL aa, com faixa de variação de 1 a 282. O valor médio encontrado para os componentes voláteis totais foi de 391 mg/100 mL aa e variou de 66 a 1.060.

A aguardente fermentada com a linhagem Sc21 foi a que apresentou as maiores concentrações de todos os compostos voláteis analisados, excetuando-se o álcool isoamílico que foi maior na aguardente produzida com a linhagem Sc6 (283,8 mg/100 mL aa). As aguardentes obtidas com as linhagens *Candida apicola*-like, *Kloeckera javanica* e *Pichia subpelliculosa* apresentaram todos os compostos voláteis dentro dos limites exigidos pela legislação brasileira. A aguardente produzida com a linhagem de *S. pombe* apresentou as menores quantidades de n-propanol, isobutanol e álcool isoamílico e conseqüentemente de álcoois superiores, tendo também apresentado uma quantidade total de componentes voláteis muito baixa (164,0 mg/100 mL aa), valor inferior ao mínimo exigido pela legislação brasileira que é de 200 mg/100 mL aa. Fährasmane et al. (1986) compararam duas linhagens de levedura quanto à produção de álcoois superiores, sendo uma *S. cerevisiae* e a outra *S. pombe*, e também encontraram que a linhagem de *S. pombe* produziu muito menos álcoois superiores do que a *S. cerevisiae*. Parfait & Jouret (1975) relataram também que *S. pombe* produz relativamente pouca quantidade de álcoois superiores. Os

TABELA 2 - Teor alcoólico (% v/v) e compostos voláteis (mg/100 mL álcool anidro) nas aguardentes obtidas com as diferentes linhagens de leveduras.

Linhagens	°GL ¹	AcVol ²	Actald ³	AcEtil ⁴	NAlc ⁵	Prop ⁶	Isob ⁷	Isoam ⁸	AlSup ⁹	CVT ¹⁰	AlSup ¹¹ NAIc	Prop ¹² Isob	Isoam ¹³ Isob
Saccharomyces													
Sc3	39,2	38,52	14,39	14,53	67,44	11,36	43,44	261,83	316,63	384,07	4,69	0,26	6,03
Sc4	39,0	50,82	16,31	16,28	83,41	8,64	28,43	206,01	243,08	326,49	2,91	0,30	7,25
Sc6	39,0	57,99	14,11	17,64	89,74	14,39	52,03	283,75	350,16	439,91	3,90	0,28	5,45
Sc8	39,9	28,39	7,36	9,77	45,552	16,05	35,74	189,79	241,58	287,10	5,30	0,45	5,31
Sc13	38,4	62,30	12,49	15,41	90,20	13,10	46,70	241,20	301,00	391,20	3,34	0,28	5,17
Sc21	38,8	121,42	18,16	36,49	176,07	20,52	76,19	254,92	351,62	527,69	2,00	0,27	3,35
não-Saccharomyces													
Ca	38,9	87,32	12,04	25,24	124,6	9,84	43,88	196,53	250,25	374,85	2,01	0,22	4,48
Kj	38,4	36,90	9,33	15,66	61,89	12,27	44,33	199,38	255,98	317,87	4,14	0,28	4,50
Ps	39,1	70,01	11,10	13,69	94,80	11,24	38,91	220,85	271,00	365,80	2,86	0,29	5,68
Sp	39,2	36,07	17,39	9,35	62,81	5,61	16,24	79,39	101,14	163,95	1,61	0,35	4,89

¹ Grau alcoólico (% v/v); ² Acidez volátil em ácido acético; ³ Acetaldeído; ⁴ Acetato de Etila; ⁵ não-Alcoois (Σ 2,3 e 4); ⁶ propanol; ⁷ Isobutanol; ⁸ Alcool Isoamílico; ⁹ Alcoois superiores; ¹⁰ Compostos Voláteis Totais; ¹¹ Alcoois Superiores/não-Alcoois; ¹² propanol/Isobutanol; ¹³ Alcool Isoamílico/Isobutanol.

baixos teores de acetaldeído e acetato de etila encontrados nas aguardentes podem ser explicados pela separação da fração de cabeça durante a destilação, que contém os compostos mais voláteis.

