

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Prospecção de leveduras da região de Salinas (MG) para produção de cachaça
de alambique**

Bárbara Côgo Venturim
Doctor Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2026**

BÁRBARA CÔGO VENTURIM

Prospecção de leveduras da região de Salinas (MG) para produção de cachaça de alambique

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Jose G. Prado Martin

Coorientadores: Alexandre F. Pereira
Alexandre S. de Souza
Wendel B. da Silveira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2026**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

V469p
2026
Venturim, Bárbara Côgo, 1996-
Prospecção de leveduras da região de Salinas (MG) para
produção de cachaça de alambique / Bárbara Côgo Venturim. –
Viçosa, MG, 2026.

1 tese eletrônica (117 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Inclui apêndices.

Orientador: José Guilherme Prado Martin.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia, 2026.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2026.157>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Bioprospecção. 2. Aguardente. 3. Cachaça - Salinas
(MG). 4. Leveduras. I. Martin, José Guilherme Prado, 1983-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 663.50098151

BÁRBARA CÔGO VENTURIM

Prospecção de leveduras da região de Salinas (MG) para produção de cachaça de alambique

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 20 de fevereiro de 2026.

Assentimento:

Bárbara Côgo Venturim
Autora

Jose Guilherme Prado Martin
Orientador

Essa tese foi assinada digitalmente pela autora em 31/03/2026 às 19:37:50 e pelo orientador em 31/03/2026 às 19:39:12. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **FTK5.N3VG.S647** e clique no botão 'Validar documento'.

Dedico este trabalho à minha família,
especialmente a Marta Regina,
Joel e Alextivane.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por me conceder força, saúde e sabedoria ao longo de toda essa caminhada. À minha família, meu alicerce, que sempre fez de tudo por mim, mesmo quando muitas vezes lhes faltaram oportunidades. À minha mãe Marta Regina, ao meu pai Joel e ao meu irmão Alextivane, pelo amor, pelos sacrifícios silenciosos, pelo apoio constante e por nunca deixarem de acreditar em mim. Ao meu namorado João Paulo, uma das pessoas fundamentais para que eu me mantivesse forte ao longo dessa jornada. Agradeço pelas conversas, pelo apoio emocional, pela ajuda em bancada e, sobretudo, por me desafiar diariamente a ser uma pesquisadora melhor.

Ao Dr. José Guilherme Prado Martin, pela orientação, confiança, paciência e pelos ensinamentos que contribuíram de forma decisiva para minha formação acadêmica e para a realização deste trabalho. Aos meus coorientadores, pelas contribuições, disponibilidade e apoio ao longo do tempo de doutorado. Em especial ao professor Dr. Alexandre Santos de Souza, pelo auxílio direto e fundamental nas atividades práticas, especialmente na condução das etapas da produção das cachaças, bem como pelo acolhimento generoso em sua casa, junto à sua família, durante os períodos em que estive em Salinas (MG). Ao professor José Carlos Baffa Jr. pela valiosa colaboração na realização das análises físico-químicas das cachaças. Ao Sr. Carlos (Cachaçaria Poka) pela doação do caldo de cana utilizado nos ensaios de fermentação em escala de bancada. E por fim, a todas as cachaçarias parceiras de Salinas (MG) que permitiram a coleta das amostras de cana e mosto fermentado.

Ao Laboratório de Microbiologia de Produtos Fermentados (FERMICRO) e aos meus colegas de trabalho, pelas trocas de conhecimento, apoio e convivência diária, em especial Thamylls, Paulo, Luiza, Ludmylla, Walmar, Bianca, Mariane e Sebastião. Aos amigos que construí em Viçosa, que tornaram essa caminhada mais leve e significativa, em especial Paula, Thamylls, Luiz Eliel, Jackson, Marcelo, Roger, Antônio Lucas, Paulo, Juniel, Diego e Tarsila. Às meninas da república, que sempre me auxiliaram e estiveram presentes no dia a dia, em especial Ana Peres, Carmen, Laura, Cleidi, Julia e Malu. Ao Sr. Paulo e à sua família, que me acolheram como parte da família e deixaram meus dias mais tranquilos em Viçosa.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela excelente estrutura física e intelectual oferecida. Agradeço também o INCT Leveduras, do qual fazemos parte.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e para minha trajetória acadêmica.

“Se você não tivesse capacidade,
Deus não te daria a oportunidade.
Seus medos você já conhece,
experimente suas coragens”.

Santa Teresinha do Menino Jesus

RESUMO

VENTURIM, Bárbara Côgo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2026. **Prospecção de leveduras da região de Salinas (MG) para produção de cachaça de alambique.** Orientador: Jose Guilherme Prado Martin. Coorientadores: Alexandre Fontes Pereira, Alexandre Santos de Souza e Wendel Batista da Silveira.

A cachaça é uma bebida alcoólica destilada tipicamente brasileira, obtida a partir da fermentação e destilação do caldo de cana-de-açúcar, apresentando grande relevância econômica, cultural e social no país. Assim, esta tese teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico de leveduras autóctones associadas à produção de cachaça, integrando uma revisão de literatura, a prospecção e seleção de isolados e a validação do desempenho fermentativo em escala de bancada e piloto. Na etapa experimental, foram isoladas 156 leveduras provenientes de cana-de-açúcar (42%) e do vinho de cana fermentado (58%), coletadas em cinco unidades produtoras da região de Salinas (MG). Após triagem inicial, 70% dos isolados (109) não apresentaram produção significativa de HS, e destes, 56% (61 isolados) foram capazes de fermentar glicose, frutose e sacarose após 36 horas. Nos testes de tolerância a estresses fermentativos, 33% dos isolados apresentaram desempenho superior ao da cepa controle *Saccharomyces cerevisiae* LNF CA-11. A atividade invertásica extracelular variou de $(0,12 \pm 0,09) \times 10^2$ a $(1,20 \pm 0,44) \times 10^2$ U, sendo 66,7% dos isolados superiores ao controle. A identificação taxonômica revelou predominância de *S. cerevisiae* e um isolado não-*Saccharomyces* (*Meyerozyma* sp.), resultando na seleção final de nove leveduras promissoras. Em escala de bancada, a produção de etanol variou de 1,2 a 3,0%, e as populações finais de leveduras atingiram valores entre 7,4 e 12,7 Log UFC/mL. Em escala piloto, as cachaças apresentaram teores alcoólicos entre 41,8 e 43,2% (v/v), atendendo à legislação, exceto pela cachaça CA-11, que apresentou teor elevado de álcoois superiores. Os atributos sensoriais indicaram diferenças entre as amostras, com destaque para cachaça com maior preferência (Cachaça VH12) e perfil aromático diferenciado (Cachaça CSI15). Os resultados desta tese demonstram que a levedura utilizada na fermentação exerce papel determinante na eficiência do processo, na composição química e no perfil sensorial da cachaça, configurando-se como um fator central para a qualidade e diferenciação da bebida.

Palavras-chave: bioprospecção; aguardente; inóculo; performance fermentativa; alambique

ABSTRACT

VENTURIM, Bárbara Côgo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2026. **Prospection of yeasts from the Salinas region (MG) for the production of pot still cachaça.** Adviser: Jose Guilherme Prado Martin. Co-advisers: Alexandre Fontes Pereira, Alexandre Santos de Souza and Wendel Batista da Silveira.

Cachaça is a traditional Brazilian distilled alcoholic beverage obtained from the fermentation and distillation of sugarcane juice, holding significant economic, cultural, and social importance in the country. The quality of cachaça is directly related to yeast performance during fermentation. Thus, this thesis aimed to evaluate the biotechnological potential of autochthonous yeasts associated with cachaça production, integrating a literature review, the prospection and selection of isolates, and the validation of fermentative performance at laboratory and pilot scales. In the experimental stage, 156 yeasts were isolated from sugarcane (42%) and fermented sugarcane must (58%), collected from five production units in the Salinas region (MG, Brazil). After initial screening, 70% of the isolates (109) did not show significant HS production, and among these, 56% (61 isolates) were able to ferment glucose, fructose, and sucrose after 36 hours. In the tolerance tests to fermentative stresses, 33% of the isolates showed superior performance compared to the control strain *Saccharomyces cerevisiae* LNF CA-11. Extracellular invertase activity ranged from $(0.12 \pm 0.09) \times 10^2$ to $(1.20 \pm 0.44) \times 10^2$ U, with 66.7% of the isolates outperforming the control. Taxonomic identification revealed a predominance of *S. cerevisiae* and one non-*Saccharomyces* isolate (*Meyerozyma* sp.), resulting in the final selection of nine promising yeasts. At laboratory scale, ethanol production ranged from 1.2 to 3.0%, and final yeast populations reached values between 7.4 and 12.7 Log CFU/mL. At pilot scale, the cachaças presented alcohol contents ranging from 41.8 to 43.2% (v/v), complying with legislation, except for cachaça CA-11, which showed a high content of higher alcohols. Sensory attributes indicated differences among samples, with emphasis on the most preferred cachaça (Cachaça VH12) and the one with a distinctive aromatic profile (Cachaça CSI15). The results of this thesis demonstrate that the yeast used during fermentation plays a decisive role in process efficiency, chemical composition, and the sensory profile of cachaça, constituting a central factor for the quality and differentiation of the beverage.

Keywords: bioprospecting; sugarcane spirit; inoculum ; fermentative performance; Pot still cachaça

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
HIPÓTESE E OBJETIVOS	14
HIPÓTESE	14
OBJETIVO GERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO 1 – PROSPECÇÃO DE LEVEDURAS PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA DE ALAMBIQUE	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. PAPEL DAS LEVEDURAS NA PRODUÇÃO DA CACHAÇA	18
3. INFLUÊNCIA DA FERMENTAÇÃO E DESTILAÇÃO NOS ASPECTOS SENSORIAIS DA CACHAÇA	22
4. ESTRATÉGIAS DE PROSPECÇÃO DE LEVEDURAS PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA	25
5. ESTRATÉGIAS PARA SELEÇÃO DE LEVEDURAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA	27
5.1. Produção de sulfeto de hidrogênio	27
5.2. Tolerância a diferentes estresses inerentes ao processo fermentativo	28
5.3. Capacidade de fermentação e atividade invertásica	31
5.4. Perfil de floculação de leveduras	33
6. NOVAS ESTRATÉGIAS NO ESTUDO DE POTENCIALIZAR A ATIVIDADE FISIOLÓGICA DE LEVEDURAS	35
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
REFERÊNCIAS	38
CAPÍTULO 2 – ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS NATIVAS DE SALINAS (MG) COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA DE ALAMBIQUE	48
1. INTRODUÇÃO	49
2. MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1. Coleta das amostras	50
2.2. Isolamento das leveduras	50
2.3. Seleção de leveduras para produção de cachaça	51

2.3.1. Teste qualitativo de produção de Sulfeto de Hidrogênio (H ₂ S).....	51
2.3.2. Capacidade de fermentação de açúcares.....	52
2.3.3. Teste qualitativo de tolerância a diferentes estresses.....	52
2.3.4. Assimilação de lisina	53
2.3.5. Atividade invertásica relativa extracelular	53
2.3.6. Determinação do perfil floculante	54
2.4. Identificação taxonômica das leveduras	55
2.5. Análises estatísticas	56
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
3.1. Panorama geral dos isolados.....	57
3.2. Produção de H ₂ S e capacidade fermentativa.....	58
3.3. Avaliação qualitativa do isolados frente a diferentes estresses fermentativos e classificação de prováveis <i>Saccharomyces</i> e não- <i>Saccharomyces</i>	60
3.4. Atividade invertásica	62
3.5. Taxa de floculação	65
3.6. Identificação das espécies de leveduras e candidatos para fermentação de caldo de cana- de-açúcar para produção de cachaça.....	66
4. CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS	71

CAPÍTULO 3 – PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DEFINIÇÃO DE ATRIBUTOS SENSORIAIS DE CACHAÇA DE ALAMBIQUE PRODUZIDAS POR LEVEDURAS ISOLADAS DE DESTILARIAS DA REGIÃO DE SALINAS-MG

1. INTRODUÇÃO	77
2. MATERIAL E MÉTODOS	78
2.1. Leveduras.....	78
2.2. Performance fermentativa em escala de bancada	79
2.2.1. Elaboração do fermento	79
2.2.2. Fermentação em escala de bancada e análises físico-químicas e microbiológica	80
2.3. Produção da cachaça em escala piloto	81
2.4. Análise físico-química das cachaças.....	83
2.5. Grupo de foco (<i>Foccus group</i>).....	84
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
3.1. Performance fermentativa em escala de bancada	85
3.2. Produção da cachaça em escala piloto	93

3.3. Análise química das cachaças	95
3.4. Análise de grupo focal	98
4. CONCLUSÕES	100
APÊNDICE A – QUADRO DE PONTUAÇÃO DOS ISOLADOS EM RELAÇÃO A PERFORMANCE DE LNF CA-11 FRENTE A DIFERENTES ESTRESSES FERMENTATIVOS	106
APÊNDICE B – CURVA-PADRÃO DE GLICOSE PARA ANÁLISE DOS RESULTADOS DE ATIVIDADE INVERTÁSICA RELATIVA EXTRACELULAR	109
APÊNDICE C – RESULTADOS GERAIS DA ATIVIDADE INVERTÁSICA RELATIVA EXTRACELULAR DOS ISOLADOS AVALIADOS	110
APÊNDICE D – ROTEIRO UTILIZADO PARA CONDUÇÃO DO GRUPO FOCAL DE CACHAÇA.....	112
ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	114
CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	116
DEMAIS PUBLICAÇÕES	117

INTRODUÇÃO GERAL

A cachaça é uma bebida alcoólica tipicamente brasileira, definida como “aguardente de cana produzida exclusivamente no Brasil, e obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, apresentando graduação alcoólica entre 38% e 48% (v/v) a 20 °C” (Brasil, 2022). A bebida possui grande importância histórica, cultural e econômica no país, sendo considerada um dos destilados mais tradicionais do Brasil e apresentando crescente valorização nos mercados nacional e internacional (De Silva et al., 2020; Ratkovich et al., 2023).

No Brasil, a produção de cachaça ocorre predominantemente por dois sistemas distintos: a produção industrial e a produção em alambique. A cachaça industrial caracteriza-se por processos de maior escala, utilização de leveduras selecionadas e destilação contínua em colunas de aço inox, o que favorece maior padronização do produto final. Em contraste, a cachaça de alambique é tradicionalmente produzida em menor escala, utilizando alambiques de cobre e fermentações frequentemente espontâneas conduzidas por culturas mistas presentes no chamado “pé-de-cuba”. Esse processo favorece maior diversidade microbológica e pode contribuir para a formação de perfis sensoriais mais complexos na bebida (Bortoletto e Alcarde, 2015; Brexó et al., 2020).

Nesse contexto, a prospecção e caracterização de leveduras nativas encontram relevância tanto do ponto de vista biotecnológico quanto econômico. O isolamento desses microrganismos a partir de substratos associados ao processo produtivo, como a cana-de-açúcar e o mosto em fermentação, permite acessar populações microbianas naturalmente adaptadas às condições da fermentação alcoólica da cachaça. Esses ambientes representam importantes reservatórios de diversidade microbiana e podem abrigar linhagens com características desejáveis, como elevada tolerância ao etanol, eficiência fermentativa e capacidade de produção de metabólitos voláteis responsáveis pela complexidade aromática da bebida (Amorim, Schwan e Duarte, 2016; Alvarenga, 2019). Além disso, possibilita o desenvolvimento de culturas iniciadoras adaptadas às condições específicas de produção, contribuindo para maior controle do processo fermentativo, redução da variabilidade entre lotes e melhoria da qualidade final do destilado.

Estratégias que combinam análises fenotípicas e moleculares têm sido amplamente aplicadas na caracterização de microrganismos envolvidos em fermentações de bebidas alcoólicas, fornecendo subsídios para o estudo de linhagens com potencial tecnológico e aplicação industrial (Ferreira-D’Silva et al., 2019; Campos et al., 2024). Essa abordagem torna-

se especialmente relevante em regiões tradicionalmente reconhecidas pela produção de cachaça, como o município de Salinas (MG). A região possui forte tradição na produção de cachaça de alambique e destaca-se nacionalmente pela qualidade e identidade sensorial de seus produtos. Fatores como clima, práticas de produção e microbiota associada ao processo fermentativo contribuem para a formação de características particulares da bebida produzida na região (Jesus, Ortega e Perosa, 2016; Cardoso, 2020).

Portanto, o estudo e a prospecção de leveduras locais oferecem oportunidades não apenas para se compreender a predominância de certas leveduras presente nos processos fermentativos tradicionais, mas também para explorar esse potencial biotecnológico em prol da melhoria da produção de cachaça de alambique agregando valor ao produto e fortalecendo a identidade regional dessa bebida tão emblemática para os brasileiros.

HIPÓTESE E OBJETIVOS

HIPÓTESE

Leveduras selvagens isoladas de cana-de-açúcar e mosto fermentado provenientes de sistemas de produção de cachaça apresentam potencial biotecnológico e características fermentativas capazes de contribuir para uma maior eficiência do processo fermentativo e, conseqüentemente, para a valorização do perfil sensorial da cachaça de alambique.

OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar leveduras selvagens provenientes de cana-de-açúcar e mosto fermentado de propriedades produtoras de cachaça na região de Salinas–MG, visando avaliar seu potencial biotecnológico para aplicação em processos fermentativos na produção de cachaça de alambique.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar amostras de cana-de-açúcar e mosto fermentado de cinco diferentes propriedades produtoras de cachaça e/ou canaviais na região de Salinas;
- Isolar leveduras a partir das amostras coletadas em canaviais e/ou propriedades produtoras de cachaça na região de Salinas;
- Selecionar leveduras promissoras com base em testes fisiológicos;
- Identificar taxonomicamente os isolados mais promissores;
- Avaliar a performance fermentativa dos isolados através de testes físico-químicos e microbiológicos a partir de mosto fermentado em escala laboratorial;
- Produzir cachaça em escala piloto a partir de dois isolados mais promissores selecionados previamente;
- Caracterizar físico-quimicamente as cachaças produzidas;
- Avaliar sensorialmente as cachaças produzidas.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA, F.B.M. **Seleção de isolados ambientais de *Saccharomyces cerevisiae* para produção de cachaça de alambique.** (Dissertação de mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

AMORIM, J.C.; SCHWAN, R.F.; DUARTE, W.F. Sugar cane spirit (cachaça): Effects of mixed inoculum of yeasts on the sensory and chemical characteristics. **Food Res Int.**, v. 85, p. 76-83, 2016. doi: 10.1016/j.foodres.2016.04.014.

BORTOLETTO, A.M.; ALCARDE, A.R. Assessment of chemical quality of Brazilian sugar cane spirits and cachaças. **Food Control.** v. 54, p. 1-6, 2015. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.030>

BRASIL. **Instrução Normativa n. 539, de 26 de dezembro de 2022.** Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana para Cachaça. Publicado no Diário Oficial da União de 26/12/2022, Seção 1, Página 3. Disponível em www.agricultura.gov.br.

BREXÓ, R.P.; BRANDÃO, L.R.; CHAVES, R.D. et al. Yeasts from indigenous culture for cachaça production and brewer's spent grain: Biodiversity and phenotypic characterization for biotechnological purposes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 2, p. 124, 2020. doi:10.1016/j.fbp.2020.08.006

CAMPOS, A.C.S.; ARAÚJO, T.M.; MORAES, L. et al. Selected cachaça yeast strains share a genomic profile related to traits relevant to industrial fermentation processes. **Appl Environ Microbiol.**, v. 24, n. 1, p. 175-923, 2024. doi: 10.1128/aem.01759-23

CARDOSO, M.D.G. **Produção de aguardente de cana.** 4 ed., rev. e ampl. Lavras: UFLA, 2020.

DE SILVA, A.P.; SILVELLO, G.C.; BORTOLETTO, A.M. et al. Chemical composition of sugar cane spirit produced from different distillation methods. **Braz. J. Food Technol.**, p. 23, 2020. doi:<https://doi.org/10.1590/1981-6723.30818>

FERREIRA-D'SILVA, A.; BADOTTI, F.; PINHEIRO, C.S.R. et al. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated of the spontaneous fermentation of cachaça from northeastern Brazil. **Braz. J. of Develop.**, v. 5, n. 11, p. 27448-27461, 2019. doi: 10.34117/bjdv5n11-348

JESUS, C.M.; ORTEGA, A.C.; PEROSA, B.B. Cachaça “Região de Salinas”: Uma Indicação Geográfica de Procedência em Construção. **XVII Seminário sobre a Economia Mineira, Diamantina-MG**, v.1, p.383-400, 2016.

RATKOVICH, N.; ESSER, C.; DE RESENDE, A.M.M. et al. The spirit of Cachaça production: An umbrella review of processes, flavour, contaminants and quality Improvement. **Foods**, v. 12, p. 25-33, 2023. doi: <https://doi.org/10.3390/foods12173325>

CAPÍTULO 1 – PROSPECÇÃO DE LEVEDURAS PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA DE ALAMBIQUE

Bárbara Côgo Venturim^a, Paulo Sérgio Pedroso Costa Júnior^a, Sílvio Jackson Félix Alves^b, João Paulo Araújo de Sousa^c e José Guilherme Prado Martin^a.

^a Laboratório de Microbiologia de Produtos Fermentados, FERMICRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil;

^b Laboratório de Processos Bioquímicos e Fermentativos, LAPROBQI, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil;

^c Laboratório de Pesquisa em Qualidade e Segurança dos Alimentos, QSALAB, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil;

Resumo

Esta revisão aborda a importância das leveduras na produção da cachaça, com ênfase em seus papéis fisiológicos, metabólicos e tecnológicos, bem como nas estratégias de seleção e prospecção de novos isolados para uso industrial. Leveduras atuam na conversão de açúcares em etanol e na formação de compostos secundários, como álcoois superiores e ésteres, que determinam o perfil sensorial do destilado. Aspectos como o metabolismo celular, a produção de sulfeto de hidrogênio, a tolerância a estresses fermentativos, a atividade invertásica e o perfil de floculação são discutidos como critérios essenciais na seleção de linhagens com potencial biotecnológico. Além disso, são apresentadas estratégias de bioprospecção de leveduras autóctones e o emprego de ferramentas moleculares e ômicas na caracterização e aprimoramento dessas leveduras. A integração entre abordagens tradicionais e modernas de seleção de leveduras representa um avanço promissor para a padronização, a melhoria da qualidade e a valorização da cachaça no cenário nacional e internacional.

Palavras-chave: Aguardente; Bioprospecção; Perfil sensorial.

1. INTRODUÇÃO

A cachaça é uma bebida alcoólica típica e exclusiva do Brasil, com teor alcoólico que varia entre 38% e 48% (v/v) a 20 °C, produzida por meio da destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar (Brasil, 2022). Trata-se de uma bebida com aspecto transparente e que provoca sensação de aquecimento após o consumo, característica que estão relacionadas ao seu nome popular (“aguardente de cana”) (Bortoletto e Alcarde, 2015). Com o passar dos anos, foram observados o aprimoramento da produção e a busca por parte dos produtores pela melhoria da qualidade do produto, fazendo-se necessária a elaboração de uma regulamentação técnica que caracterize o perfil e a identidade da cachaça. Atualmente, a Instrução Normativa nº 539 de 26 de dezembro de 2022, estabelecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), determina o Padrão de Identidade e Qualidade da Cachaça (Brasil, 2022).

A bebida ocupa a quarta posição em relação aos destilados produzidos mundialmente, atrás apenas do Baiju, Vodka e Soju, lidera o mercado de destilados no Brasil, representando 86% do consumo, e aparece na segunda posição entre as bebidas fermentadas, ficando atrás apenas da cerveja (Pereira, Acevedo e Alcarde, 2024). Em 2024, registraram-se valores de produção de cerca de 292,5 milhões de litros por meio das 1.266 cachaçarias registradas no MAPA, entretanto, apenas 2,2% da produção é exportada, o que revela o grande potencial de crescimento para a cachaça no mercado internacional. O estado de Minas Gerais destaca-se com a participação de 501 destilarias que contribuem com cerca de 30% da produção de cachaça de alambique no Brasil (Brasil, 2025).

Durante a produção da cachaça, o caldo de cana-de-açúcar segue para fermentação com a adição do "pé-de-cuba", fermento selvagem propagado a partir de leveduras autóctones que são capazes de hidrolisarem a sacarose por meio da enzima invertase (β -frutosidase), gerando glicose e frutose. Esses monossacarídeos são encaminhados para o interior da célula por transportadores de hexoses presentes na membrana plasmática, sendo então fosforilados e direcionados para a via glicolítica, no qual resultará nos produtos finais de etanol e gás carbônico (Xiu-Feng, Yu-Lei e Xue-Mei, 2024). Posteriormente, o mosto fermentado é transferido para o alambique de cobre, onde ocorre o processo de destilação. Durante essa etapa, o destilado é fracionado em três porções denominadas “cabeça”, “coração” e “cauda”. A fração “cabeça” corresponde aproximadamente aos primeiros 5% do destilado obtido, caracterizando-se por elevado teor alcoólico e alta concentração de compostos voláteis indesejáveis, como aldeídos e ésteres leves, que podem comprometer a qualidade sensorial da bebida. Por essa

razão, essa fração é normalmente descartada. A fração destilada na sequência é o “coração”, sendo a fração utilizada para fins comerciais. Por fim, separa-se a “cauda”, que representa 15% do volume final do destilado e que contém compostos com maior afinidade com a água, como por exemplos o ácido acético, também sendo descartada ao término do processo (Serafim et al., 2012; Alcarde, 2017). Desta forma, além de etanol e água, a cachaça contém compostos como ésteres, aldeídos, álcoois superiores e ácidos carboxílicos, responsáveis pelo aroma e sabor do produto final, podendo também conter compostos como acetaldeído e metanol, que afetam negativamente a qualidade da bebida (Bortoletto e Alcarde, 2013).

A qualidade da cachaça é influenciada por vários fatores, como matéria-prima utilizada, condições do processo fermentativo e de destilação, envelhecimento (quando aplicável), e, especialmente, a linhagem de levedura empregada (Walker e Stewart, 2016). As indústrias de bebidas alcoólicas, atualmente, optam por leveduras selecionadas que apresentem características como baixa produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), tolerância às condições de estresses inerentes ao processo fermentativo, atividade floculante adequada, capacidade de fermentação dos açúcares presentes na cana-de-açúcar e eficiência na conversão destes açúcares em etanol, ao mesmo tempo em que produzam compostos secundários que contribuam para a qualidade sensorial da bebida (Cardoso, 2020). As estratégias de prospecção e seleção dessas leveduras impactam diretamente na obtenção de isolados com desempenho aprimorado, capazes de atender às demandas do mercado nacional e de destacar a cachaça no cenário internacional.

2. PAPEL DAS LEVEDURAS NA PRODUÇÃO DA CACHAÇA

As leveduras constituem o principal grupo de microrganismos envolvidos na fermentação alcoólica da cachaça, sendo responsáveis tanto pela conversão de açúcares em etanol quanto pela produção de compostos secundários que determinam o perfil sensorial da bebida (De Souza et al., 2012; Walker e Stewart, 2016). Entre as espécies predominantes, *Saccharomyces cerevisiae* destaca-se pela alta capacidade fermentativa e adaptação às condições adversas do mosto, como variações de pH e elevação da concentração de etanol (Gallone et al., 2016; Campos et al., 2024). Durante o processo, são produzidos álcoois superiores, ésteres, aldeídos e ácidos orgânicos que, em conjunto, conferem complexidade aromática e sensorial ao produto final (De Souza et al., 2012; Silveira et al., 2021).

Além das espécies dominantes, diferentes leveduras não-*Saccharomyces* também são encontradas nas fermentações de cachaça, desempenhando papel relevante na modulação do

aroma e do sabor. Embora apresentem menor eficiência na conversão de açúcares, diversas espécies são reconhecidas pela capacidade de produzir compostos aromáticos complexos e desejáveis (Padilla, Gil e Manzanares, 2016; Ciani, Canonico e Comitini, 2022). A interação sinérgica entre leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* constitui um dos principais determinantes da tipicidade da cachaça, representando tanto um componente tecnológico quanto cultural nas regiões produtoras (Amorim et al., 2016; Portugal et al., 2016).

O equilíbrio entre eficiência fermentativa e complexidade sensorial é um dos principais desafios tecnológicos. A estratégia de co-fermentação controlada tem se mostrado promissora, permitindo combinar o desempenho de cepas robustas de *S. cerevisiae* com o potencial aromático de leveduras não convencionais (Canonico et al., 2021; Ciani, Canonico e Comitini, 2022). Essa abordagem reflete o avanço do conhecimento biotecnológico na busca por bebidas mais complexas e padronizadas, sem descaracterizar a identidade tradicional da cachaça de alambique (Figura 1).

No contexto da produção de cachaça no Brasil, a fermentação do mosto pode ocorrer de forma espontânea, pela ação da microbiota naturalmente presente no caldo de cana e do ambiente, ou mediante a inoculação de culturas iniciadoras previamente selecionadas. A composição microbiana do mosto é influenciada por múltiplos fatores, como a microbiota da matéria-prima, a higienização dos equipamentos, a composição nutricional do caldo e o reaproveitamento do fermento em sucessivos ciclos fermentativos (Basso et al., 2008; Portugal et al., 2016). Esses fatores favorecem a adaptação de linhagens tolerantes a etanol e a compostos inibidores, estabelecendo comunidades microbianas estáveis e resilientes (De Souza et al., 2012; Ratkovich et al., 2023). Assim, compreender o papel fisiológico e biotecnológico das leveduras é essencial para o aprimoramento das práticas fermentativas, garantindo qualidade, segurança e identidade cultural da cachaça.

Avanços recentes em técnicas de biologia molecular têm permitido a caracterização das comunidades microbianas presentes nas dornas de fermentação. Tais estudos evidenciam a complexidade do ecossistema fermentativo, abrindo perspectivas para o desenvolvimento de culturas iniciadoras específicas e consórcios microbianos otimizados (Campos et al., 2024; Wen et al., 2024). A integração entre o conhecimento empírico tradicional e a inovação biotecnológica representa, portanto, um caminho estratégico para a valorização e consolidação da cachaça no cenário internacional.

Uso de *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* na fermentação de cachaça

<i>Saccharomyces</i>	Não- <i>Saccharomyces</i>	Consórcio <i>Saccharomyces</i> e não- <i>Saccharomyces</i>
<p>Vantagens:</p> <ul style="list-style-type: none"> Alta capacidade fermentativa e rápida conversão de açúcares em etanol. Elevada tolerância ao etanol, baixos pH e altas temperaturas. Boa adaptabilidade a diferentes mostos e repetibilidade do processo. Menor risco de contaminação bacteriana devido à dominância no meio. 	<p>Vantagens:</p> <ul style="list-style-type: none"> Maior diversidade de congêneres voláteis (ésteres, álcoois superiores, aldeídos). Capacidade de modulação do perfil aromático e sensorial da bebida. Produção de compostos precursores de aromas frutados e florais. Contribui para redução da acidez volátil em algumas espécies. 	<p>Vantagens:</p> <ul style="list-style-type: none"> Aumento da complexidade sensorial e diversidade de congêneres voláteis. Sinergismo na utilização de açúcares e nutrientes (melhor aproveitamento do mosto). Possibilidade de controle do aroma e sabor pela escolha das cepas. Redução da acidez volátil e melhoria da estabilidade microbiológica.
<p>Desvantagens:</p> <ul style="list-style-type: none"> Menor diversidade de compostos voláteis (menor complexidade aromática). Produção limitada de ésteres e aldeídos de impacto sensorial. Pode inibir o crescimento de espécies não-<i>Saccharomyces</i> por competição. 	<p>Desvantagens:</p> <ul style="list-style-type: none"> Baixa eficiência fermentativa (menor conversão de açúcares). Menor tolerância a etanol, pH e variações ambientais. Potencial de gerar compostos indesejáveis (acidez elevada, off-flavors). Menor viabilidade em fermentações prolongadas ou repetidas. 	<p>Desvantagens:</p> <ul style="list-style-type: none"> Potencial redução do rendimento alcoólico total. Dificuldade de controle e reprodutibilidade do processo. Competição entre espécies pode reduzir a eficiência global. Exige monitoramento rigoroso das proporções e condições de inoculação.

Figura 1. Vantagens e desvantagens do uso de leveduras *Saccharomyces*, não-*Saccharomyces* e de consórcios entre ambas na fermentação de cachaça. Elaborada pelos autores com AutoCAD®.

O processo fermentativo da produção de cachaça pode ser dividido em duas fases: propagação do fermento e fermentação alcoólica propriamente dita (Figura 2). A primeira etapa, conduzida sob aeração e baixa concentração de açúcares, favorece o metabolismo respiratório e a multiplicação celular. Nessa fase, ocorre a biossíntese de esteróis e ácidos graxos insaturados, essenciais à integridade da membrana celular e à tolerância ao etanol (Soares et al., 2011). A fase subsequente, anaeróbica, é marcada pela intensa conversão de açúcares em etanol, por meio da via glicolítica e da ação da enzima álcool desidrogenase, que regenera o cofator, assegurando a continuidade do metabolismo energético (Nelson e Cox, 2014). Condições inadequadas de aeração ou excesso de açúcar na propagação podem comprometer o desempenho da fermentação, resultando em processos lentos ou incompletos (Basso et al., 2008; Soares et al., 2011).

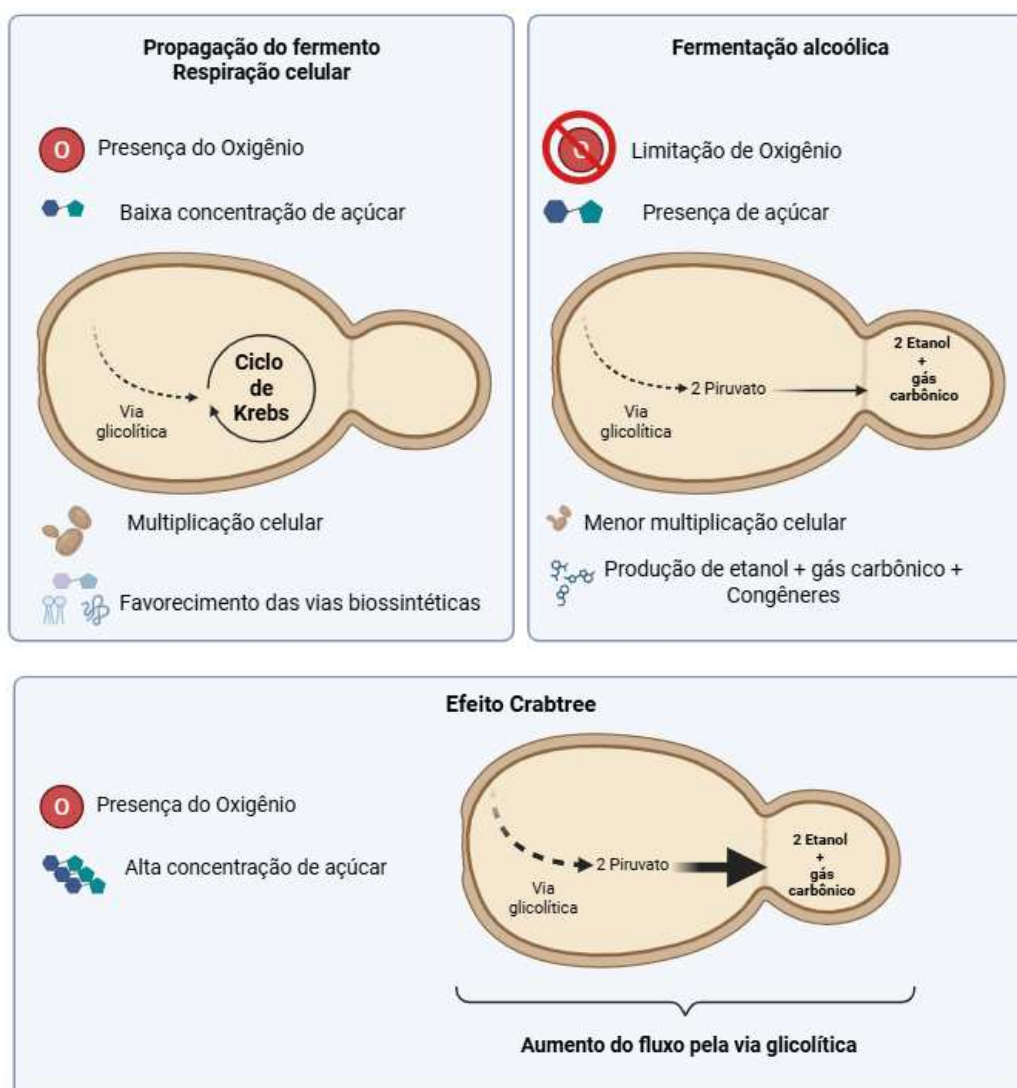


Figura 2. Visão geral do metabolismo de leveduras: respiração, fermentação alcoólica e efeito *Crabtree*. Elaborado pela autora com Biorender.

As leveduras são microrganismos anaeróbios facultativos que podem metabolizar glicose tanto pela respiração aeróbica quanto pela fermentação alcoólica (Nelson e Cox, 2014). Espécies como *S. cerevisiae* apresentam um fenômeno metabólico particular, o Efeito *Crabtree*, que consiste na produção de etanol mesmo na presença de oxigênio, quando há altas concentrações de glicose (Pfeiffer e Morley, 2014). Na produção de cachaça, o manejo do fermento exemplifica a aplicação empírica desse princípio. Durante a propagação, a baixa concentração de açúcares e a presença de oxigênio favorecem o crescimento celular; com a adição de mosto mais concentrado, o Efeito *Crabtree* é induzido, promovendo a formação de etanol e a seleção natural de leveduras tolerantes (Basso et al., 2008; Soares et al., 2011). Essa alternância confere estabilidade ao processo e reduz a contaminação por microrganismos indesejáveis. O manejo incorreto dessa etapa, como a indução precoce da fermentação, pode resultar em culturas fisiologicamente enfraquecidas e baixa performance fermentativa. Assim, a elaboração do fermento representa um ponto determinante para a vitalidade e resiliência das leveduras ao longo dos ciclos produtivos (Ratkovich et al., 2023).

3. INFLUÊNCIA DA FERMENTAÇÃO E DESTILAÇÃO NOS ASPECTOS SENSORIAIS DA CACHAÇA

Durante a fermentação, as leveduras sintetizam compostos voláteis e semivoláteis que contribuem significativamente para o perfil sensorial da bebida, influenciando características como aroma, sabor e sensação na boca. Esses compostos podem ser desejáveis, quando conferem notas positivas à bebida – sendo então chamados de *on-flavour*; indesejáveis, quando influenciam negativamente nos aspectos sensoriais – *off-flavour*; ou tóxicos, que apresente toxicidade e impacte negativamente na saúde do consumidor (Ratkovich et al., 2023). Dentre os principais compostos orgânicos formados durante a fermentação, destacam-se os ésteres, álcoois superiores, ácidos orgânicos, aldeídos, cetonas, compostos carbonílicos, ácidos carboxílicos, ácidos graxos, furanos, compostos sulfurados e terpenos (Janzantti, 2004; Gonçalves et al., 2019), os quais, dependendo de suas concentrações, podem contribuir para características sensoriais desejáveis (*on-flavour*) ou indesejáveis (*off-flavour*).