Todas as aguardentes apresentaram a maioria dos compostos dentro dos limites exigidos pela legislação, com exceção dos álcoois superiores nas aguardentes obtidas com as linhagens Sc3, Sc6, Sc13 e Sc21, que excederam o limite máximo exigido pela legislação (300 mg/100 mL álcool anidro). Segundo Simpson (1971), a destilação conduzida em alambiques proporciona uma maior concentração de compostos voláteis nos destilados e de sabores pesados “heavy flavours”, por não permitir a separação fracionada dos voláteis de forma eficaz como ocorre nos destiladores contínuos. O sistema de destilação exerce um grande efeito no sabor das bebidas alcoólicas, especialmente na sua composição quantitativa (Lehtonen & Jounela-Eriksson, 1983).

Os compostos voláteis presentes nas aguardentes mostraram diversas correlações (Tabela 3) que, no conjunto, mostram a interdependência das variáveis, com exceção apenas para o acetaldeído, que como já foi dito, tem uma porção significativa eliminada pela separação da fração de cabeça na destilação. Os álcoois superiores comportam-se como produtos híbridos, isto é, numa destilação intermitente dependendo do estágio da mesma, é variável a riqueza alcoólica do líquido gerador, dos vapores e dos seus condensados, ao longo da coluna; assim, a riqueza em álcoois superiores nos vapores pode ser maior ou menor que da solução geradora. No caso de álcoois superiores em geral, o coeficiente K' de Barbet é maior que a unidade em concentrações superiores a cerca de 40% de álcool em volume, quando então essas impurezas comportam-se como de cauda, sendo menos ricas nos vapores gerados; teores alcoólicos acima de 40% ocorrem ao longo do capitel nos alambiques, onde se sucedem a condensação e vaporização. Com o decorrer da destilação, retirada do álcool e empobrecimento do mesmo no interior do alambique, os álcoois superiores passam a ter um K' maior que a unidade e apresentar vapores mais ricos nesses compostos que a solução geradora, destilando ou migrando para o destilado em maiores proporções. Portanto, os álcoois superiores comportam-se como produtos de cauda, uma vez que passam a ter maior proporção nos vapores apenas a partir de determinado

ponto da destilação, geralmente da metade da fração coração em diante. Diferentemente, os produtos de cabeça deixam totalmente o alambique já na fração de cabeça e não são encontrados no líquido gerador ao final da fermentação. Os produtos de cabeça não são encontrados na fração de cauda, mas os de cauda são arrastados e encontrados em todas as frações de destilados. O coeficiente de purificação K' de Barbet corresponde à razão entre a porcentagem da impureza em álcool absoluto no vapor e a porcentagem da mesma contida no álcool absoluto do líquido gerador. O coeficiente K' de Barbet é mais interessante que o coeficiente K de Sorel (solubilidade da impureza no líquido gerador) porque mostra o verdadeiro andamento da purificação do álcool. Meloni (1958) expõe e apresenta valores do coeficiente K' , que permitem verificar que o valor de K' para o álcool isoamílico é menor que o de outros componentes apresentados, e entender a razão de outras impurezas se esgotarem antes no líquido gerador e assim serem tipicamente de cabeça, mesmo porque estão presentes em quantidades bastante inferiores às de álcoois superiores em geral, além de ter ponto de ebulição inferior ao do etanol. Quanto ao ácido acético, o mesmo destila em maior proporção da metade da fração de coração em diante. E, como as amostras foram obtidas a uma média entre 38 e 39% de álcool, grande quantidade da fração cauda incorporou-se ao coração, apresentando, assim, um teor razoável de acidez; portanto, é justificável que o ácido acético e álcoois superiores apresentem correlação positiva. As correlações apontam para um modelo geral em que a formação do ácido acético ocorre proporcionalmente com a de álcoois superiores, como metabólitos da fermentação; por outro lado, como produtos de cauda são destilados também concomitantemente e assim mantêm uma correlação positiva. Nota-se também um conjunto específico de correlações envolvendo os álcoois superiores, mostrando a total inter-relação entre os álcoois individuais, a sua somatória (álcoois superiores) e os compostos voláteis totais dos quais são componentes expressivos. Outro conjunto específico de correlações envolve a dependência entre o ácido acético, o acetato de etila, os componentes não-álcoois, e os compostos voláteis totais; certamente à medida que aumenta o teor de ácido acético aumenta a reação de esterificação com o etanol, com aumento do teor de acetato de etila; o maior teor de ácido acético está, também, vinculado ao aumento dos não-álcoois e voláteis totais, uma vez que é um componente expressivo dessas frações. Ou seja, o aumento dos voláteis totais na aguardente, em ordem decrescente de importância relativa, em geral é