Alguns desses compostos são originados da matéria-prima, enquanto outros são formados durante a fermentação; podendo ou não sofrer alterações significativas durante a destilação, devido ao aquecimento e arraste pelo vapor. O cobre, tradicionalmente empregado nos alambiques, desempenha papel funcional na remoção de compostos sulfurados, como o sulfeto de hidrogênio, responsáveis por odores indesejáveis. Contudo, o seu excesso pode levar

à contaminação do destilado e à formação de sabores metálicos (Ratkovich et al., 2023). A otimização das condições fermentativas e de destilação é, portanto, essencial para garantir o equilíbrio químico e sensorial da bebida. O processo de armazenamento e/ou envelhecimento em contato com madeiras também pode impactar o perfil desses compostos (Puentes et al., 2018; Cardoso, 2020). A interação dessa complexa gama de compostos orgânicos é responsável por originar notas sensoriais frutadas, florais, alcoólicas, picantes e, em alguns casos, defeitos, dependendo da concentração e da sinergia entre eles (Bortoletto, Correa e Alcarde, 2016). Na Figura 3, estão listados os principais compostos formados durante os processos de fermentação e destilação.

A escolha da levedura empregada no processo influencia de forma significativa o perfil sensorial da cachaça. Leveduras autóctones tendem a conferir maior complexidade sensorial à bebida, porém com maior variabilidade entre os lotes. Por outro lado, leveduras comerciais são utilizadas para proporcionar fermentações mais controladas e previsíveis, com foco na produção de compostos específicos de interesse (Moura et al., 2020). Apesar da utilização de culturas *starter* no início do processo, sabe-se que, ao longo da fermentação, microrganismos autóctones, provenientes da matéria-prima e do próprio ambiente, acabam participando do sistema fermentativo (Carlos, Olitta e Nitsche, 2011). Ainda assim, a inoculação de uma cepa conhecida no início do processo traz benefícios importantes, como o rápido início da fermentação, a redução da contaminação por microrganismos indesejáveis e a melhoria na padronização do produto final (Campos et al., 2010; De Souza et al., 2012). Além disso, o uso de co-culturas ou a aplicação de leveduras não convencionais têm sido avaliados como uma estratégia para se aumentar a complexidade sensorial da bebida (Alvarenga, 2023).

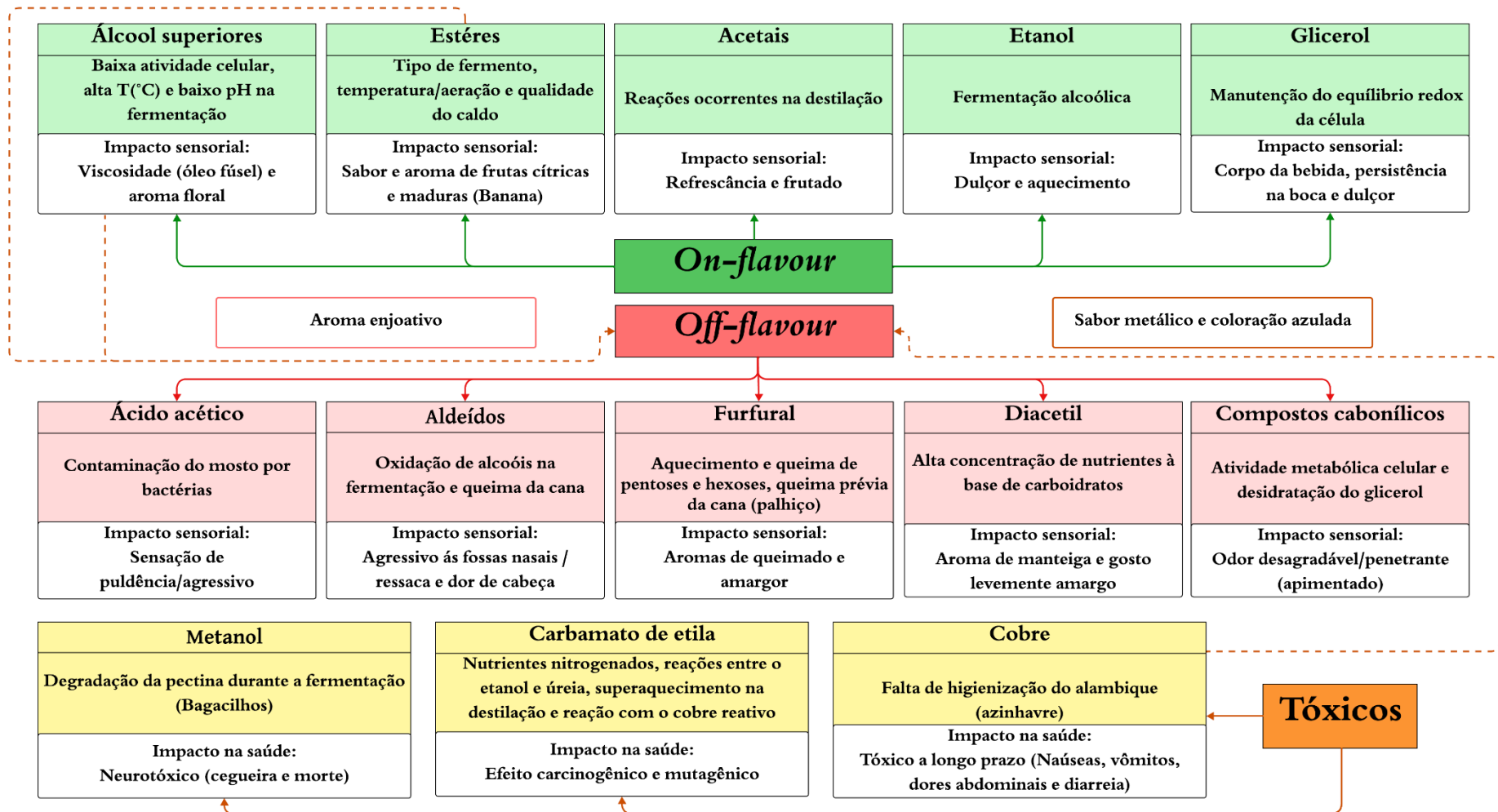


Figura 3. Principais compostos secundários formados durante a fermentação e destilação na produção da cachaça sem envelhecimento. Fonte: Baseado nas informações de Cardoso (2020). Elaborado pelos autores com Lucidchart.

Além da influência direta das leveduras sobre os atributos sensoriais da cachaça, fatores ambientais também exercem papel fundamental no desempenho fermentativo e, conseqüentemente, nas características finais do produto (Barbosa et al., 2016). Entre eles, destacam-se: temperatura de fermentação, disponibilidade de oxigênio e nutrientes, pH do mosto, qualidade e higienização da cana-de-açúcar e presença de bactérias contaminantes, dentre outros (Ratkovich et al., 2023). Dessa forma, fica evidente que a escolha da cepa de levedura, associada às condições ambientais do processo fermentativo, exercem influência direta e decisiva na qualidade sensorial da cachaça (Vidal et al., 2013; Oliveira, Oliveira e Kamimura, 2023). A compreensão aprofundada dessas interações permite não apenas a otimização da produção, mas também a valorização da bebida em termos de complexidade e padronização.

4. ESTRATÉGIAS DE PROSPECÇÃO DE LEVEDURAS PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA

A bioprospecção de leveduras autóctones estabeleceu-se como uma abordagem estratégica relevante para o isolamento de cepas com características de interesse industrial; estas, oriundas de nichos ecológicos específicos, possuem potencial para exibir características tecnológicas e sensoriais capazes de aprimorar ou diversificar as funcionalidades de linhagens comerciais já conhecidas (Jiranek, 2024). A escolha dos locais de coleta representa a etapa inicial e decisiva do processo de prospecção. Atualmente, a busca se estende a ecossistemas pouco explorados, com destaque para regiões de alta biodiversidade, como a Amazônia (Da Silva et al., 2024), Florestas Tropicais (Peraza-Jiménez et al., 2021), Manguezais (Nimsi et al., 2023), árvores de *Nothofagus* no Chile (Murath et al., 2025), ou em fermentações de cacau na Colômbia (Delgado-Ospina et al., 2020). Além disso, habitats extremos como aqueles sujeitos a elevadas temperaturas têm revelado cepas naturalmente adaptadas a condições adversas, como no caso das leveduras envolvidas na produção do Baiju (Zhou et al., 2022). Logo, o potencial para encontrar novas leveduras com perfis tecnológicos desejáveis é vasto e global.

No contexto da produção de cachaça, diferentes nichos têm sido explorados relacionados ao ambiente de destilarias, incluindo o mosto fermentado (Oliveira et al., 2008; Nova et al., 2009), o pé-de-cuba (Nova et al., 2009; Ferreira-D’Silva et al., 2019) e o solo de plantio de cana-de-açúcar irrigado com vinhaça (Alencar et al., 2023). Estudos relatam o isolamento de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* provenientes de fermentações de cachaça, muitas das quais apresentam elevada eficiência fermentativa e produção diferenciada

de compostos aromáticos quando comparadas a linhagens comerciais (Oliveira et al., 2008; Ferreira-D’Silva et al., 2019). Paralelamente, leveduras não pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, como *Pichia manshurica*, *Torulaspora delbrueckii*, *Wickerhamomyces anamalus* e *Candida parapsilosis*, também têm sido identificadas nesses ambientes e podem contribuir para a complexidade aromática da bebida ou atuar nas etapas iniciais da fermentação (Brexó et al., 2020). A exploração sistemática desses ambientes produtivos, portanto, amplia o repertório de microrganismos disponíveis para seleção e desenvolvimento de culturas iniciadoras adaptadas às condições específicas da produção de cachaça.

Após a coleta, o isolamento das leveduras é realizado em meios de cultivo, como o ágar YPD (extrato de levedura, peptona e dextrose), visando à obtenção de culturas puras que possam ser posteriormente avaliadas (Mahilraján, Jeyaseelan e Srivijeindran, 2021). Para a identificação molecular de leveduras, a amplificação e o sequenciamento da região D1/D2 do gene da subunidade maior do DNA ribossomal são amplamente utilizados, permitindo a identificação de grande parte das espécies descritas (Lanchange et al., 2003). Quando essa região não possibilita a identificação em nível de espécie, a análise da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do DNA ribossomal pode ser empregada como ferramenta complementar; contudo, técnicas mais avançadas, como o sequenciamento genômico completo, oferecem maior resolução para diferenciar espécies próximas e híbridos (Collins et al., 2021).

Outra análise fundamental é a caracterização fenotípica das leveduras. Essa análise abrange parâmetros relacionados ao desempenho fermentativo, como cinética de crescimento (Lopes et al., 2015), produção de etanol e capacidade de suportar estresses ambientais, incluindo variações de temperatura e altas concentrações alcoólicas (Belloch et al., 2008). Em paralelo, investiga-se o perfil sensorial resultante da fermentação, com ênfase na produção de compostos voláteis, como ésteres e álcoois superiores, além da detecção de metabólitos indesejáveis, a exemplo do ácido acético e do sulfeto de hidrogênio. Para tal, a Cromatografia Gasosa (CG), associada a detectores de Ionização de Chama (FID) ou Espectrometria de Massas (MS), constituem o principal recurso analítico (Pereira, Acevedo e Alcarde, 2024). Ao integrar todas essas etapas de coleta, isolamento, caracterização e identificação, a bioprospecção de leveduras revela-se como uma ferramenta estratégica para o desenvolvimento de novos insumos biotecnológicos destinados à indústria de bebidas.

5. ESTRATÉGIAS PARA SELEÇÃO DE LEVEDURAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA

Para que uma levedura seja considerada promissora para a produção de cachaça, ela deve reunir um conjunto de características desejáveis, tanto do ponto de vista tecnológico quanto sensorial. Entre os atributos mais desejados estão a tolerância ao etanol e à pressão osmótica, a capacidade de fermentar rapidamente os açúcares disponíveis e a resistência a condições ambientais adversas (Soares, Silva e Schwan, 2011; Walker e Stewart, 2016). Outro critério relevante é a produção de metabólitos que contribuam positivamente para o aroma e sabor da bebida (Oliveira et al., 2005). A seguir, será abordado cada uma das características que orientam essa seleção, com base em critérios microbiológicos, bioquímicos e tecnológicos.

5.1. Produção de sulfeto de hidrogênio

O sulfeto de hidrogênio (H_2S), produzido por leveduras durante a fermentação, está relacionado à desintoxicação de metais pesados, sincronia e longevidade populacional (Hou et al., 2023b). Embora frequentemente tratado como um subproduto indesejado, estudos indicam que pode exercer funções fisiológicas importantes para a célula. No entanto, sua atuação biológica ainda não é totalmente compreendida, e os mecanismos moleculares que explicam esses efeitos permanecem pouco explorados (Espinoza-Simón et al., 2022). A maioria das pesquisas concentra-se em estratégias para controlar sua formação durante a fermentação (Tesfaye, Tefera e Muleta, 2025).

Em leveduras, o H_2S é produzido principalmente pela assimilação de sulfato e pelo catabolismo de aminoácidos sulfurados, como a cisteína, além da degradação de resíduos de fungicidas à base de enxofre, especialmente em ambientes anaeróbicos e ácidos. Durante a fermentação, atua como intermediário na biossíntese de aminoácidos, mas parte é despreendida com o CO_2 (Hou et al, 2023). Entre os metabólitos formados na fermentação, os compostos voláteis de enxofre (CVEs) têm papel central no aroma de bebidas alcoólicas, podendo gerar notas agradáveis ou indesejáveis, conforme sua natureza e concentração (De Guidi et al, 2021).

O sulfeto de hidrogênio (H_2S) pode trazer odor de ovo podre para bebidas, sendo um dos CVEs mais impactantes, capaz até de sobrepor aromas frutados e florais mesmo em baixas concentrações devido à sua alta volatilidade e baixo limiar sensorial. Em excesso, também apresenta toxicidade intestinal e afeta o equilíbrio da microbiota (Bitew et al., 2024). Em níveis elevados de exposição (>500 ppm), o H_2S pode levar à perda de consciência e à morte,

principalmente devido à sua capacidade de inibir enzimas essenciais, como a citocromo c oxidase, Na^+/K^+ -ATPase, anidrase carbônica e monoamina oxidase (Cao et al., 2019).

A detecção em laboratório envolve reações de redução da molécula de sulfeto de hidrogênio utilizando meios de cultivo específicos (De Vero, Solieri e Giudici, 2011). Sendo assim, o H_2S produzido por leveduras que foram inicialmente cultivadas em meio de cultura contendo acetato de chumbo reage entre si por meio de reações de oxirredução, resultando em sulfeto de chumbo, precipitado de coloração preta, indicativo de resultado positivo para este parâmetro (Thakur, Anokhe e Kalia, 2021). Na produção de cachaça, o contato com o cobre durante a destilação reduz a concentração de H_2S (Allison, Montgomery e Sacks, 2022).

5.2. Tolerância a diferentes estresses inerentes ao processo fermentativo

Células microbianas estão constantemente expostas a estresses ambientais, como baixas ou altas temperaturas, escassez de nutrientes, variações de pH e pressão osmótica, além da presença de compostos tóxicos e radicais livres (Ribeiro, Bourbon-Melo e Sá-Correia, 2022). Tais condições geralmente causam danos a macromoléculas essenciais, promovendo a desnaturação de proteínas, a formação de estruturas anormais e o acúmulo de agregados proteicos potencialmente tóxicos (Lin, Xu e Yu, 2022). Para sobreviver a essas condições adversas, os microrganismos desenvolveram mecanismos de resposta ao estresse que os permitem manter a viabilidade e a homeostase celular (Takagi, 2021) (Figura 4). A ativação dessas defesas é controlada por vias de sinalização que reconhecem os estímulos ambientais e desencadeiam ajustes transcricionais e pós-traducionais (Walker e Basso, 2020). Elementos de resposta ao estresse são modulados em diversas condições, incluindo estresse oxidativo, choque térmico, pH baixo, deficiência de nitrogênio, presença de ácidos fracos e acúmulo de etanol (Chen et al., 2025).

Entre os principais desafios enfrentados, o estresse osmótico destaca-se por inibir o crescimento e reduzir a produtividade fermentativa (Jin et al., 2022). Em meios hipertônicos, caracterizados por altas concentrações de solutos, como açúcares, ocorre a saída de água das células por osmose, resultando na redução do volume celular (Saldaña et al., 2021). A adaptação a essa situação, envolve a regulação de genes relacionados à resposta ao estresse osmótico, incluindo a síntese e o acúmulo de glicerol e trealose como soluto compatível, permitindo a restauração do equilíbrio osmótico intracelular (Betlej et al., 2020).

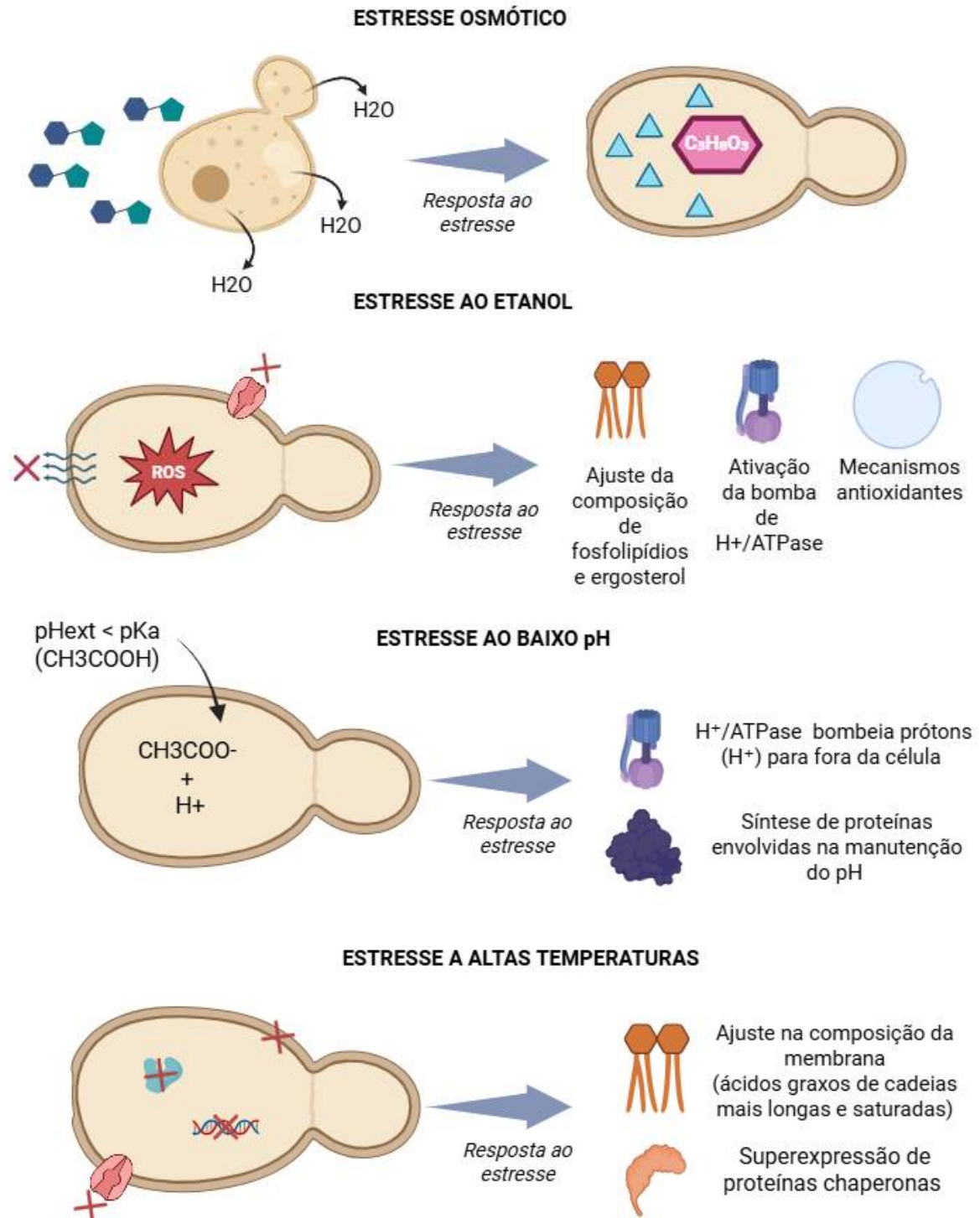
O acúmulo de etanol no meio promove a redução progressiva da atividade fermentativa, mesmo na presença de açúcares residuais, devido aos efeitos tóxicos desse metabólito sobre as

células de levedura (Sahana et al., 2024). Esse estresse compromete a integridade celular ao fluidificar a membrana e alterar sua composição lipídica, induzir acidificação citoplasmática, gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) e prejudicar organelas e processos de transporte intracelular (Huffer et al., 2011; Navarro-Tapia, Querol e Pérez-Torrado, 2018). Como contramedida, a levedura ajusta sua composição de fosfolipídios e ergosterol, ativa a bomba H^+ /ATPase, intensifica mecanismos antioxidantes e mobiliza organelas como vacúolos, peroxissomos e endossomos, além de componentes do citoesqueleto, assegurando a viabilidade celular e a continuidade da produção de etanol (Charoenbhakdi et al., 2016).