dependente dos álcoois superiores (álcool isoamílico, isobutílico e propanol), do ácido acético e do acetato de etila. O álcool isoamílico respondeu por cerca de 60 a 68% dos voláteis totais. Vargas (1995) também observou correlações entre os componentes voláteis totais, com ésteres ($r=+0,77$) e acidez volátil ($r=+0,74$), e também entre a acidez volátil e ésteres ($r=+0,66$), em cerca de 580 amostras de aguardentes analisadas.

TABELA 3 - Correlação entre os diversos compostos voláteis nas aguardentes obtidas com as diferentes leveduras

Coeficientes de Correlação								
	AcEtil	HAc	N-Alc	Prop	Isob	Isoam	Al Sup	Cvt
AcEtil				0,58 *	0,828 ***			
HAc	0,921 ****				0,744 **	0,619 *		
N-Alc	0,950 ****	0,992 ****			0,751 **			
Prop					0,866 ***	0,635 **	0,744 **	0,749 **
Isob						0,746 **	0,852 ***	0,934 ****
Isoam							0,984 ****	0,883 ****
Al Sup								0,939 ****
Cvt	0,784 ***	0,75 **	0,752 **					

significância a 0,1 (****) 1%(***), 5% (**) e 10% (*)

A relação entre álcoois superiores /não-álcoois nas aguardentes obtidas (Tabela 2) com as 10 linhagens de leveduras estudadas, variou de 1,6 a 5,3, com média de 3,3. Sendo que a linhagem *S. Pombe* (Sp) apresentou o valor mais baixo e a linhagem *S. cerevisiae* (Sc8) o valor mais alto. Essa relação pode ser usada para monitorar a destilação na separação da fração de cabeça, de modo a se obter uma relação adequada; para as leveduras *Saccharomyces* a média foi de 3,69. A análise sensorial (Tabela 4) atribuiu uma menor aceitação para a aguardente fermentada com a linhagem *S. pombe* que também apresentou baixo valor para a relação álcoois superiores/não-álcoois. A relação propanol/isobutanol

nas aguardentes variou de 0,22 a 0,45, com média de 0,30 e sendo uma relação indicativa da diferenciação de bebidas, sendo que a linhagem Sc8 produziu aguardente com a relação mais alta (0,45), bastante diferenciada das demais. Este índice foi usado por Singer (1966) para a diferenciação de diferentes bebidas alcoólicas, que determinou ser esta relação em média de 0,40 em conhaques e 0,42 em uísques. A relação álcool isoamílico/isobutanol variou de 3,35 a 7,25, com média de 5,21. Singer (1966) já havia determinado que as relações entre álcool isoamílico/isobutanol eram em média de 2,86 em conhaques e de 1,09 em uísques, bastante inferiores aos valores encontrados para as aguardentes de cana, neste trabalho.

O dendrograma (Figura 4), com os resultados da Análise de Agrupamento Hierárquica, mostra a similaridade observada entre as amostras de aguardente, segundo as variáveis acetaldeído, acetato de etila, acidez volátil, propanol, isobutanol, álcool isoamílico, álcoois superiores e compostos voláteis totais. As aguardentes formaram 5 grupos distintos, com similaridade de 0,76. A escala variando de 0,0 a 1,0 representa os índices de similaridade. Pode ser observado que as aguardentes que mais se diferenciaram foram a Sp e Sc21, que apresentaram as mais reduzidas relações álcool isoamílico/isobutanol, de 1,61 e 2,00, respectivamente. As aguardentes obtidas com leveduras *Saccharomyces* dividiram-se em 3 grupos com baixa similaridade entre si, mostrando que linhagens de *S. cerevisiae* podem originar aguardentes com composição diferenciada em compostos voláteis.

A Análise de Componentes Principais (Figuras 5 e 6) mostrou que 92,9% da variação ocorrida entre as amostras foi explicada pelo primeiro eixo (Componente Principal 1) e somente 6,7% foi explicada pelo segundo eixo (Componente Principal 2). Os Componentes Principais 1 e 2 explicaram juntos 99,6% da variação ocorrida entre as amostras. Quando as Figuras 5 e 6 são comparadas entre si, observa-se que a variabilidade das amostras associada ao primeiro eixo (CP 1) foi devida aos compostos voláteis individuais e aos compostos secundários totais, com exceção do álcool isoamílico que praticamente não interferiu; a acidez volátil foi a variável de maior peso na CP 2.

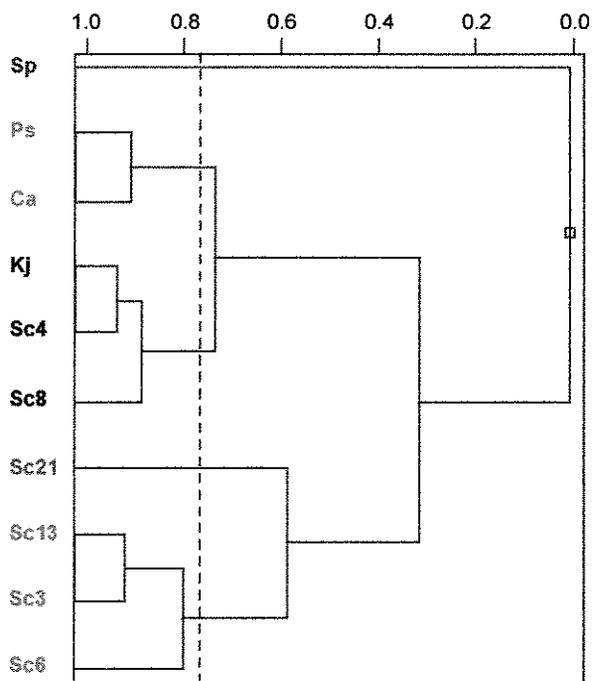


FIGURA 4. Dendrograma obtido para as 10 aguardentes em função do seus teores em compostos secundários.

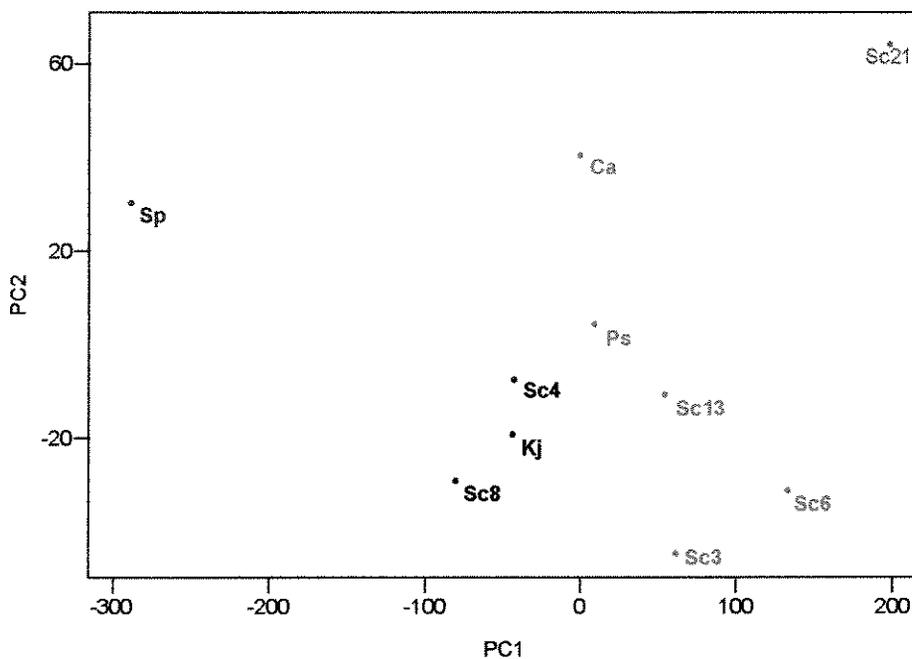


FIGURA 5 - Gráfico de *Scores* (CP1 versus CP2) das aguardentes obtidas com cada uma das leveduras.