O pH do meio extracelular (pH_{ex}) também exerce papel crucial durante a fermentação, podendo variar devido à acidificação natural do meio ou a condições de processo (Lucena et al., 2020). Embora a membrana citoplasmática seja praticamente impermeável a prótons, mudanças ambientais podem desestabilizar o pH citosólico, cuja regulação é essencial para a homeostase (Guaragnella e Bettiga, 2021). O gradiente de prótons na membrana é indispensável à captação de nutrientes e também regula o transporte de ácidos orgânicos, como o ácido acético, em função da composição do meio e da fase de crescimento (Babst, 2020; Antunes et al., 2023). Por exemplo, em pH_{ex} abaixo do valor de pK_a , o ácido acético permanece na forma não dissociada, difundindo-se livremente pela membrana; acima do valor de pK_a , predomina como ânion acetato, entrando na célula via simportadores de prótons (Antunes e Sá-Correia, 2024). Após a entrada do ácido não dissociado no citosol, com o pH mais neutro ele se dissocia (acetato + H^+), causando acidificação citoplasmática (Giannattasio et al., 2013). Como estratégia para minimizar os efeitos negativos da acidificação do ambiente intracelular, a enzima H^+ /ATPase usa ATP para bombear prótons (H^+) para fora da célula, ajudando a manter o pH citoplasmático próximo da neutralidade (Kobi e Martin, 2022). Além disso, vias de sinalização que induzem genes relacionados à resposta ao estresse ácido são ativadas, aumentando a produção de proteínas envolvidas na manutenção do pH (Mira et al., 2010).

A exposição a altas temperaturas representa outro desafio crítico, pois induz agregação proteica, reduz a atividade enzimática e compromete macromoléculas, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e fosfolipídios, além de afetar a parede celular, a membrana plasmática e o vacúolo (Lin, Xu e Yu, 2022). Em resposta, a levedura ativa a resposta ao choque térmico, caracterizada pela superexpressão de proteínas chaperonas que auxiliam no correto dobramento de proteínas desnaturadas (Eardley e Timson, 2020). Simultaneamente, ocorrem ajustes na composição da membrana, como a substituição de ácidos graxos curtos e insaturados por cadeias mais longas e saturadas; em algumas cepas evoluídas artificialmente, observa-se ainda a produção de fecosterol em substituição ao ergosterol, conferindo maior rigidez e

termotolerância (Lin, Xu e Yu, 2022). Em aplicações industriais, o estresse térmico pode ser mitigado pelo controle da temperatura nos biorreatores ou pelo uso de cepas termotolerantes, que, além de resistirem ao calor, frequentemente exibem maior tolerância a elevadas concentrações de etanol (Prado et al., 2020).



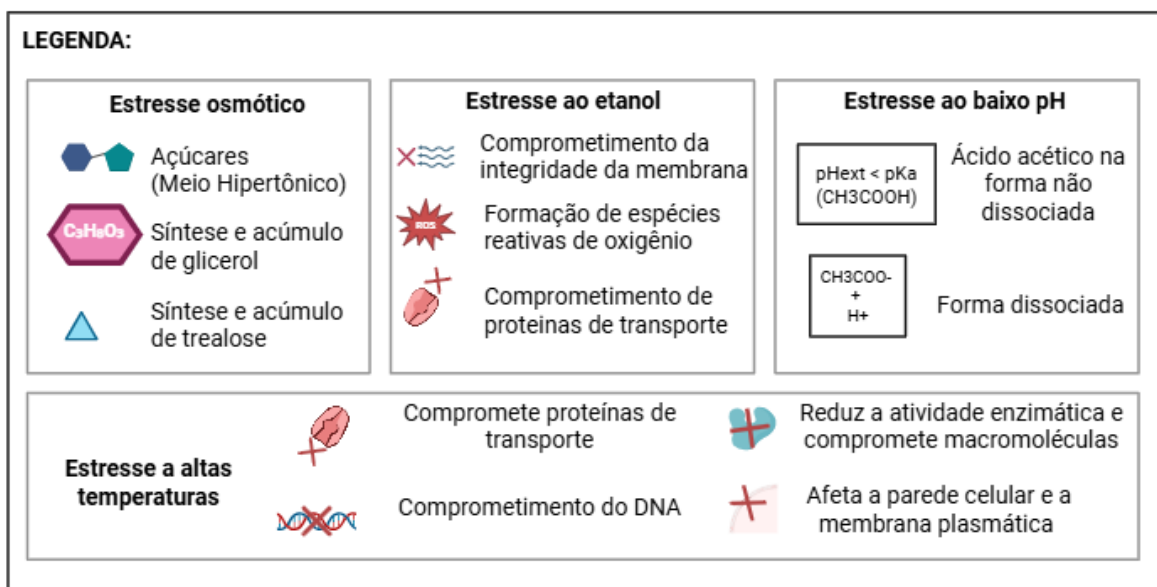


Figura 4. Esquemas ilustrativos das principais consequências dos estresses em leveduras e seus mecanismos de adaptação celular. Elaborado pelos autores com Biorender.

5.3. Capacidade de fermentação e atividade invertásica

Leveduras possuem um sistema eficiente para a metabolização de açúcares amplamente empregado em processos industriais, onde o caldo de cana-de-açúcar é usado como matéria-prima na produção de etanol, aguardente ou cachaça. O caldo de cana-de-açúcar é rico em sacarose, variando entre 14 a 24 °Brix (Cardoso, 2020), uma das fontes de carbono mais acessíveis economicamente; sua metabolização envolve, principalmente, a ação da enzima invertase, também conhecida como β -frutofuranosidase, que, por sua vez, catalisa a hidrólise irreversível da sacarose em glicose e frutose (Zhao et al., 2023). Esses monossacarídeos são então transportados para o interior da célula por meio de transportadores de hexose (HXT) e direcionados à via glicolítica, onde são convertidos em piruvato. O piruvato, por sua vez, é descarboxilado a acetaldeído com liberação de CO₂ e posteriormente reduzido a etanol pela ação da enzima álcool desidrogenase (Nelson e Cox, 2014; Camargo et al., 2018).

Do ponto de vista fisiológico, *S. cerevisiae* se destaca no estudo da atividade invertásica, cuja síntese é codificada por uma família de genes *SUC*, localizados em regiões subteloméricas (Naumova et al., 2013). O gene *SUC2*, presente na maioria das cepas, é considerado o *locus* ancestral dessa família. Ele dá origem a dois tipos de RNA mensageiro: um transcrito maior (1,9 kb) que inclui uma sequência sinal responsável pela secreção da invertase extracelular (ou periplasmática), e um transcrito menor (1,8 kb) que gera a forma intracelular da enzima, que

permanece no citoplasma (Carlson e Botstein, 1982; Muller et al., 2023), como pode ser observado na Figura 5.

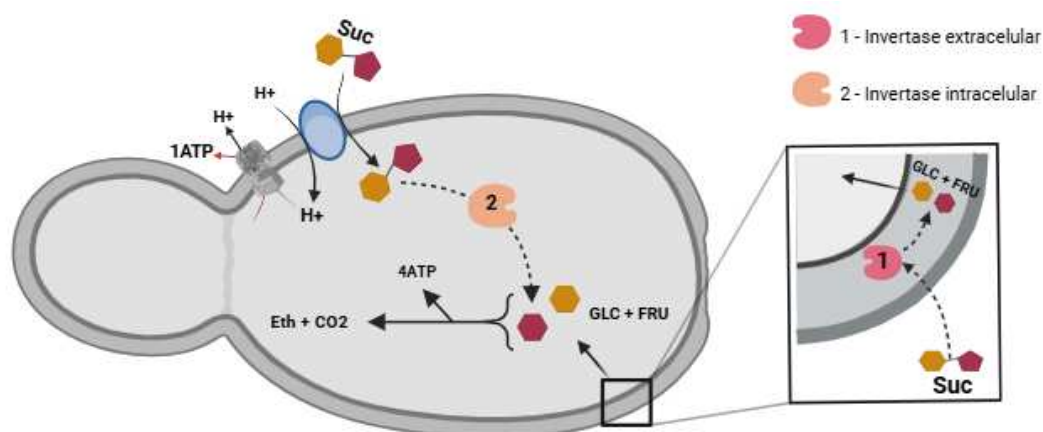


Figura 5. Esquemática da atividade enzimática invertásica extracelular e intracelular em *S. cerevisiae*. Suc: Sacarose, GLC: Glicose, FRU: Frutose, Eth: Etanol. Elaborado pelos autores com Biorender.

A invertase extracelular, com massa aproximada de 270 kDa e ligada à parede celular por meio de mananas (polímeros de manose), representa mais de 90% da atividade total da enzima em condições onde não há repressão por glicose (Vitolo, 2021; Zhao et al., 2023). Já a forma intracelular, com cerca de 135 kDa, é expressa de forma constitutiva (Neigeborn e Carlson, 1987; Basso, 2011). A coexistência de formas intra e extracelulares da enzima invertase em leveduras, particularmente em *S. cerevisiae*, pode constituir uma estratégia adaptativa relacionada à flexibilidade metabólica. Acredita-se que a forma intracelular, cuja expressão ocorre de maneira constitutiva, desempenhe um papel de salvaguarda metabólica, assegurando a hidrólise da sacarose mesmo sob condições em que a secreção da invertase extracelular esteja prejudicada, como em situações de estresse ambiental, mutações genéticas ou sobrecarga da via secretora (Osiebe, Adewale e Omafuvbe, 2023). Adicionalmente, postula-se que, em transições de fontes de carbono, como da glicose para a sacarose, a presença pré-existente da invertase intracelular possa conferir uma vantagem funcional, ao possibilitar uma resposta metabólica imediata até que a forma extracelular seja devidamente induzida e funcionalmente ativa (Muller et al., 2023).

Do ponto de vista bioquímico e industrial, a forma como a sacarose é metabolizada impacta o rendimento de produtos fermentativos. Quando a sacarose é transportada intacta para o interior celular por sistemas de simporte (H^+ /sacarose), há um custo energético, o que reduz a geração de biomassa (Van Aalst et al., 2022). No entanto, esse consumo de energia pode ser

compensado por um maior aproveitamento da sacarose e aumento na produção de etanol, o que torna essa via interessante em aplicações biotecnológicas específicas.

5.4. Perfil de floculação de leveduras

A floculação em leveduras constitui um fenômeno biológico fundamental em diversos processos fermentativos industriais, como na produção de cachaça. Esse processo caracteriza-se pela junção reversível de células, formando agregados que precipitam espontaneamente em meio líquido (Mehta et al., 2020). Do ponto de vista tecnológico, a floculação representa uma alternativa economicamente vantajosa para a separação da biomassa celular, dispensando métodos dispendiosos como centrifugação e filtração (Verstrepen et al., 2003; Hou et al., 2023a). O processo de floculação é regulado por genes da família *FLO*, como *FLO1*, *FLO5*, *FLO8* e *FLO11*, que codificam proteínas da parede celular denominadas floculinas (De et al., 2025). Estas proteínas reconhecem e se ligam a manoproteínas da parede celular de células adjacentes por meio de domínios de ligação a glicoproteínas (Smukalla et al., 2008). A expressão dos genes *FLO* é altamente dependente de condições ambientais, como pH, agitação, temperatura e disponibilidade de nutrientes (Bauer, Govender e Bester, 2010; Mehta et al., 2020). Dentre esses fatores, a presença de íons cálcio (Ca^{2+}) é essencial, pois esses cátions atuam como cofatores, promovendo a adesão entre as floculinas e os ligantes da superfície celular, estabilizando os flocos formados (De Figueiredo et al., 2021) (Figura 6).

Um aspecto crítico na regulação da floculação é a localização genômica dos genes *FLO*, que estão situados predominantemente em regiões subteloméricas dos cromossomos (Di Gianvito et al., 2017). Essas regiões são reconhecidas por sua elevada instabilidade genética, propensas a recombinações, silenciamento epigenético e rearranjos estruturais. Como consequência, cepas geneticamente idênticas podem exibir padrões de floculação distintos ao longo de ciclos fermentativos sucessivos (Verstrepen et al., 2003). A atividade transcricional dos genes *FLO* também é sensível ao estado nutricional do meio. A privação de nitrogênio e aminoácidos tem sido associada ao aumento da floculação, assim como condições de estresse, como variações de temperatura, aumento do teor alcoólico e oscilações no pH do meio (Govender et al., 2008; Hou et al., 2023a). Alterações na integridade da parede celular, seja por mutações ou por fatores ambientais, também impactam diretamente a capacidade floculante da levedura (Sariki et al., 2023).

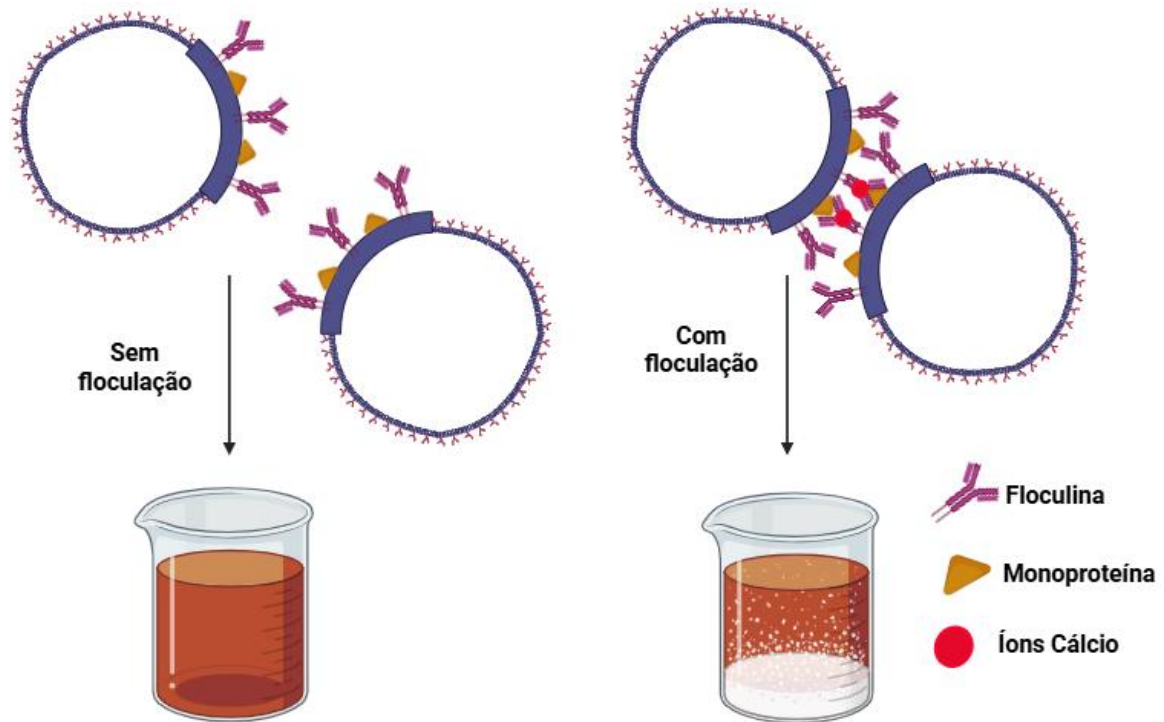


Figura 6. Sistema de associação de células envolvendo a ligação entre floculinas, manoproteínas e íons cálcio. Elaborada pelos autores com Biorender.

Estudos ômicos recentes demonstram que cepas floculantes apresentam maior resistência ao estresse ambiental (Hou et al., 2023a). Análises transcriptômicas identificaram a regulação positiva de genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo, à pressão osmótica e à limitação de nutrientes em cepas floculantes, quando comparadas às não floculantes (Li et al., 2017; Zhao et al., 2015). Essa associação entre flocação e robustez celular confere vantagens competitivas em processos fermentativos prolongados e de alta carga celular (Pangestu et al., 2024). Na indústria cervejeira, a flocação adequada é uma característica desejável, pois facilita a clarificação do produto e permite a reutilização da biomassa celular em ciclos sucessivos de fermentação (Verbelen et al., 2006). Na produção de cachaça, o controle do fenótipo floculante também apresenta vantagens significativas. A rápida sedimentação das células floculantes ao final da fermentação contribui para a recuperação eficiente da levedura e para a obtenção de um vinho de cana com menor turbidez (Oliveira et al., 2008; Alvarez et al., 2014).

A flocação é um fenômeno multifatorial de relevância biotecnológica. A compreensão dos mecanismos moleculares que controlam esse processo, especialmente aqueles relacionados à expressão e regulação dos genes *FLO*, é essencial para otimizar processos fermentativos em diferentes setores industriais. Apesar dos avanços proporcionados por técnicas de biologia

molecular e análises ômicas, a complexidade genética e ambiental do processo ainda representa um desafio técnico considerável (Hou et al., 2023a). Investimentos em pesquisas genômicas e ferramentas de engenharia metabólica poderão, no futuro, permitir o desenvolvimento de cepas com flocculação mais estável e controlável, adaptadas a diferentes aplicações industriais.

6. NOVAS ESTRATÉGIAS NO ESTUDO DE POTENCIALIZAR A ATIVIDADE FISIOLÓGICA DE LEVEDURAS

O advento da microbiologia industrial moderna, aliado aos avanços da bioquímica e das técnicas de manipulação genética, permitiu o desenvolvimento de linhagens microbianas otimizadas para aplicações específicas (Martin e Lindner, 2022). Com isso, o uso de leveduras previamente selecionadas tornou-se uma estratégia fundamental para garantir resultados promissores no desenvolvimento de linhagens com eficiência fermentativa, padronização sensorial e resiliência a condições adversas nos processos industriais (Badotti et al., 2014). A seleção de cepas autóctones permite identificar microrganismos já adaptados ao ambiente de produção e que possam contribuir para a complexidade sensorial do produto final (Conceição et al., 2015; Palladino et al., 2023). A melhoria dessas linhagens pode ser alcançada por diferentes abordagens, como por exemplo, a engenharia genética através da técnica de DNA recombinante, seleção, evolução adaptativa e a aplicação de técnicas ômicas.

A manipulação do DNA por meio de técnicas como mutagênese e transformação permite o aprimoramento de características desejáveis em microrganismos, como o incremento na produção de metabólitos e a redução de compostos indesejáveis (Astola et al., 2023). Embora o uso de DNA recombinante seja comum em diversas aplicações industriais, ainda enfrenta barreiras regulatórias e de aceitação no setor de alimentos e bebidas (Lee et al., 2022). Por isso, métodos alternativos têm sido cada vez mais explorados.

A evolução adaptativa é um processo natural que favorece leveduras com características vantajosas para o ambiente de fermentação, como resistência ao etanol, variações de temperatura e pH, e a capacidade de competir com microrganismos contaminantes (Wallace-Salinas e Gorwa-Grauslund, 2013). Esse processo pode resultar em cepas mais eficientes; Carneiro (2018) observou que leveduras adaptadas consumiram mais açúcares, produziram mais etanol e reduziram a produção de ácido acético, conseqüentemente, aumentando a produtividade e a eficiência fermentativa do fermentado a base de Jabuticaba. Além disso, a evolução adaptativa apresenta vantagens sobre a edição genética, sendo mais econômica e com menos controvérsias regulatórias (Zhang et al., 2019). Portanto, essa metodologia que tem como

base a seleção natural, representa uma abordagem eficiente para otimizar as leveduras na produção de cachaça, promovendo tanto a melhoria da qualidade sensorial quanto a eficiência do processo de fermentação. Essa adaptação é fundamental para otimizar processos fermentativos em indústrias de bebidas alcoólicas, onde as altas concentrações de etanol podem inibir a atividade celular, mas também potencializam o rendimento do produto final (Kruasuwan et al., 2023).