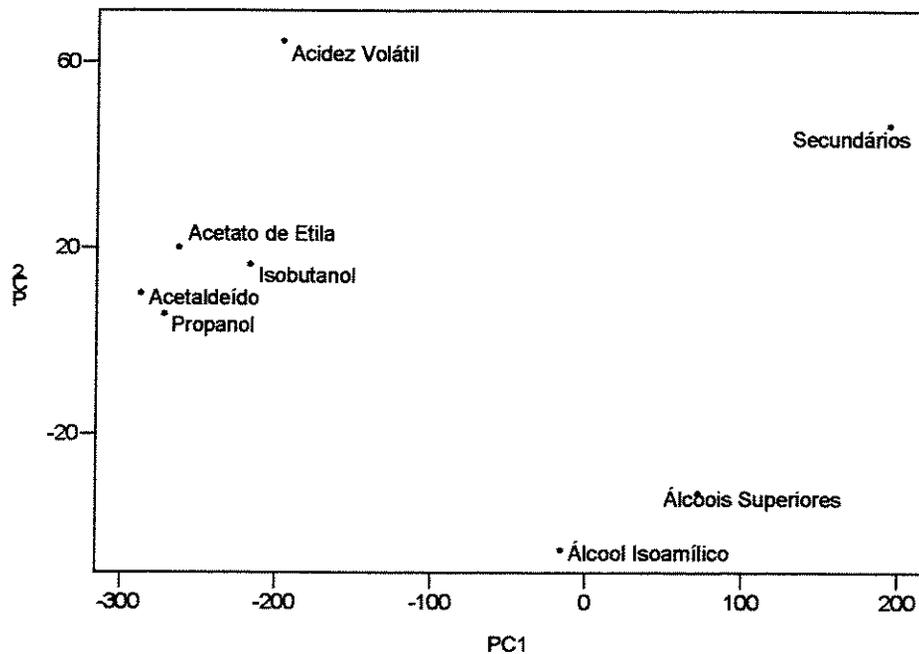


FIGURA 6 - Gráfico de *loadings* (CP1 versus CP2) dos componentes secundários das aguardentes.

As amostras ficaram bem distintas umas das outras, marcadas por localizações bem definidas de cada uma na figura 5. A linhagem de *S. pombe* produziu uma aguardente bastante distinta das demais principalmente por apresentar baixos teores de álcoois superiores e compostos voláteis; a aguardente fermentada com a linhagem Sc21 se localiza do lado oposto da linhagem Sp, por apresentar altos teores de compostos voláteis. Oliveira (2001) trabalhando com essas mesmas leveduras, em meio sintético, verificou que a Sc21 e a Sp também formaram teores de compostos voláteis altos e baixos, respectivamente.

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados das médias dos atributos sensoriais obtidos no teste de aceitação. As aguardentes não diferiram entre si em relação ao aroma, sabor e impressão global ($p \leq 0,05$). Somente a amostra fermentada com a linhagem de *S. pombe* (Sp) diferiu estatisticamente em relação ao aroma da amostra Sc8 ($p \leq 0,05$). Este resultado é particularmente expressivo, considerando-se os resultados analíticos que apontam a não adequação da *S. pombe* para a produção de aguardente. Apesar das aguardentes não diferirem estatisticamente entre si observa-se que a aguardente obtida com

a linhagem Sc8 de *S. cerevisiae* obteve as maiores notas para todos os atributos, enquanto a aguardente fermentada com a linhagem *S. pombe* (Sp) obteve as notas mais baixas em todos os atributos. As aguardentes fermentadas com as linhagens de *Candida*, *Kloeckera* e *Pichia* não diferiram estatisticamente ($p \leq 0,05$) em relação ao aroma, sabor e impressão global das amostras fermentadas com linhagens de *S. cerevisiae*. Portanto as aguardentes produzidas com estas leveduras tiveram aceitação comparável às obtidas com as linhagens *S. cerevisiae*.

Todas as aguardentes tiveram boa aceitação, sempre acima do conceito gostei ligeiramente dentro deste grupo de provadores, com exceção da amostra Sp que obteve as notas entre gostei ligeiramente (6) e nem gostei nem desgostei (5), certamente em função dos baixos teores de compostos voláteis formados por esta levedura, como já comentado anteriormente. Quanto às outras aguardentes, apesar de diferirem nas quantidades e proporções de compostos voláteis, estas variações não influíram na aceitação das mesmas. Como as linhagens não-*Sacharomyces* são frequentemente encontradas nas fermentações para produção de aguardente de cana, fica evidente que as mesmas não devem influir expressivamente na qualidade da aguardente e tampouco parecem formar compostos que afetam a qualidade sensorial das aguardentes. No vinho de caldo de cana fermentado com *S. pombe* foi facilmente sentido um odor desagradável, lembrando compostos sulfurosos; entretanto a aguardente não incorporou esse odor, provavelmente devido ao cobre do alambique (Faria, 1989; 1993).

TABELA 4 - Médias das notas atribuídas às aguardentes no Teste de Aceitação para os atributos Aroma, Sabor e Impressão global.

Aguardentes	Atributos Sensoriais		
	Aroma	Sabor	I. Global
<i>Saccharomyces</i>			
Sc3	6,54 ^{ab}	5,78 ^a	6,10 ^a
Sc4	6,76 ^{ab}	5,90 ^a	6,27 ^a
Sc6	6,66 ^{ab}	5,95 ^a	6,29 ^a
Sc8	6,93 ^a	6,56 ^a	6,71 ^a
Sc13	6,27 ^{ab}	6,00 ^a	6,12 ^a
Sc21	6,56 ^{ab}	6,24 ^a	6,59 ^a
não-			
Ca	6,71 ^{ab}	6,00 ^a	6,24 ^a
Kj	6,46 ^{ab}	6,00 ^a	6,27 ^a
Ps	6,59 ^{ab}	6,02 ^a	6,29 ^a
Sp	5,66 ^b	5,56 ^a	5,76 ^a
DMS	1,13	1,23	1,13

DMS =Diferença mínima significativa entre as médias de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Entre os compostos quantificados nas aguardentes verificou-se que apenas o propanol apresentou correlação estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) com os atributos de sabor ($r = +0,76$) e de impressão global ($r = +0,81$). Estes resultados são contrários aos relatados por Boza & Horii (1998) que constataram que o teor de propanol influe negativamente na qualidade sensorial das aguardentes. Almeida & Barreto (1971) relataram a ocorrência de teores muito elevados de propanol (55 a 65 mg/100 mL de amostra) em aguardentes de qualidade inferior, valores estes bem acima dos encontrados neste trabalho que ficaram entre de 5,6 a 20,5 mg/100 mL de álcool anidro. Ribeiro (1997) avaliou também as características físico-químicas e sensoriais de três aguardentes fermentadas por três diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e concluiu ser difícil correlacionar a constituição da aguardente com a sua qualidade sensorial, sugerindo a ampliação de estudos nesta direção. Giudici et al. (1993) demonstraram que existe uma estreita relação entre a produção de elevadas quantidades de propanol e a incapacidade das leveduras produzirem sulfeto de hidrogênio. Em várias linhagens de leveduras testadas por estes autores, foi

observada uma correlação inversa entre a quantidade de propanol formado e a capacidade de formar sulfeto de hidrogênio.

4. CONCLUSÕES

As aguardentes produzidas pelas diferentes linhagens de leveduras apresentaram variações nos teores e nas relações entre os principais compostos voláteis, mas estas não resultaram em diferenças perceptíveis em relação ao aroma, sabor e impressão global das aguardentes. A aguardente produzida pela *S. pombe* foi exceção, apresentando atributo de aroma inferior em relação a uma linhagem de *Saccharomyces* que mostrou tendência para melhores atributos. Isto indica que as leveduras não-*Saccharomyces* estudadas, presentes nas fermentações artesanais de caldo de cana, não exercem influência negativa sobre a qualidade sensorial da aguardente.

Dos compostos quantificados nas aguardentes, apenas o n-propanol apresentou correlação positiva estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) com os resultados da análise sensorial, nos testes de aceitação de sabor e impressão global.