Além disso, as abordagens ômicas têm revolucionado o estudo de leveduras ao permitir a análise sistêmica de suas vias metabólicas (Afshari et al., 2020). A genômica auxilia na identificação de genes associados a características desejáveis, enquanto a transcriptômica revela padrões de expressão gênica sob diferentes condições de cultivo (Rossouw et al., 2009; Love et al., 2016). A metabolômica permite a caracterização dos compostos produzidos e consumidos durante a fermentação (Cambiaghi, Ferrario e Masseroli, 2017), e a proteômica por sua vez, analisa a expressão e modificação de proteínas envolvidas nos processos metabólicos (Shevchenko et al., 2014). Combinadas, essas ferramentas fornecem uma base robusta para a engenharia racional de linhagens ou seleção dirigida de cepas otimizadas (Afshari et al., 2020).

A integração entre estratégias tradicionais de seleção e domesticação de leveduras com abordagens modernas baseadas em ômica tem ampliado significativamente o potencial de otimização de microrganismos para a produção de bebidas fermentadas (Martin e Lindner, 2022). Seja por métodos naturais como a evolução adaptativa, ou por intervenções mais diretas via engenharia genética, essas ferramentas são essenciais para atender às demandas crescentes por qualidade, rendimento e diferenciação sensorial no setor de bebidas alcoólicas.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de cachaça está intrinsecamente associada à atividade metabólica das leveduras, que exercem papel central na definição da eficiência fermentativa e da qualidade sensorial da bebida. Esta revisão evidencia que a escolha adequada da levedura, o manejo do fermento e o controle das condições de processo são fatores determinantes para o equilíbrio entre rendimento alcoólico e formação de compostos voláteis. A aplicação de leveduras selecionadas, representa uma estratégia eficaz para otimizar o processo fermentativo e na valorização do caráter regional da cachaça.

A identificação e caracterização de leveduras autóctones, adaptadas aos diferentes *terroirs* brasileiros, podem contribuir para a criação de perfis sensoriais singulares, fortalecendo a identidade da bebida e seu potencial de exportação. As perspectivas apontam para o uso

crescente de abordagens ômicas, evolução adaptativa e engenharia metabólica no melhoramento de linhagens. Além disso, a adoção de culturas iniciadoras padronizadas e o monitoramento molecular das fermentações tendem a garantir maior reprodutibilidade e segurança ao processo. Assim, o avanço na seleção de leveduras constitui um pilar fundamental para o aprimoramento da qualidade, da competitividade e da sustentabilidade da cachaça brasileira no cenário global.

REFERÊNCIAS

- AFSHARI, R.; PILIDGE, C.J.; READ, E. et al. New insights into cheddar cheese microbiota-metabolome relationships revealed by integrative analysis of multi-omics data. **Science Reports**, v. 10, p. 1-13, 2020.
- ALCARDE, A.R. *Cachaça: Ciência, Tecnologia e Arte*. São Paulo: **Blucher**, 2017.
- ALENCAR, B.R.A.; DE FREIRAS, R.A.A.; GUIMARÃES, V.E.P. et al. *Meyerozyma caribbica* isolated from vinasse-irrigated sugarcane plantation soil. **J. Fungi**, v.9, p. 789, 2023. doi: <https://doi.org/10.3390/jof9080789>
- ALLISON, R.B.; MONTGOMERY, A.; SACKS, G.L. Analysis of free hydrogen sulfide in wines using gas detection tubes. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 6, p. 1-8, 2022. doi: <https://doi.org/10.5344/catalyst.2021.21003>
- ALVARENGA, F.B.M. **Co-Cultivo de bactérias ácido lácticas e *Saccharomyces cerevisiae* para melhoria do processo fermentativo de produção de cachaça**. (Tese de doutorado), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2023.
- ALVAREZ, F.; CORREA, L.F.M.; ARAÚJO, T.M. et al. Variable flocculation profiles of yeast strains isolated from cachaça distilleries. **Int J Food Microbiol.** v. 3, p. 97-104, 2014. doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.024](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.024).
- AMORIM, J.C.; SCHWAN, R.F.; DUARTE, W.F. Sugar cane spirit (cachaça): Effects of mixed inoculum of yeasts on the sensory and chemical characteristics. **Food Research International**, v. 85, p. 76-83, 2016. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.014>.
- ANTUNES, M.; KALE, D.; SYCHROVÁ, H. et al. The Hrk1 kinase is a determinant of acetic acid tolerance in yeast by modulating H⁺ and K⁺ homeostasis. **Microbial Cell**, v. 10, n. 12, p. 261 - 276, 2023. doi: [10.15698/mic2023.12.809](https://doi.org/10.15698/mic2023.12.809).
- ANTUNES, M.; SÁ-CORREIA, I. The role of ion homeostasis in adaptation and tolerance to acetic acid stress in yeasts. **FEMS Yeast Res.** v. 16, p. 9-24, 2024. doi: [10.1093/femsyr/foae016](https://doi.org/10.1093/femsyr/foae016).
- ASTOLA, A.; DURÁN-GUERRERO, E.; DÍAZ, A.B. et al. Impact of the genetic improvement of fermenting yeasts on the organoleptic properties of beer. **Eur Food Res Technol.**, v. 249, p. 1677–1687, 2023. doi: <https://doi.org/10.1007/s00217-023-04251-8>
- BABST, M. Regulation of nutrient transporters by metabolic and environmental stresses. **Curr Opin Cell Biol.**, v. 65, p. 35-41, 2020. doi: [10.1016/j.ceb.2020.02.009](https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.02.009).
- BADOTTI, F.; GOMES, F.C.; TEODORO, M.M. et al. Electrospray ionization mass spectrometry characterization of musts and alembic brazilian cachaças using selected yeast strains. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 4, 2014.
- BARBOSA, E.A.; SOUZA, M.T.; DINIZ, R.H. et al. Quality improvement and geographical indication of cachaça (Brazilian spirit) by using locally selected yeast strains. **J Appl Microbiol.**, v. 121, n. 4, p. 51-1038, 2016. doi: [10.1111/jam.13216](https://doi.org/10.1111/jam.13216).

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS yeast research**, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x>.

BASSO, T.O. **Melhoramento da fermentação alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae* por engenharia evolutiva**. (Tese de Doutorado), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

BAUER, F.F.; GOVENDER, P.; BESTER, M.C. Yeast flocculation and its biotechnological relevance. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 88, p. 31–39, 2010. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2783-0>

BELLOCH, C.; ORLIC, S.; BARRIO, E. et al. Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, n. 1, p. 188-195, 2008. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.083

BETLEJ, G.; BATOR, E.; OKLEIEWICZ, B. et al. Long-term adaption to high osmotic stress as a tool for improving enological characteristics in industrial wine yeast. **Genes**, v. 11, p. 576, 2020. doi: <https://doi.org/10.3390/genes11050576>

BITEW, D.; DAMTEW, B.; TESFAYE, A. et al. Isolation of yeast from some Ethiopian traditional fermented beverages and in vitro evaluation for probiotic traits. **Heliyon**, v. 10, p. 23, 2024. doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e40520>

BORTOLETTO, A.M.; ALCARDE, A.R. Congeners in sugar cane spirits aged in casks of different woods. **Food Chemistry**, v. 139, p. 695-701, 2013.

BORTOLETTO, A.M.; ALCARDE, A.R. Assessment of chemical quality of Brazilian sugar cane spirits and cachaças. **Food Control**, v. 54, p. 1-6, 2015.

BORTOLETTO, A.M.; CORREA, A.C.; ALCARDE, A.R. Aging practices influence chemical and sensory quality of cachaça. **Food Research International**, v. 86, p. 46-53, 2016.

BRASIL. **Anuário da Cachaça de 2025 – Referência a 2024**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, 2025.

BRASIL. **Instrução Normativa n. 539, de 26 de dezembro de 2022**. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana para Cachaça. Publicado no Diário Oficial da União de 26/12/2022, Seção 1, Página 3. Disponível em www.agricultura.gov.br.

BREXÓ, R.P.; BRANDÃO, L.R.; CHAVES, R.D. et al. Yeasts from indigenous culture for cachaça production and brewer's spent grain: Biodiversity and phenotypic characterization for biotechnological purposes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 2, p. 124, 2020. doi:10.1016/j.fbp.2020.08.006

CAMARGO, J.Z.; NASCIMENTO, V.M.; SREFANELLO, I. et al. Biochemical evaluation, molecular characterization and identification of novel yeast strains isolated from Brazilian savannah fruits, chicken litter and a sugar and alcohol mill with biotechnological potential for biofuel and food industries. **Biocatal Agric Biotechnol**, v. 16, p. 390-399, 2018.

CAMBIAGHI, A.; FERRARIO, M.; MASSEROLI, M. Analysis of metabolomic data: tools, current strategies and future challenges for omics data integration. **Briefings in Bioinformatics**, v. 18, p. 498-510, 2017.

CAMPOS, A.C.S.; ARAÚJO, T.M.; MORAES, L. et al. Selected cachaça yeast strains share a genomic profile related to traits relevant to industrial fermentation processes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 90, n. 1, p. e01759-23, 2024. doi: <https://doi.org/10.1128/aem.01759-23>.

CAMPOS, C.R.; SILVA, C.F.; DIAS, D.R. et al. Features of *Saccharomyces cerevisiae* as a culture starter for the production of the distilled sugar cane beverage, cachaça in Brazil. **J Appl Microbiol.**, v. 108, n. 6, p. 1871-9, 2010. doi: [10.1111/j.1365-2672.2009.04587.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04587.x).

CANONICO, L.; GALLI, E.; AGARBATI, A. et al. *Starmerella bombicola* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine sequential fermentation in aeration condition: Evaluation of ethanol reduction and analytical profile. **Foods**, v. 11, n. 5, p. 10-47, 2021. doi: <https://doi.org/10.3390/foods10051047>.

CAO, X.; DING, L.; XIE, Z.Z. et al. A review of hydrogen sulfide synthesis, metabolism, and measurement: is modulation of hydrogen sulfide a novel therapeutic for cancer?. **Antioxidants & redox signaling**, v. 31, n. 1, p. 1-38, 2019. doi: <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7058>

CARDOSO, M.D.G. Produção de aguardente de cana. 4 ed., rev. e ampl. **Lavras: UFLA**, 2020.

CARLOS, L.; OLITTA, T.; NITSCHKE, S. Ethanol production in Brazil: The industrial process and its impact on yeast fermentation. **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**, 2011. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/17047>

CARLSON, M.; BOTSTEIN, D. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted with intracellular forms of yeast invertase. **Cell**. v. 28, n. 1, p. 145-54, 1982. doi: [10.1016/0092-8674\(82\)90384-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90384-1).

CARNEIRO, J.E.S. **Evolução adaptativa da *Saccharomyces cerevisiae* e estudo do seu comportamento em co-cultura na produção de bebida fermentada de jabuticaba.** (Dissertação de Mestrado), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018.

CHAROENBHAKDI, S.; DOKPIKUL, T.; BURPHAN, T. et al. Vacuolar H⁺-ATPase Protects *Saccharomyces cerevisiae* cells against ethanol-induced oxidative and cell wall stresses. **Appl Environ Microbiol.** v. 10, n. 2, p. 3121-3130, 2016. doi: [10.1128/AEM.00376-16](https://doi.org/10.1128/AEM.00376-16).

CHEN, R.R.; WANG, L.; JI, X.X. et al. Identification of key transcription factors, including *DAL80* and *CRZ1*, involved in heat and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Biofuels Bioprod.** v. 18, p. 50, 2025. doi: <https://doi.org/10.1186/s13068-025-02653-2>.

CIANI, M.; CANONICO, L.; COMITINI, F. Improving white wine aroma and structure by non-Saccharomyces yeasts. **White wine technology**, p. 117-130, 2022. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823497-6.00020-X>.

COLLINS, J.H.; KEATING, K.W.; JONES, T.R.; BALAJI, S. et al. Engineered yeast genomes accurately assembled from pure and mixed samples. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 14-85, 2021.

CONCEIÇÃO, L.E.F.R.; SARAIVA, M.A.F.; DINIZ, R.H.S. et al. Biotechnological potential of yeast isolates from cachaça: the Brazilian spirit. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 237–246, 2015. doi: 10.1007/s10295-014-1528-y

DA SILVA, L.R.H.; FERNANDES, F.S.; SANTOS, J.P. et al. Bioprospecting *Saccharomyces cerevisiae* in fruits from Amazonian region for beer brewing. **AIMS Bioengineering**, v. 11, n. 2, p. 130-146, 2024.

DE FIGUEIREDO, C.M.; HOCK, D.H.; TRICHEZ, D. et al. High foam phenotypic diversity and variability in flocculant gene observed for various yeast cell surfaces present as industrial contaminants. **Fermentation**, v. 7, p. 127, 2021. doi: <https://doi.org/10.3390/fermentation7030127>

DE GUIDI, I.; FARINES, V.; LEGRAS, J. et al. Development of a new assay for measuring H₂S production during alcoholic fermentation: Application to the evaluation of the main factors impacting H₂S production by three *Saccharomyces cerevisiae* wine Strains. **Fermentation**, v. 7, n. 4, p. 213, 2021. doi: <https://doi.org/10.3390/fermentation7040213>.

DE SOUZA, A.P.; VICENTE, M.A.; KLEIN, R. et al. Strategies to select yeast starters cultures for production of flavor compounds in cachaça fermentations. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 2, p. 379-92, 2012. doi: 10.1007/s10482-011-9643-5.

DE, S.; STADLMAYER, G.; REBNEGGER, C. et al. Flo5-1 and Nrg1 are involved in reversible pH-dependent flocculation in *Komagataella phaffii*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 109, p. 178, 2025. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-025-13562-7>

DE VERO, L.; SOLIERI, L.; GIUDICI, P. Evolution-based strategy to generate nongenetically modified organisms *Saccharomyces cerevisiae* strains impaired in sulfate assimilation pathway. **Letters in Applied Microbiology**. v. 53, n. 5, p. 572-575. 2011.

DELGADO-OSPINA, J.; TRIBOLETTI, S.; ALESSANDRIA, V. et al. Functional biodiversity of yeasts isolated from Colombian fermented and dry cocoa beans. **Microorganisms**, v. 8, n. 7, p. 10-86, 2020.

DI GIANVITO, P.; TESNIÈREM, C.; SUZZI, G. et al. FLO5 gene controls flocculation phenotype and adhesive properties in a *Saccharomyces cerevisiae* sparkling wine strain. **Sci Rep.**, v. 7, p. 86-107, 2017. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09990-9>

EARDLEY, J.; TIMSON, D.J. Yeast cellular stress: impacts on bioethanol production. **Fermentation**, v. 6, n. 4, p. 109, 2020. doi: <https://doi.org/10.3390/fermentation6040109>

ESPINOZA-SIMÓN, E.; MORENO-ÁLVAREZ, P.; NIETO-ZARAGOZA, E. et al. Self-produced hydrogen sulfide improves ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and other yeast species. **Fermentation**, v. 8, n. 10, p. 505, 2022. doi: <https://doi.org/10.1093/femsyr/foad031>.

- FERREIRA-D'SILVA, A.; BADOTTI, F.; PINHEIRO, C.S.R. et al. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated of the spontaneous fermentation of cachaça from northeastern Brazil. **Braz. J. of Develop.**, v. 5, n. 11, p. 27448-27461, 2019. doi: 10.34117/bjdv5n11-348
- GALLONE, B.; STEENSELS, J.; PRAHL, T. et al. Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts. **Cell**, v. 166, n. 6, p. 1397-1410. e16, 2016. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.020>.
- GIANNATTASIO, S.; GUARAGNELLA, N.; ZDRALEVIC, M. et al. Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. **Front Microbiol.** v. 20, n. 4, p. 33, 2013. doi: 10.3389/fmicb.2013.00033.
- GONÇALVES, C.M.; CARVALHO, S.; NETO, A.G. et al. Produção e análise química de cachaça de alambique a partir de cepa selecionada de *Saccharomyces cerevisiae*. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 37, n. 2, 2019.
- GOVENDER, P.; DOMINGO, J.L.; BESTER, M.C. et al. Controlled expression of the dominant flocculation gene FLO1 in wine yeast. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 6, p. 833–845, 2008.
- GUARAGNELLA, N.; BETTIGA, M. Acetic acid stress in budding yeast: From molecular mechanisms to applications. **Yeast**, v. 38, n. 7, p. 391-400, 2021. doi: <https://doi.org/10.1002/yea.3651>
- HOU, R.; JELLEY, R.E.; VAN LEEUWEN, K.A. et al. Hydrogen sulfide production during early yeast fermentation correlates with volatile sulfur compound biogenesis but not thiol release. **FEMS Yeast Research**, v. 23, 2023. doi: <https://doi.org/10.1093/femsyr/foad031>
- HUFFER, S.; CLARK, M.E.; NING, J.C. et al. Role of alcohols in growth, lipid composition, and membrane fluidity of yeasts, bacteria, and Archaea. **Appl Environ Microbiol**, v. 77, 2011. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.00694-11>
- JANZANTTI, N.S. **Compostos voláteis e qualidade de sabor da cachaça.** (Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2004.
- JIN, X.; CHEN, M.; COLDEA, T.E. et al. Protective effects of peptides on the cell wall structure of yeast under osmotic stress. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 21, p. 7051-7061, 2022. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12073-z>
- JIRANEK, V. The prospect of superior yeast for winemaking: recent successes through bioprospecting. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 90, p. 103-200, 2024.
- KOBI, J.S.; MARTIN, K. Regulation of yeast Snf1 (AMPK) by a polyhistidine containing pH sensing module. **iScience**, v. 25, n. 10, p. 105-083, 2022. doi: 10.1016/j.isci.2022.105083.
- KRUASUWAN, W.; PUSEENAM, A.; AM-IN, S. et al. Evaluation of thermotolerant and ethanol-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* as an alternative strain for bioethanol production from industrial feedstocks. **Biotech.**, v. 1, p. 13-23, 2023. doi: 10.1007/s13205-022-03436-4

LACHANCE, M.A.; DANIEL, H.M.; MEYER, W. et al. The D1/D2 domain of the large subunit of yeast species rDNA is unusually polymorphic. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 3, p. 253-258, 2003. doi:10.1016/S1567-1356(03)00113-2

LEE, Y.G.; KIM, B.Y.; BAE, J.M. et al. Genome-edited *Saccharomyces cerevisiae* strains for improving quality, safety, and flavor of fermented foods. **Food Microbiology**, v. 104, 2022.

LI, J.; WANG, J.; ZHAO, M. Comparative transcriptome analysis of flocculating and non-flocculating yeast reveals molecular mechanisms of flocculation and stress tolerance. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 44, n. 8, p. 1083–1095, 2017.

LIN, N.X.; XU, Y.; YU, X.W. Overview of yeast environmental stress response pathways and the development of tolerant yeasts. **Systems Microbiology and Biomanufacturing**, v. 2, n. 2, p. 232-245, 2022. doi: <https://doi.org/10.1007/s43393-021-00058-4>

LOPES, A.C.A. et al. Cinética de crescimento de levedura em mosto de cagaita para produção de bebida fermentada. **Revista Verde**, v. 10, n.3, p. 06 - 10, 2015.

LOVE, K.R. et al. Comparative genomics and transcriptomics of *Pichia pastoris*. **BMC Genomics**, v. 17, p. 550, 2016. doi: <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2876-y>

LUCENA, R.M. et al. Extreme low cytosolic pH is a signal for cell survival in acid stressed yeast. **Genes**, v. 11, n. 6, p. 656, 2020. doi: <https://doi.org/10.3390/genes11060656>

MAHILRAJAN, S.; JEYASEELAN, E.C.; SRIVIJEINDRAN, S. Isolation and identification of indigenous yeast strain and its potential for yeast extract production. **Journal of Science**, v. 16, n. 1, 2021. doi: 10.4038/vingnanam.v16i1.4182

MARTIN, J.G.P; LINDNER, J.D. Microbiologia de alimentos fermentados. São Paulo: Blucher, 2022.