A Análise Exploratória de Agrupamento Hierárquico, em função dos compostos voláteis determinados, mostrou a separação das aguardentes em 5 grupos e a Análise de Componentes Principais mostrou que a variação ocorrida entre as amostras foi devida a todos os compostos voláteis individuais, com exceção do álcool isoamílico, e aos compostos secundários totais. A constatação de uma relação inversa entre os compostos voláteis presentes na aguardente e o teor de etanol do vinho, com exceção do acetaldeído, é resultado do efeito de diluição dos componentes secundários no maior volume de aguardente destilada, e mostra que a variação no teor alcoólico do vinho é um fator importante a ser considerado no processo industrial, para padronização da relação etanol/voláteis e da qualidade das bebidas comercializadas. Os resultados obtidos nas aguardentes foram ainda comparados com a produção de voláteis de outro experimento,

com as mesmas linhagens de levedura, em meio sintético, sendo observado que os álcoois superiores determinados, na aguardente e no meio sintético, apresentaram correlação positiva, assim como o álcool isoamílico, mostrando que para o mais abundante grupo de voláteis presente na aguardente há uma transposição dos resultados permitindo portanto o uso de meios sintéticos para padronizar a caracterização e triagem de leveduras com relação àqueles componentes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, M. E. W., BARRETO, H. H. C. Álcoois superiores em aguardente de cana por cromatografia gasosa. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 31, p. 117-123, 1971.
2. BERRY, D.R. Alcoholic beverage fermentations. In: LEA, A.G.H.; PIGGOTT, J.R. **Fermented Beverage Production**. 1 ed. London: Blackie Academic & Professional, 1995. cap. 2, p. 32-44.
3. BONNEU, M.; CROUZET, M.; URDACI, M.; AIGLE, M. Direct selection of yeast mutants with reduced viability on plates by erythrosine B.stainining. **Analytical Biochemistry**, V.193, p. 225-230, 1991.
4. BOSCOLO, M. **Estudo sobre envelhecimento de aguardente de cana-de-açúcar**. São Carlos, 1996. 83p. Tese (Mestre em Ciências-Química Analítica)-Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
5. BOZA, Y. ; HORII, J. Influência da destilação sobre a composição e a qualidade sensorial da aguardente de cana-de-açúcar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v.18, n.4, p. 391-396, 1998.

6. BRASIL Decreto nº 2.314 do Ministério da Agricultura de 04 de setembro de 1997. Dispõe sobre o registro, classificação, padronização, produção e fiscalização das bebidas. **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 de set. 1997.
7. CARDELLO, H.M.A.B.; FARIA, J.B. Modificações físico-químicas e sensoriais de aguardente de cana durante o envelhecimento em tonel de carvalho (*Quercus alba* L.). **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 15, n.2, p. 87-100, 1997.
8. CARDELLO, H.M.A.B.; FARIA, J.B. Análise descritiva quantitativa da aguardente de cana durante o envelhecimento em tonel de carvalho (*Quercus alba* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.18, n.2, p. 169-175, mai./jul., 1998.
9. CLETO, F.V.G. **Influência da adição de ácido sulfúrico e fubá de milho no processo fermentativo, rendimento e composição da aguardente de cana.** Jaboticabal, 1997. 109p. Tese (Mestre em Agronomia-Área de concentração em produção vegetal)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal-UNESP.
10. COLE, V.C.; NOBLE, A.C. Flavor chemistry and assessment. In: LEA, A.G.H.; PIGGOTT, J.R. **Fermented Beverage Production.** 1ed. London: Blackie Academic & Professional, 1995, cap. 14, p. 361-385
11. FAHRASMANE, L.; PARFAIT, A.; GALZY, P. Propriétés fermentaires des levures de rhumerie. **Industries Alimentaires Agricoles**, Paris, v.103, n.3, p. 125-127, 1986.
12. FARIA, J.B. **A influência do cobre na qualidade das aguardentes de cana (*Saccharum officinarum*, L.).** São Paulo, 1989. 88p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

13. FARIA, J.B.; DELIZA, R.; ROSSI, E.A. Compostos sulfurados e a qualidade das aguardentes de cana (*Saccharum officinarum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v.13, n.1, p. 89-93, 1993.
14. FURTADO, S.M.B. **Avaliação sensorial descritiva de aguardente de cana. Influência da composição em suas características sensoriais e correlação entre as medidas sensoriais e físico-químicas.** Campinas, 1995. 99p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
15. GIUDICI, P.; ZAMBONELLI, C; KUNKEE, R.E. Increased production of n-propanol in wine by yeast strains having an impaired ability to form hydrogen sulfide. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.44, n.1, p. 17-21, 1993.
16. LÉAUTÉ, R. Distillation in alambic. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 41, n. 1, p. 90-103, 1990.
17. LEHTONEN, M. & JOUNELA-ERIKSSON, P. Volatile and non-volatile compounds in the flavour of alcoholic beverages. In: PIGGOTT, J.R. **Flavour of distilled beverages: Origin and Development.** Florida: Verlag Chemie International Inc., 1983. p. 64-78.
18. LONDOÑO, V.E.D. **Influência da composição do mosto, das condições da fermentação e da destilação sobre os teores de produtos voláteis na aguardente.** Belo Horizonte, 1995. 126p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.
19. MAIA, A. B. R. Componentes voláteis da Aguardente. **STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.12, n.6, p. 29-34, 1994.