MEHTA, D.V.; CURTIS, S.J.; RUDOLPH, A.B. et al. A Mini Review: The history of yeast flocculation with an emphasis on measurement techniques. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 79, n. 4, p. 333–339, 2020. doi: <https://doi.org/10.1080/03610470.2020.1806006>

MIRA, N.P.; PALMA, M.; GUERREIRO, J.F. et al. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for tolerance to acetic acid. **Microb Cell Fact**, v. 9, p. 79, 2010. doi: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-79>.

MOURA, J.A.A.; BELISÁRIO, C.M.; VIANA, L.F. et al. Qualidade de cachaças artesanais produzidas com leveduras de diferentes origens. **Scientia Plena**, v. 16, n. 3, 2020.

MULLER, G.; DE GODOY, V.R.; DÁRIO, M.G. et al. Improved sugarcane-based fermentation processes by an industrial fuel-ethanol yeast strain. **J. Fungi**, v. 9, p. 803, 2023. doi: <https://doi.org/10.3390/jof9080803>

MURATH, P.; HOFFMANN, S.; HERRERA-MALAVAR, B. et al. Characterization of wild yeasts isolated from Chile and their potential applications in the brewing industry. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, p. 1-10, 2025.

NAUMOVA, E.S.; SADYKOVA, A.Z.; MARTYNENKO, N.N. et al. Molecular genetic characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* distillers' yeasts. **Microbiology**, v. 82, p. 175-185, 2013.

NAVARRO-TAPIA, E.; QUEROL, A.; PÉREZ-TORRADO, R. Membrane fluidification by ethanol stress activates unfolded protein response in yeasts. **Microbial Biotechnology**, v. 22, 2018. doi: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13032>

NEIGEBORN, L.; CARLSON, M. Mutations causing constitutive invertase synthesis in yeast: genetic interactions with snf mutations. **Genetics**, v. 115, n. 2, p. 247-53, 1987. doi: [10.1093/genetics/115.2.247](https://doi.org/10.1093/genetics/115.2.247).

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 6 ed, 2014.

NIMSI, K.A.; MANJUSHA, K.; ABDULLA, A. et al. Diversity, distribution, and bioprospecting potentials of manglicolous yeasts: a review. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 99, n. 5, p. 44, 2023.

NOVA, M.X.V.; SCHULER, A.R.P.; BRASILEIRO, B.T.R.V. et al. Yeast species involved in artisanal cachaça fermentation in three stills with different technological levels in Pernambuco, Brazil. **Food Microbiology**, v. 26, n. 5, p. 460-466, 2009. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.02.005>

OLIVEIRA, A.C.D.; OLIVEIRA, C.A.F.; KAMIMURA, E.S. Microbial contamination in the ethanol and cachaça fermentation process: impacts and applications. **Food Science and Technology**, v. 43, 2023. doi: <https://doi.org/10.5327/fst.80422>

OLIVEIRA, E.S.; CARDELLO, H.M.A.B.; JERONIMO, E.M. et al. The influence of different yeasts on the fermentation, composition and sensory quality of cachaça. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 707-715, 2005.

OLIVEIRA, V.A.; VICENTE, M.A.; FIETTO, L.G. et al. Biochemical and molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains obtained from sugar-cane juice fermentations and their impact in cachaça production. **Appl Environ Microbiol.**, v. 74, n. 3, p. 693-701, 2008. doi: [10.1128/AEM.01729-07](https://doi.org/10.1128/AEM.01729-07).

OSIEBE, O.; ADEWALE, I.O.; OMAFUVBE, B.O. Production and characterization of intracellular invertase from *Saccharomyces cerevisiae* (OL629078.1), using cassava-soybean as a cost-effective substrate. **Sci Rep.**, v. 28, n. 1, p. 162-95, 2023. doi: [10.1038/s41598-023-43502-2](https://doi.org/10.1038/s41598-023-43502-2).

PADILLA, B.; GIL, J.V.; MANZANARES, P. Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 411, 2016. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00411>.

PALLADINO, F.; ALVARENGA, F.B.M.; RODRIGUES, C.L.B. et al. Diversity of native yeasts isolated in Brazil and their biotechnological potential for the food industry, **Curr Food Sci Tech**, p. 81–90, 2023. doi: <https://doi.org/10.1007/s43555-023-00011-7>

PANGESTU, R.; KAHAR, P.; OGINO, C. et al. Comparative responses of flocculating and nonflocculating yeasts to cell density and chemical stress in lactic acid fermentation. **Yeast**, v. 41, n. 4, p. 192-206, 2024. doi: 10.1002/yea.3917.

PERAZA-JIMÉNEZ, K.; DE LA ROSA-GARCÍA, S.; HUIJARA-VASCONSELOS, J.J. et al. Enzymatic bioprospecting of fungi isolated from a tropical rainforest in Mexico. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 1, p. 22, 2021.

PEREIRA, A.A.M.; ACEVEDO, M.S.F.; ALCARDE, A.R. Improvement of the chemical quality of Cachaça. **Beverages**, v. 10, 2024. doi: <https://doi.org/10.3390/beverages10030079>

PFEIFFER, T.; MORLEY, A. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 1, p. 17, 2014. doi: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00017>.

PORTUGAL, C.B.; ALCARDE, A.R.; BORTOLETTO, A.M. et al. The role of spontaneous fermentation for the production of cachaça: a study of case. **European Food Research and Technology**, v. 242, n. 9, p. 1587-1597, 2016. doi: <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2659-3>.

PRADO, C.D.; MANDRUJANO, G.P.L.; SOUZA, J.P. et al. Physiological characterization of a new thermotolerant yeast strain isolated during Brazilian ethanol production, and its application in high-temperature fermentation. **Biotechnol Biofuels**, v. 13, p. 178, 2020. doi: <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01817-6>

PUENTES, C.; XAVIER, J.; VIDAL, J.P. et al. Simulation of spirits distillation for a better understanding of volatile aroma compounds behavior: Application to Armagnac production. **Food and Bioproducts Processing**, v. 112, p. 31-62, 2018.

RATKOVICH, N.; ESSER, C.; DE RESENDE MACHADO, A.M. et al. The spirit of Cachaça production: An umbrella review of processes, flavour, contaminants and quality improvement. **Foods**, v. 12, p. 33-25, 2023. doi: <https://doi.org/10.3390/foods12173325>.

RIBEIRO, R.A.; BOURBON-MELO, N.; SÁ-CORREIA, I. The cell wall and the response and tolerance to stresses of biotechnological relevance in yeasts. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 953-479, 2022. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.953479>

ROSSOUW, D.; OLIVARES-HERNANDES, R.; NIELSEN, J. et al. Comparative transcriptomic approach to investigate differences in wine yeast physiology and metabolism during fermentation. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, 2009. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.01251-09>

SAHANA, G.R.; BALASUBRAMANIAN, B.; JOSEPH, K.S. et al. A review on ethanol tolerance mechanisms in yeast: current knowledge in biotechnological applications and future directions. **Process Biochemistry**, v. 138, p. 1-13, 2024. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.12.024>

SALDAÑA, C.; VILLAVA, C.; RAMÍREZ-VILLARREAL, J. et al. Rapid and reversible cell volume changes in response to osmotic stress in yeast. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 895-903, 2021. doi: <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00427-0>

SARIKI, S.K.; KUMAWAT, R.; SINGH, R. et al. Molecular and mechanistic insights of yeast flocculation. **Recent Advances in Pharmaceutical Innovation and Research**, p. 633–651, 2023. doi: https://doi.org/10.1007/978-981-99-2302-1_26

SERAFIM, F.A.T.; DA SILVA, A.A.; GALINARO, C.A. et al. Comparação do perfil químico entre cachaças de um mesmo vinho destiladas em alambiques e em colunas. **Quim. Nova**, v. 35, n. 7, p. 1412-1416, 2012. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000700023>

SHEVCHENKO, A.; YANG, Y.; KNAUST, A. et al. Proteomics identifies the composition and manufacturing recipe of the 2500-year old sourdough bread from Subeixi cemetery in China. **Journal of Proteomics**, v. 105, p. 363-371, 2014.

SILVEIRA, A.L.; MACHADO, A.M.R.; GOMES, F.C.O. et al. Profile of volatile organic compounds in musts and cachaças produced by selected *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e23410414009-e23410414009, 2021. doi: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i4.14009>.

SMUKALLA, S.; CALDARA, M.; POCHET, N. et al. FLO1 is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. **Cell**, v. 135, n. 4, p. 726–737, 2008.

SOARES, T.L.; SILVA, C.F.; SCHWAN, R.F. Monitoring the fermentation process for cachaça production using microbiological and physico-chemical methods with different *Saccharomyces cerevisiae* isolates. **Food Sci. Technol**, v. 31, n. 1, 2011.

TAKAGI, H. Molecular mechanisms and highly functional development for stress tolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 85, n. 5, p. 1017-1037, 2021. doi: <https://doi.org/10.1093/bbb/zbab022>

TESFAYE, E.L.; TEFERA, A.T.; MULETA, D. Assessing the bread-leavening ability of wild yeasts isolated from selected fruits collected from local markets. **PLoS One**, v. 20, n. 5, p. 324-252, 2025.

THAKUR, S.; ANOKHE, A.; KALIA, V. Biochemical test for detecting hydrogen sulphide (H₂S) producing bacteria. **AgriCos e-Newsletter**, v. 2, n. 11, 2021.

VAN AALST, A.C.A.; DE VALK, S.C.; VAN GULIK, W.M. et al. Pathway engineering strategies for improved product yield in yeast-based industrial ethanol production. **Synth. Syst. Biotechnol.**, v. 7, p. 554-566, 2022.

VERBELEN, P.J.; DE SCHUTTER, D.P.; DELYAUX, F. et al. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 19, p. 1515–1525, 2006.

VERSTREPEN, K.J.; DERDELINCKX, G.; VERACHTERT, H. et al. Yeast flocculation: what brewers should know. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 61, p. 197–205, 2003. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1200-8>

VIDAL, E.E.; DE BILLERBECK, G.M.; SIMÕES, D.A. et al. Influence of nitrogen supply on the production of higher alcohols/esters and expression of flavour-related genes in cachaça fermentation. **Food Chem.**, v. 138, n. 1, p. 701-8, 2013. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.10.147.

VITOLO, M. Overview on invertase. **Word Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**. v. 10, n. 10, 2021.

WALKER, G.M.; BASSO, T.O. Mitigating stress in industrial yeasts. **Fungal Biology**, v. 124, n. 5, p. 387-397, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.10.010>

WALKER, G.M.; STEWART, G.G. *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. **Beverages**. v. 2, n. 30, 2016. doi: <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>

WALLACE-SALINAS, V.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. **Biotechnology for Biofuels**. v. 6, p. 151, 2013.

WEN, L.; YANG, L.; CHEN, C. et al. Applications of multi-omics techniques to unravel the fermentation process and the flavor formation mechanism in fermented foods. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 64, n. 23, p. 8367-8383, 2024. doi: <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2199425>.

XIU-FENG, L.; YU-LEI, X.; XUE-MEI, Z. Response mechanism of *Saccharomyces cerevisiae* under benzoic acid stress in ethanol fermentation. **Sci Rep.**, v. 14, n. 1, p. 57-287, 2024. doi: [10.1038/s41598-024-80484-1](https://doi.org/10.1038/s41598-024-80484-1).

ZHANG, Q.; YAN-LING, J.; YANG, F. et al. Adaptive evolution and selection of stress-resistant *Saccharomyces cerevisiae* for very high-gravity bioethanol fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 41, p. 88-94, 2019.

ZHAO, H.; CHEN, J.; LIUA, J. et al. Transcriptome analysis reveals the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. **RSC Advances**, v. 29, 2015.

ZHAO, Y.; MENG, K.; FU, J. et al. Protein engineering of invertase for enhancing yeast dough fermentation under high-sucrose conditions. **Folia Microbiol**, v. 68, p. 207–217, 2023. doi: <https://doi.org/10.1007/s12223-022-01006-y>

ZHOU, Q.; MA, K.; SONG, Y. et al. Exploring the diversity of the fungal community in Chinese traditional Baijiu daqu starters made at low-, medium-and high-temperatures. **Lwt**, v. 162, p. 113-408, 2022.

CAPÍTULO 2 – ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS NATIVAS DE SALINAS (MG) COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA DE ALAMBIQUE

Bárbara Côgo Venturim^a, Luiza Souza Neubaner^a, Alexandre Santos de Souza^b, Wendel Batista da Silveira^c, Alexandre Fontes Pereira^d e José Guilherme Prado Martin^a.

^a Laboratório de Microbiologia de Produtos Fermentados, FERMICRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil;

^b Laboratório de Fenômenos de Transporte, IFNMG, Instituto Federal do Norte de Minas Gerais campus Salinas, Salinas, MG, Brasil.

^c Laboratório de Fisiologia de Microrganismos, LABFIS, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

^d Departamento de Engenharia Química, DEQ, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

Resumo

A cachaça é uma bebida produzida a partir da fermentação alcoólica do caldo de cana-de-açúcar seguido de destilação, cuja qualidade está diretamente relacionada à atividade de leveduras. Desta forma, o objetivo deste capítulo foi isolar e caracterizar fenotipicamente leveduras isoladas de diferentes propriedades produtoras de cachaça da região de Salinas-MG visando à seleção de leveduras promissoras para uso em fermentações de caldo de cana. Foram isoladas 156 leveduras provenientes de cana-de-açúcar (42%) e de vinho fermentado (58%) coletados em cinco unidades produtoras de cachaça da região de Salinas (MG). Após a triagem inicial, 70% dos isolados (109) não apresentaram produção significativa de sulfeto de hidrogênio (H₂S). Desses, 56% (61 isolados) demonstraram capacidade de fermentar glicose, frutose e sacarose, tanto individualmente quanto em mistura, após 36 h de incubação. A avaliação de tolerância a estresses fermentativos (osmótico, etanólico, pH e temperatura) revelou que 33% das leveduras exibiram pontuações superiores ao controle (*Saccharomyces cerevisiae* LNF CA-11). A atividade invertásica relativa extracelular variou de $(0,12 \pm 0,09) \times 10^{-2}$ a $(1,20 \pm 0,44) \times 10^{-2}$ U, com 66,7% dos isolados apresentando valores superiores ao controle ($(0,16 \pm 0,01) \times 10^{-2}$ U). Nos testes de floculação, todos os isolados apresentaram perfil altamente floculante, sendo selecionados aqueles com desempenho entre a taxa de floculação 0,85 e a taxa obtida pela cepa controle. A identificação taxonômica dos isolados selecionados revelou predominância de *S.*

cerevisiae, além de um isolado não-*Saccharomyces* identificado como *Meyerozyma* sp. Ao final da triagem, nove leveduras foram consideradas promissoras para fermentação de caldo de cana, incluindo oito cepas de *S. cerevisiae* e uma de *Meyerozyma* sp., com potencial aplicação biotecnológica na produção de cachaça.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*; *Meyerozyma*; fermentação alcoólica; aguardente; leveduras autóctones.

1. INTRODUÇÃO

A cachaça é uma das bebidas mais tradicionais do Brasil, desempenhando papel de destaque tanto na economia quanto na cultura nacional, especialmente nas regiões produtoras de Minas Gerais (IBRAC, 2024). Produzida a partir da fermentação alcoólica do caldo de cana-de-açúcar seguido de destilação, sua qualidade está diretamente relacionada à atividade microbiana, em especial das leveduras responsáveis pela conversão dos açúcares em etanol e na geração de compostos voláteis que definem o perfil sensorial característico do destilado (Soares, Silva e Schwan, 2011).

Durante o processo fermentativo, fatores ambientais como temperatura, pH, concentração de açúcares e etanol atuam como agentes seletivos, promovendo a adaptação e predominância de leveduras mais resistentes. Como resultado, forma-se uma microbiota específica para cada alambique, conferindo singularidade e identidade à bebida produzida (Belloch et al., 2008; Zhang et al., 2019). Nesse contexto, a seleção de leveduras autóctones surge como uma estratégia promissora para o desenvolvimento de processos fermentativos mais estáveis. Os microrganismos locais, por estarem naturalmente adaptados às condições do processo, tendem a apresentar melhor desempenho fermentativo, contribuindo para a consistência do processo e para a diferenciação sensorial da cachaça (Barbosa et al., 2016).

Dentre as leveduras associadas à fermentação alcoólica, *Saccharomyces cerevisiae* destaca-se pela elevada eficiência fermentativa, tolerância a estresses ambientais e capacidade de produzir álcoois superiores, ésteres e outros compostos aromáticos essenciais à qualidade do destilado (Ferreira-D’Silva et al., 2019). Contudo, leveduras não-*Saccharomyces* podem influenciar positivamente o perfil sensorial da bebida (Duarte, Amorim e Schwan, 2012; Portugal et al., 2017). Gêneros como *Meyerozyma*, *Pichia* e *Candida* têm despertado crescente interesse para exploração biotecnológica de bebidas fermentadas (Ciani e Comitini, 2011; Borren e Tian, 2020).

Diante desse panorama, o presente estudo teve como objetivo caracterizar fenotipicamente leveduras isoladas de diferentes propriedades produtoras de cachaça da região de Salinas-MG visando à seleção de leveduras promissoras para uso em fermentações de caldo de cana. Essa investigação busca contribuir para a prospecção de microrganismos autóctones com potencial biotecnológico, fortalecendo a base científica para o uso de inoculantes regionais na produção de cachaça de alambique.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta das amostras

Amostras de cana-de-açúcar e de mosto fermentado (vinho) foram coletadas durante o período de safra da cana-de-açúcar em cinco diferentes propriedades tradicionalmente produtoras de cachaça na região de Salinas, MG. Em cada propriedade foram coletadas duas amostras, correspondentes à cana-de-açúcar utilizada no processamento e ao mosto fermentado (vinho) em fermentação. As amostras foram acondicionadas em caixas térmicas contendo gelo e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Produtos Fermentados (FERMICRO/UFV) para a realização das análises.

2.2. Isolamento das leveduras

Para o isolamento, 10 mL de cada uma das amostras em estado líquido foram transferidos para recipientes contendo 90 mL de solução salina 0,85% (m/v) e homogeneizadas manualmente por 1 minuto. Já para as amostras em estado sólido, 10 g de cana-de-açúcar foram transferidos para sacolas plásticas estéreis contendo 90 mL de solução salina 0,85% (m/v) e homogeneizados a 260 rpm por 3 minutos em *Stomacher* (Logen Scientific LS1901N) (Garofalo et al., 2017). Posteriormente, foram realizadas diluições decimais seriadas em solução salina 0,85% (m/v) até a diluição 10^{-4} , para todas as amostras. Aliquotas de 100 μ L foram plaqueadas pela técnica de *spread-plate* em meio de cultivo ágar YPD (2% m/v de glicose, 2% m/v de peptona, 1% m/v de extrato de levedura e 2% m/v de ágar) suplementado com solução de cloranfenicol 0,1% (v/v) (34 μ g/mL), seguido de incubação a 28 °C durante 48 horas (Valles et al., 2006; Clausen, 2020). Colônias isoladas a partir de placas de Petri contendo entre 25-300 colônias foram estriadas em meio de cultivo até a obtenção de culturas puras. Para seleção dos morfotipos, consideraram-se alguns aspectos das colônias, sendo eles: cor, forma,

margem, elevação, brilho e consistência (Kurtzman et al., 2011). Por fim, todas as colônias puras foram codificadas de acordo com a propriedade de origem e amostra coletada (Tabela 1), criopreservadas e armazenadas em ultrafreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabela 1. Código das leveduras de acordo com a propriedade de origem e a amostra coletada.

Amostras	Cana-de-açúcar	Vinho fermentado	Propriedade
			SL
			SB
Código	C	V	SN
			SI
			H

Legenda: C = cana-de-açúcar; V = vinho fermentado; SL = propriedade 1; SB = propriedade 2; SN = propriedade 3; SI = propriedade 4 e H = propriedade 5. Fonte: Elaborada pelo autor.

2.3. Seleção de leveduras para produção de cachaça

A triagem das leveduras mais promissoras para produção de cachaça foi realizada a partir dos seguintes testes: produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S), capacidade de fermentação de açúcares, tolerância às condições de estresse (osmótico, pH, etanol e temperatura), atividade invertásica e teste de floculação.

2.3.1. Teste qualitativo de produção de Sulfeto de Hidrogênio (H_2S)

Para o teste qualitativo de produção de H_2S , utilizou-se o Ágar LA (4% m/v de glicose; 0,5% m/v de extrato de levedura; 0,3% m/v de peptona; 0,02% m/v de sulfato de amônia; 0,1% m/v de acetato de chumbo neutro e 2% m/v de ágar, pH 4,0 ajustado com solução de ácido cítrico 10% v/v), conforme Silva (2024). Placas contendo ágar YPD também foram utilizadas para comparação das morfologias originais dos isolados. Para isso, 10 μL de cada isolado foram inoculados pela técnica de *drop-plate*, seguido de incubação a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 dias. Fermentos comerciais SafAle™ US-05 e SafLager™ W-34/70 foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. Coloração branco ou bege foram consideradas como resultados negativos; já a formação de coloração marrom ou preta, como resultado positivo para produção

de H₂S. Como critério de seleção, os isolados positivos foram eliminados e não seguiram para os testes subsequentes.

2.3.2. Capacidade de fermentação de açúcares

Inicialmente, padronizou-se cada um dos isolados em câmara de *Neubauer* (10^7 - 10^8 células/mL). Posteriormente, 600 µL dos isolados foram adicionados em tubos contendo 6 mL de caldo YP (2% m/v de peptona e 1% m/v de extrato de levedura), acrescentado de forma individual de 14% (m/v) de sacarose, 1% (m/v) glicose e 1% (m/v) frutose, bem como um tratamento que mimetiza o caldo de cana contendo todos os açúcares citados e suas respectivas concentrações descritas anteriormente (Mix de açúcares). Tubos de *Durham* invertidos foram utilizados para verificação da produção de CO₂. Após inoculação, os tratamentos foram incubados a 28 °C durante 36 horas (Camargo et al., 2018). Presença de gás no interior do tubo de *Durham* foi considerado como resultado positivo para este parâmetro (Barnett, Payne e Yarrow, 2000). O mesmo procedimento foi realizado utilizando *S. cerevisiae* (LNF CA-11), empregada como controle positivo, por se tratar de uma cepa amplamente utilizada em processos de fermentação como cultura *starter* na produção de cachaça. Os isolados que apresentaram padrões de leitura negativos (–) para todos os três açúcares testados não foram submetidos às etapas subsequentes de análise.

2.3.3. Teste qualitativo de tolerância a diferentes estresses

As faixas praticadas para cada tipo de estresse e os critérios de avaliação foram baseados nas metodologias descritas por Belloch et al. (2008) e Alvarenga (2019). Inicialmente, 10 µL de cada isolado padronizado (10^7 a 10^8 células/mL) foram inoculados em diferentes tratamentos utilizando a técnica de *drop-plate* (Bassi, 2011). O teste de tolerância à pressão osmótica foi realizado por meio da observação do crescimento de colônias em ágar YNB (*Yeast Nitrogen Base*), suplementado com diferentes concentrações de açúcares: 15, 20 e 25% (m/v) de sacarose; 15, 20, 25 e 30% (m/v) de glicose e frutose. Os testes de tolerância ao etanol foram avaliados por meio da observação do crescimento de colônias em meio sólido YPD com etanol nas concentrações de 8, 10, 12 e 15% (v/v). Para avaliar a tolerância a diferentes pH, foi utilizado o mesmo meio de cultivo, com pH ajustado para 2,8, 3,2 e 4,2 com solução de ácido clorídrico (1,0 M). Para esses três estresses, as células foram incubadas a 28 °C por 48 horas. Já para a avaliação da tolerância à temperatura, utilizou-se meio de cultivo sem ajuste do pH,

sendo as placas de Petri incubadas à 18 e 37 °C por 48 horas. Esse mesmo procedimento foi realizado em meio YPD como controle do crescimento das leveduras sem submetê-las a nenhum tipo de estresse, bem como para *S. cerevisiae* (NLF CA-11) como critério de seleção.

Por fim, os isolados foram classificados de acordo com a intensidade de crescimento em gota, variando de crescimento igual do controle (++) a nenhum crescimento (-). Posteriormente, os resultados de cada isolado em cada faixa avaliada nos diferentes tratamentos de estresses foram pontuados considerando-se a performance de NLF CA-11 como referência (total de 20 pontos) (Apêndice A). Sendo assim, foi concedido 0 ponto para resultados inferiores ao de CA-11; 1 ponto para resultados iguais ao de CA-11; e 2 pontos para resultados superiores ao de CA-11. A soma das pontuações foi realizada ao final da avaliação e aqueles isolados que obtiveram pontuação $\leq 75\%$ foram eliminados.

2.3.4. Assimilação de lisina

Com o objetivo de classificar as leveduras como prováveis *Saccharomyces* ou não-*Saccharomyces*, utilizou-se a avaliação do crescimento em meio de cultivo com lisina como a única fonte de nitrogênio. Para isso, alçadas de cada isolado foram inoculadas em meio lisina (1,17% m/v de Carbono Levedura Base; 0,056% m/v de lisina e 2% m/v de ágar), e os resultados avaliados após incubação a 28 °C por 48 horas (Kurtzman et al., 2011). Os isolados que não apresentaram crescimento presumiu-se que eram do gênero *Saccharomyces* e os isolados que apresentaram crescimento presumiu-se que eram do gênero não-*Saccharomyces*. Como controle negativo, utilizou-se a cultura de *S. cerevisiae* (LNF CA-11); como controle positivo, a cultura de *Pichia occidentalis*.

2.3.5. Atividade invertásica relativa extracelular

A atividade invertásica relativa extracelular foi verificada de acordo com a metodologia descrita por Santos et al. (2017), a partir da curva-padrão de glicose e ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Inicialmente, 2 mL da suspensão das culturas padronizadas foram transferidas para tubos Falcon de 50 mL contendo 20 mL de caldo YEPS (2% m/v de peptona, 2% m/v de sacarose e 1% m/v de extrato de levedura), no qual foram mantidas sob agitação de 150 rpm a 28 °C por 24 horas. Posteriormente, os meios foram centrifugados (1000 rpm/5 min.) a fim de separar a biomassa do sobrenadante. O sobrenadante contendo o extrato enzimático extracelular foi armazenado em tubo Falcon de 15 mL e mantido a 4 °C até o momento da análise. Em

microplacas de 96 poços, foram adicionados, em quadruplicata, para cada poço, 50 µL de solução de sacarose (0,1 M), 40 µL de tampão acetato (100 mM, pH 5,0) e 10 µL de amostra enzimática. O conteúdo foi homogeneizado e a placa incubada a 30 °C por 30 minutos. Após a incubação, foram adicionados 100 µL do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), seguido de aquecimento a 100 °C por 10 minutos em termociclador, etapa que promove a desnaturação da enzima e o desenvolvimento da reação colorimétrica com os açúcares redutores liberados. Em seguida, a placa foi resfriada em banho de gelo e transferida para um leitor de microplacas (Fisher Scientific®) para leitura da absorbância a 540 nm. As concentrações, em g/L de glicose, foram calculadas com base na equação de reta gerada a partir da curva de calibração de glicose (Apêndice B) utilizando-se as medidas de absorbância obtidas diretamente em planilhas do Microsoft® Excel. Os resultados foram convertidos através de cálculos em U (Equação 1), que é determinado como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 µmol de açúcar redutor/minuto (Cavalheiro, 2014; Barbosa et al., 2019; Alvarenga, 2019). Apenas os isolados que apresentaram os maiores valores de U extracelular foram submetidos ao último teste de caracterização fisiológica.

$$\textit{Atividade invertásica (U)} = \textit{Gli} / t \textit{ (Equação 1)}$$

Onde: Gli = µmol de glicose da amostra descontado do valor do branco e t = tempo reacional (30 minutos).

2.3.6. Determinação do perfil flocculante

A determinação do perfil flocculante dos isolados foi realizada de acordo com Souza e Mutton (2004). Colônias crescidas em ágar YPD foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo YPD e padronizadas (10^8 células/mL); posteriormente, foram incubadas a 28 °C por 24 horas (Souza, 2018). Após, 9,6 mL dos inóculos (12% v/v) de cada um dos isolados foram adicionados a frascos de vidro com tampa contendo 80 mL de caldo YPD, seguido de incubação a 28 °C por 24 horas. Aliquotas de 5 mL de cada uma das culturas foram coletadas após 24 horas de incubação a 0,5 cm de profundidade após agitação dos frascos por inversão, e outra alíquota de mesmo volume após 5 minutos de repouso. Tais alíquotas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 0,5 mL de solução de ácido sulfúrico 20% (v/v) e agitados por inversão. Após esse procedimento, determinou-se o valor de absorbância

em espectrofotômetro a 600 nm. A determinação da Taxa de Flocculação (TF) foi realizada a partir da Equação 2. O mesmo procedimento foi realizado com a cultura LNF CA-11 (controle).

$$\text{Taxa de flocculação} = A_i/A_f \text{ (Equação 2)}$$

Onde: A_i = leitura de absorbância após agitação e A_f = leitura de absorbância após 5 minutos de repouso.

2.4. Identificação taxonômica das leveduras

A identificação taxonômica foi realizada somente para os isolados que apresentaram características fenotípicas promissoras para uso na produção de cachaça. O DNA das leveduras foi extraído de acordo com a técnica de fenol:clorofórmio:isopropanol, conforme Oliveira et al., (2007), com modificações. Inicialmente, realizou-se o cultivo dos isolados de leveduras em tubos de ensaio contendo 6 mL de caldo YPD incubado *overnight* a 30 °C. Posteriormente, alíquotas de 2 mL de cada cultura foram centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos. Os *pellets* de cada uma das culturas foram ressuspensos em 1 mL de tampão de extração (1 mL de Triton 100x; 5 mL de SDS 10%; 2,5 mL de NaCl 2M; 5 mL de Tris-HCl (1M-pH 8,0); 50 µL de EDTA (0,5M - pH 8,0) e 50 mL de água ultrapura) e submetidos a 2 minutos de lise mecânica, realizada em Beadbeater (BioSpec Products®, USA), com esferas de vidro de 0,5 mm de diâmetro. Após a etapa de lise, o sobrenadante passou pelo processo de purificação com solução fenol:clorofórmio:isopropanol, seguido de precipitação com solução de acetato de potássio (5M) e lavagens com etanol absoluto e etanol 70% (v/v). O DNA extraído foi quantificado em NanoDrop (Thermo Scientific NanoDrop®, USA), e a qualidade foi verificada por eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com GelRed e visualizado sob luz UV (Loccus Biotecnologic® L-Pix Chemi). Posteriormente, as regiões do domínio D1/D2 da subunidade 26S (600 bp) do rDNA foram amplificadas usando os primers NL1/F63 *Forward* (5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4/LR3 *Reverse* (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (Lachance et al., 2003). O sequenciamento *Sanger* foi realizado na plataforma ABI 3730 Life. As sequências obtidas foram inicialmente visualizadas e editadas no *software* FinchTV, no qual foi realizada a limpeza das sequências por meio da remoção das regiões iniciais e finais que apresentavam picos de baixa qualidade e sobreposição de sinais no cromatograma. Após essa etapa de edição, as sequências tratadas foram submetidas

ao banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) utilizando o algoritmo BLASTn para identificação das sequências.

2.5. Análises estatísticas

Todos os resultados quantitativos foram analisados estatisticamente utilizando o *software* R. Inicialmente, os dados foram submetidos a testes de normalidade para verificação do atendimento aos pressupostos de análises paramétricas. Como os dados não apresentaram distribuição normal, optou-se pela utilização de testes não-paramétricos. Assim, foi aplicado o teste de *Kruskal–Wallis* para verificar diferenças significativas entre os tratamentos, seguido do teste de *Mann–Whitney* para comparações pareadas, a fim de identificar quais tratamentos diferiram entre si, considerando nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Panorama geral dos isolados

Os 156 isolados de leveduras avaliados neste estudo foram obtidos de cana-de-açúcar e do caldo de cana fermentado (vinho) de cinco diferentes unidades produtoras de cachaça na região de Salinas-MG (Figura 1) e estão depositados na Coleção de Culturas do Laboratório de Microbiologia de Produtos Fermentados (FERMICRO/UFV). Dos 156 isolados obtidos na prospecção, 65 são provenientes da cana-de-açúcar (42%) e 91 do vinho fermentado (58%), sugerindo que o processo fermentativo favorece o crescimento e a seleção de um número maior de leveduras em comparação à matéria-prima. Essa diferença pode estar relacionada à adaptação das leveduras às condições de fermentação, como disponibilidade de nutrientes, pH e concentração de etanol, fatores que atuam como agentes seletivos durante o processo (Wu et al., 2022; Su et al., 2025). Além disso, observou-se que algumas propriedades apresentaram maior número de isolados do que outras, o que pode refletir particularidades ambientais e tecnológicas locais, como diferenças nas práticas de manejo da cana, condições de fermentação ou presença de microbiota residente específica em cada unidade produtora.

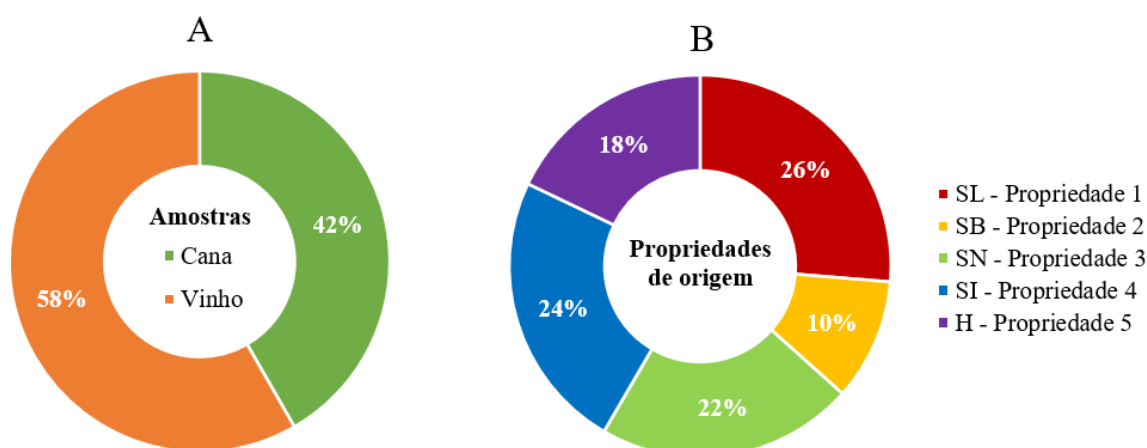


Figura 1. Panorama geral da distribuição dos isolados de leveduras. A) Porcentagem de isolados obtidos das amostras de cana-de-açúcar e vinho fermentado. B) Distribuição dos isolados em relação às propriedades de origem de coleta das amostras.

3.2. Produção de H₂S e capacidade fermentativa

Dos 156 isolados iniciais avaliados, 47 foram eliminados por apresentarem produção de H₂S considerável (30%) – coloração das colônias marrom ou preta; enquanto 109 foram selecionadas para a etapa seguinte (70%), sendo 53 provenientes do vinho fermentado (49%) e 56 da cana-de-açúcar (69%) (Figura 2A).

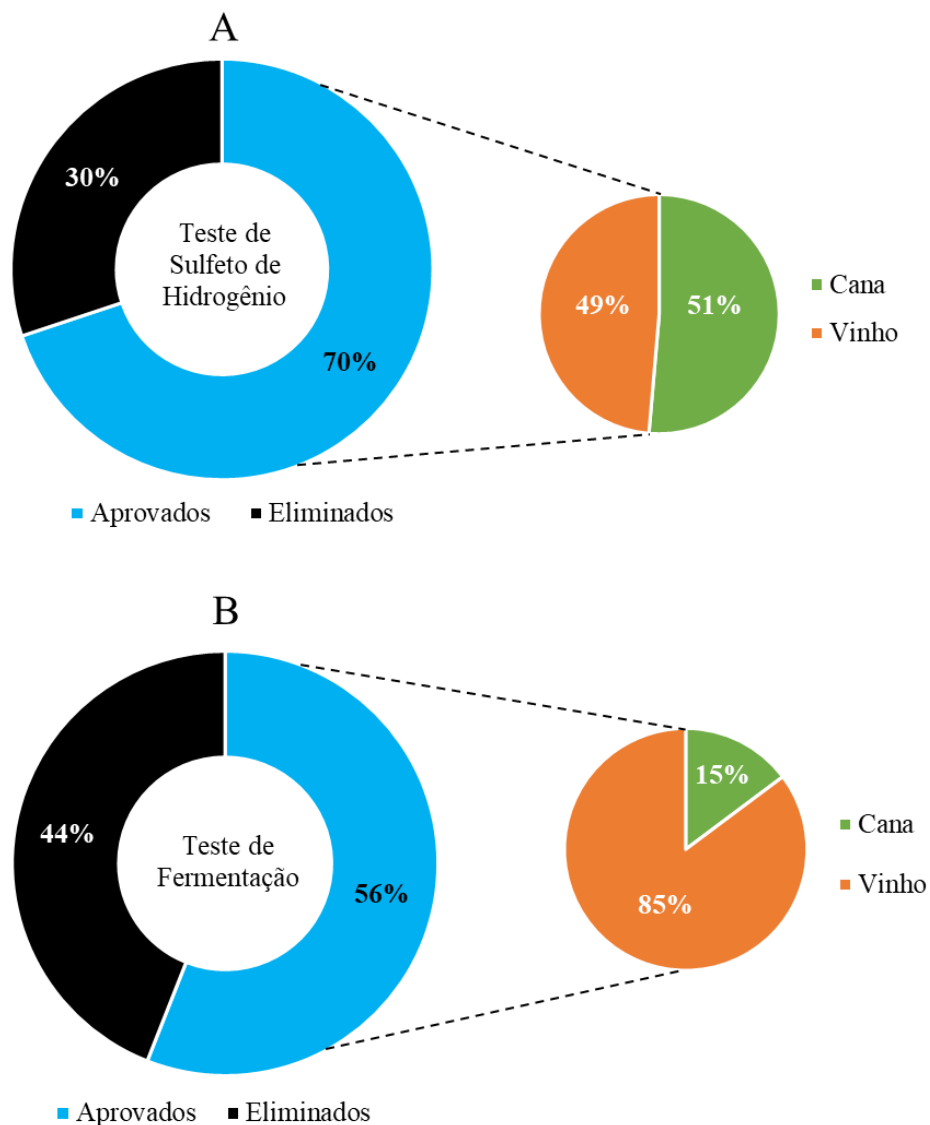


Figura 2. A) Resultados do teste qualitativo de produção de H₂S; B) Resultado do teste de fermentação em fontes de carbono relacionadas à produção de cachaça. Elaborada pelo autor.

O teste de produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S) tem por objetivo selecionar leveduras com menor potencial de formação deste composto durante a fermentação, pois a produção excessiva de H_2S está associada à formação de odores desagradáveis, descritos como “ovo podre” ou “enxofre”, comprometendo a qualidade sensorial de bebidas fermentadas e destiladas (Kinzurik et al., 2020). Durante a destilação da cachaça, parte desse composto pode reagir com o cobre presente nos alambiques, formando sulfetos de cobre insolúveis e, assim, reduzindo a presença do defeito olfativo no destilado (Da-Silva et al., 2023). A presença de H_2S na fermentação pode advir da redução de compostos sulfurados ou da assimilação inadequada de nitrogênio pelas leveduras, fenômenos comuns em mostos com desequilíbrio nutricional (Kraft et al., 2023). Portanto, a triagem de leveduras com baixa produção de H_2S é essencial para a obtenção de fermentações mais limpas e destilados de melhor qualidade sensorial.