20. MELONI, G. Retificação. In: MELONI, G. **L'industria dell'alcole III. Processi e impianti di produzione e trasformazione. Spiriti-Alcole assoluto. Alcoli sintetici.** Milão: Ulrico Hoepli, 1958. p. 478-505
21. MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Berlin, v.31, n. 3, p. 426-428, 1959.
22. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Complementação dos padrões de identidade e qualidade para destilados alcoólicos. Portaria nº 371 de 18 de setembro de 1974. **Diário Oficial da União**, Seção I, Parte I, Suplemento, Brasília, 19 set. 1974, p. 53-62.
23. MUÑOZ, A.M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation in quality control.** New York: Van Nostrand Reinhold, 1992. 240 p.
24. NOVAES, F.V. **Produção e qualidade da aguardente de cana.** Piracicaba. 1995. 27p (Apostila).
25. OLIVEIRA, E.S. **Características fermentativas, formação de compostos voláteis; e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais.** Campinas, 2001. 135 p. Tese (Doutora em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
26. PARFAIT, A.; JOURET, C. Formation of higher alcohols in rum. **Annales de Technologie Agricole**, Paris, v.24, p.421-36, 1975.
27. PEPE, P.R. Programa aposta na valorização do setor de aguardente. **Empório da Comunicação Assessoria de Imprensa Ltda**, São Paulo, 2000.

28. PIROUETT, **Multivariate Data Analysis for IBM PS Systems**, version 2.1, 1977. Infometrix, Seattle, WA, USA.
29. RIBEIRO, C. A. F. **Potencialidades de diferentes linhagens de levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* na tecnologia de aguardente de cana**. Piracicaba, 1997. 107 p. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
30. SALIK, F.L.M.; POVOH, N.P. Método espectrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 5., Águas de São Pedro. **Anais**. Piracicaba: STAB, 1993, p. 262-266.
31. SAS Institute. **SAS User's Guide: statistics**. Cary, USA, 1993.
32. SIMPSON, A.C. Manufacture of brandy. **Process Biochemistry**, London, p. 25-27, 1971.
33. SINGER, D.D. The analysis and composition of potable spirits: Determination of C₃, C₄ and C₅ alcohols in whisky and brandy by direct gas chromatography. **Analyst**, London, v. 91, p. 127-134, 1966a.
34. STONE, H.; SIDEL, J.L. **Sensory evaluation practices**. 2.ed. San Diego: Academic Press Inc., 338 p. 1993. Serie (Food Science and Technology).
35. SUOMALAINEN, H.; LEHTONEN, M. The production of aroma compounds by yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 85, p. 149-156, 1979.
36. VARGAS, E.A. **Qualidade da aguardente de cana produzida, engarrafada e/ou comercializada em Minas Gerais**. Belo Horizonte, 1995. 81p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas

Errata

Página 64 - Tabela 1 - substituir Cg UFMG-A1029 por Cf UFMG-A1029

Página 86 - Tabela 1 - substituir Cg UFMG-A1029 por Cf UFMG-A1029

Página 92 - Tabela 2 - retirar do rodapé Rend = Rendimento da fermentação

Página 94 - 1º parágrafo, linha 6 - substituir (a,b ou c) por (a e b)

Página 108 - 1º parágrafo, linha 2 - substituir 38 a 54° GL por 38 a 54 % v/v

Página 121 - Tabela 2 – substituir ° GL por % v/v

Página 122 - 2º parágrafo, linha 9 – substituir K' de Barbet maior por K' de Barbet menor

Página 125 - 2º parágrafo, linha 8 - substituir álcool isoamílico/isobutanol por álcoois superiores/não-álcoois

Página 129 – Tabela 4 – substituir não por não-*Saccharomyces*