A composição química da cana-de-açúcar apresenta ampla variação quantitativa, embora qualitativamente seja semelhante entre diferentes variedades. De modo geral, o teor de açúcares do caldo-de-cana obtido de cana sadia corresponde a cerca de 16% a 24% de sólidos solúveis totais (SST), valor que depende de fatores genéticos, condições edafoclimáticas e estágio de maturação. Já as concentrações de glicose e frutose variam entre 0,2% e 1%, enquanto a sacarose representa a fração majoritária dos açúcares fermentescíveis (Cardoso, 2020). Conforme apresentado na Figura 2B, dos 109 isolados avaliados, 48 (44%) foram eliminados e 61 (56%) apresentaram capacidade de fermentar os três açúcares analisados (glicose, frutose e sacarose) após 36 horas de cultivo, tanto individualmente quanto em mistura (Mix de açúcares).

Observou-se ainda uma redução expressiva no número de isolados provenientes da cana-de-açúcar, o que reforça a hipótese de que as leveduras predominantes durante a fermentação eram melhor adaptadas às condições ambientais e nutricionais do mosto do que aquelas associadas à matéria-prima. Essa adaptação seletiva pode estar relacionada à pressão de fatores como disponibilidade de substratos, variações de pH e presença de etanol, que favorecem o estabelecimento de leveduras mais tolerantes e competitivas (Fleet, 2008). Nesse contexto, os resultados apresentados a seguir visam aprofundar a compreensão sobre o comportamento de diferentes isolados frente a condições de estresse fermentativo, permitindo identificar potenciais candidatos com características desejáveis para a produção de cachaça.

3.3. Avaliação qualitativa do isolados frente a diferentes estresses fermentativos e classificação de prováveis *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*

A triagem qualitativa por intensidade de gota revelou ampla variabilidade fenotípica entre os isolados testados, com desempenho superior de vários deles em comparação ao controle (NLF CA-11), principalmente em condições de estresse etanólico (Apêndice A; Figura 3A). Utilizando o critério de pontuação descrito no item 2.3.3, os resultados de cada isolado nos diferentes tratamentos de estresse foram comparados à performance da linhagem de referência (NLF CA-11), estabelecendo-se um total máximo de 20 pontos (Apêndice A). A partir desse critério, observou-se que sete isolados (11%) apresentaram desempenho inferior, com pontuação $\leq 75\%$, sendo, portanto, eliminados do processo de seleção. Por outro lado, 54 isolados (89%) obtiveram pontuação superior ao limite mínimo estabelecido, seguindo para as próximas etapas de avaliação.

Dentre os aprovados, 36 isolados (67%) apresentaram desempenho fisiológico entre $>75\%$ e 100% na pontuação máxima, indicando comportamento semelhante ao da cepa controle, enquanto 18 isolados (33%) destacaram-se por apresentarem pontuações superiores a 100% , demonstrando maior capacidade adaptativa e tolerância frente às condições de estresse avaliadas (Figura 3B). Esses resultados evidenciam a presença de linhagens capazes de suportar variações de temperatura, pH e concentrações crescentes de etanol, características essenciais para o sucesso das fermentações alcoólicas conduzidas em caldo de cana, especialmente em alambiques artesanais, onde o controle das condições ambientais é relativamente limitado (Basso et al., 2008; Brexó et al., 2020).

Observando as pontuações apresentadas no Apêndice A, verifica-se que as concentrações de açúcares avaliadas, assim como as variações de temperatura e pH, não representaram condições limitantes para o crescimento da maioria dos isolados. Entre os tratamentos aplicados, o estresse etanólico foi aquele que mais impactou na caracterização e no entendimento do comportamento fisiológico das mesmas, permitindo distinguir de forma mais clara os isolados com maior resistência celular frente a esse estresse. Esse resultado é coerente com a natureza tóxica do etanol em altas concentrações, configurando-se, portanto, como um dos principais fatores seletivos durante processos fermentativos (Stanley et al., 2010). A resistência ao etanol observada em vários isolados pode estar associada à modificação da composição lipídica da membrana plasmática e a produção de solutos compatíveis, mecanismos que são reconhecidos por estabilizar estruturas celulares e preservar a viabilidade celular (Auesukaree et al., 2017; Bonatto, 2022). Do ponto de vista tecnológico, leveduras mais

resistentes tendem a manter maior taxa de fermentação e menor tempo de parada, assegurando rendimento alcoólico consistente e perfil químico estável (Cardoso et al., 2020).

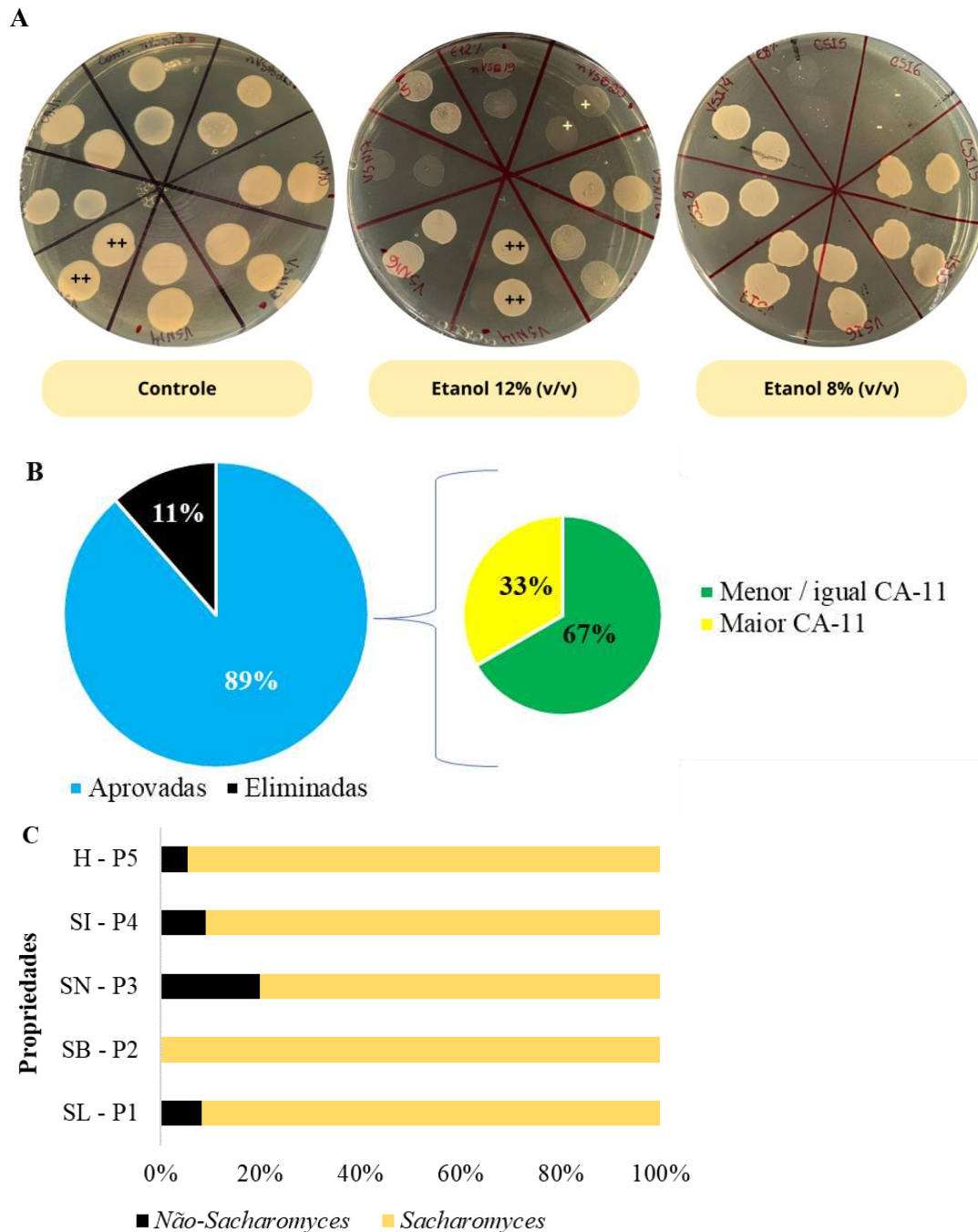


Figura 3 - Resultados da etapa de *screening* utilizando ensaio de estresses fermentativos e classificação das leveduras. a) Ensaio qualitativo de estresses utilizando a técnica de intensidade da gota. Tratamento - exemplo do tratamento de estresse ao etanol (“++” = crescimento igual ao controle; “+” = redução do crescimento comparado ao controle e “-” = nenhum crescimento). b) Porcentagem de aprovados após a realização dos testes. c) Classificação dos isolados selecionados no teste de estresse como prováveis Não-*Saccharomyces* e *Saccharomyces* pelo teste de lisina.

O critério de pontuação adotado neste trabalho, baseado na performance relativa ao controle (LNF CA-11) e com corte mínimo de 75%, mostrou-se adequado para reduzir o número de candidatos e priorizar os isolados mais promissores. Contudo, destaca-se que cepas classificadas entre 20 e 75% também podem apresentar características sensoriais desejáveis e merecem avaliação adicional em co-inoculações, considerando o papel sinérgico que diferentes espécies podem exercer no consórcio fermentativo (Da Silva et al., 2022).

Adicionalmente, realizou-se a classificação presuntiva das leveduras selecionadas em relação a serem *Saccharomyces* ou não-*Saccharomyces* (Figura 3C), considerando-se que o gênero *Saccharomyces* não é capaz de se desenvolver utilizando apenas lisina como fonte de nitrogênio (Kurtzman e Fell, 2011). Do total de 54 leveduras selecionadas, 4 exibiram crescimento das colônias no meio seletivo, indicando, portanto, que estas possivelmente não pertencem ao gênero *Saccharomyces*. Em contrapartida, 50 isolados não apresentaram crescimento, indicando a prevalência do gênero *Saccharomyces* em processos fermentativos de produção de cachaça nas propriedades avaliadas. Observa-se contraste entre a quantidade de isolados dos grupos em relação às propriedades; a propriedade SB (P2), por exemplo, apresenta somente representantes do gênero *Saccharomyces*. Estudos corroboram essa variabilidade, evidenciando diferenças significativas de tolerância entre linhagens de *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* isoladas de ambientes fermentativos tradicionais (Nova et al., 2009; Ferreira-D’Silva et al., 2019).

A seleção de leveduras não-*Saccharomyces* que apresentaram bom desempenho nos testes de estresse é relevante, pois essas espécies podem contribuir para a complexidade sensorial da bebida por meio da síntese de ésteres, álcoois superiores e outros metabólitos voláteis (Xu et al., 2022). Estratégias de co-inoculação entre cepas de *S. cerevisiae* e não-*Saccharomyces* têm sido amplamente investigadas e podem otimizar tanto o rendimento fermentativo quanto o perfil aromático de destilados (Li et al., 2025).

3.4. Atividade invertásica

Foi avaliada a atividade invertásica relativa extracelular de 54 isolados selecionados, além da levedura controle (LNF CA-11) (Figura 4). A atividade invertásica entre os isolados variou de $0,12 \pm 0,09 \times 10^{-2}$ até $1,20 \pm 0,44 \times 10^{-2}$ U (μmol de açúcar redutor $\cdot \text{min}^{-1}$). Considerando-se que a sacarose é o principal açúcar presente em caldo de cana-de-açúcar, e que a enzima invertase catalisa sua hidrólise em frutose e glicose, a dosagem dessa atividade

enzimática torna-se importante para avaliar a capacidade fermentativa das leveduras avaliadas (Siddiqa e Ghanima, 2022).

Entretanto, estudos recentes com cepas industriais indicam que a atividade extracelular de invertase provavelmente não limita a fermentação de sacarose em muitos processos industriais, como por exemplo, na produção de etanol; limitações podem advir sobretudo do transporte de sacarose, da regulação glicolítica e de características fisiológicas da cepa (Muller et al., 2023). Ainda assim, a avaliação da atividade invertásica se mantém como uma ferramenta de triagem útil para identificar isolados com potencial para hidrólise de sacarose, quando integrada a outros ensaios fisiológicos.

Os resultados foram ranqueados tendo como referência o isolado VSI14, que apresentou o maior desempenho ($1,20 \pm 0,44 \times 10^{-2}$ U). Dentre os isolados com maiores valores de atividade, destacam-se VSL5, VSL12, VSN12, CSI15, VSI5, VSI6, VSI8, VSI14, VSI15, VSI17, VSI18, VSI19, VSI20 e VH11, no qual não foi observada diferença estatística significativa entre eles; sendo assim, foram classificados como de alto potencial fermentativo (Apêndice C). O controle apresentou atividade invertásica de ($0,16 \pm 0,01 \times 10^{-2}$), situando-se entre os menores resultados obtidos, de modo que 66,7% dos isolados apresentaram atividade superior.

Destas 14 leveduras em destaque, somente uma foi isolada da cana-de-açúcar e as demais provenientes de vinho fermentado, sendo de particular destaque a propriedade SI (P4), que concentrou o maior número de isolados com bom desempenho. Em contrapartida, a propriedade SB (P2) não teve representantes ao final da etapa de seleção, conforme evidenciado na Figura 4. A princípio, esses isolados com alto desempenho na atividade de invertase seriam encaminhados para análise de floculação. No entanto, observou-se que alguns isolados que seriam excluídos nesta etapa apresentavam resultados superiores à cepa controle em relação às características de resistência ao etanol (ver Apêndice A); por esse motivo, os isolados VSL11, VSL14, VSL15, VSL16, VSL19, VSN10, VSN14, VH10, VH12, VH13, VH15, VH17, VH18 e VH20 foram mantidos para a análise subsequente.

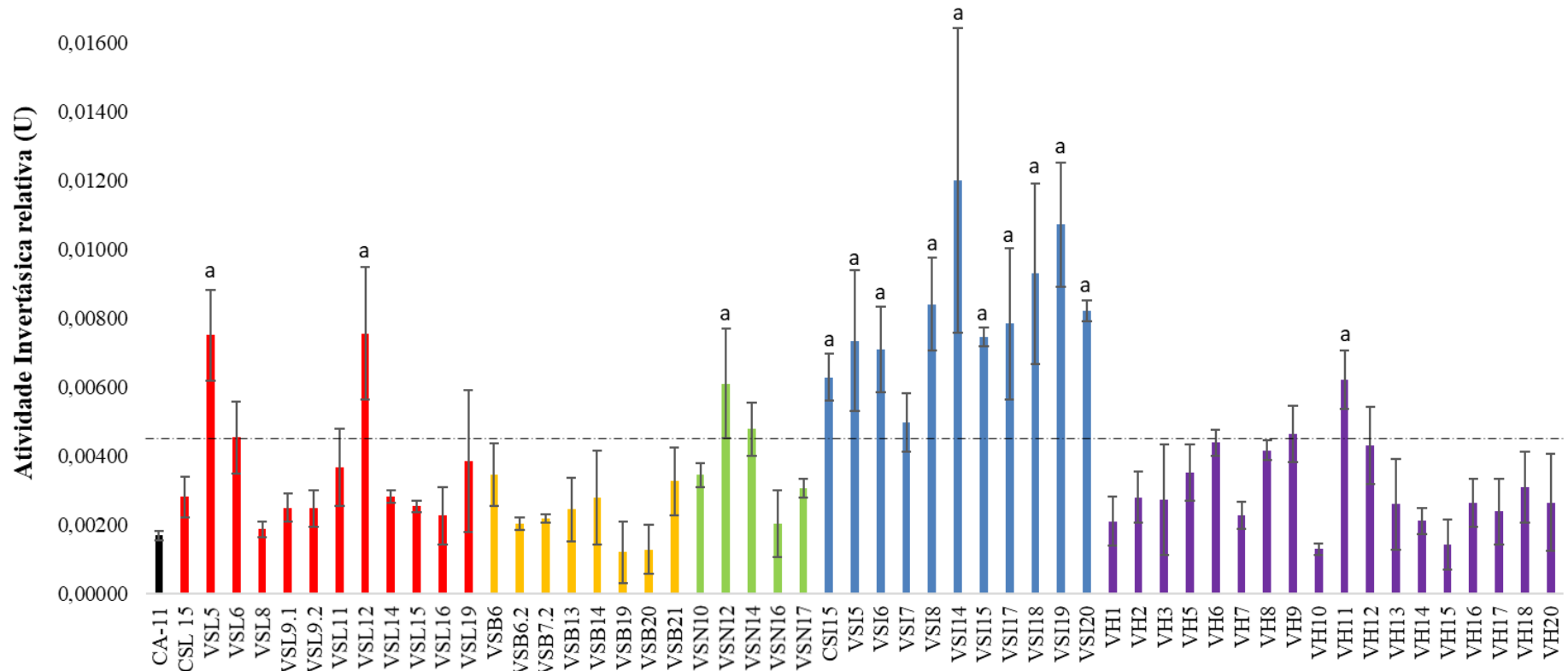


Figura 4. Gráfico da medida de atividade invertásica (U) expressa em μmol de açúcar redutor/minuto. Barra preta correspondendo ao controle (LNF CA-11), barras em vermelho correspondendo aos isolados obtidos da propriedade SL (P1), barras em amarelo correspondendo aos isolados obtidos da propriedade SB (P2), barras em verde correspondendo aos isolados obtidos da propriedade SN (P3), barras em azul correspondendo aos isolados obtidos da propriedade SI (P4) e barras em roxo correspondendo aos isolados obtidos da propriedade H (P5). Barras seguidas da mesma letra “a” não diferem entre si (nível de significância de 5% pelo teste *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney*) e apresentaram os maiores valores de atividade invertásica (U). Linha pontilhada indicando o limite inferior dos resultados obtidos por VSI14 que apresentou a maior performance de atividade invertásica extracelular.

3.5. Taxa de floculação

A floculação assume papel crucial na produção de cachaça, pois o controle do fenótipo floculante é vantajoso devido à sedimentação rápida das células ao final da fermentação, favorecendo sua recuperação e a obtenção de um vinho fermentado com menor turbidez (Alvarez et al., 2014). Além disso, o reaproveitamento de leveduras floculantes pode contribuir para a redução dos custos operacionais (Amorim et al., 2011; Mehta et al., 2020). Entretanto, cepas com elevada floculação podem comprometer o desempenho fermentativo ao sedimentar precocemente ou reduzir a atenuação dos açúcares fermentescíveis (Stewart, 2018). De acordo com a *American Society of Brewing Chemists*, as leveduras podem ser classificadas em três níveis de floculação: valores inferiores a 0,20 indicam cepas não floculantes; entre 0,20 e 0,85 correspondem a leveduras moderadamente floculantes (interesse industrial); e valores superiores a 0,85 caracterizam leveduras altamente floculantes (Bendiak et al., 1996; Verstrepen et al., 2003).

Para os testes de floculação foram avaliados 28 isolados de leveduras, além da levedura controle (LNF CA-11). No presente estudo, observou-se que todas as cepas testadas apresentaram taxas de floculação que as enquadram na classe de alta floculação (Figura 5), o que exigiu a adaptação do critério de seleção, considerando-se a cepa controle (CA-11) como limite máximo aceitável. Dessa forma, foram selecionadas apenas as leveduras com valores de floculação entre a taxa de 0,85 e o valor da taxa de floculação obtido pela cepa CA-11, desconsiderando-se o elevado desvio-padrão observado. Quatro isolados (VSL12, VSL15, VSL16 e VH20) foram, portanto, excluídos das etapas subsequentes de avaliação.

O alto desvio-padrão observado nos testes espectrofotométricos de floculação decorre da heterogeneidade intrínseca do fenômeno, influenciado por variações na dispersão das células, tamanho e densidade dos flocos, condições fisiológicas e ambientais das leveduras (Verstrepen et al., 2003; Vidgren e Londesborough, 2011). Esses fatores combinados comprometem a homogeneidade da suspensão e aumentam a variabilidade experimental. Por fim, permanece o desafio técnico e científico de se elucidarem completamente os mecanismos de floculação em leveduras, um processo multifatorial dependente de interações genéticas, fisiológicas e ambientais ainda não totalmente compreendidas.

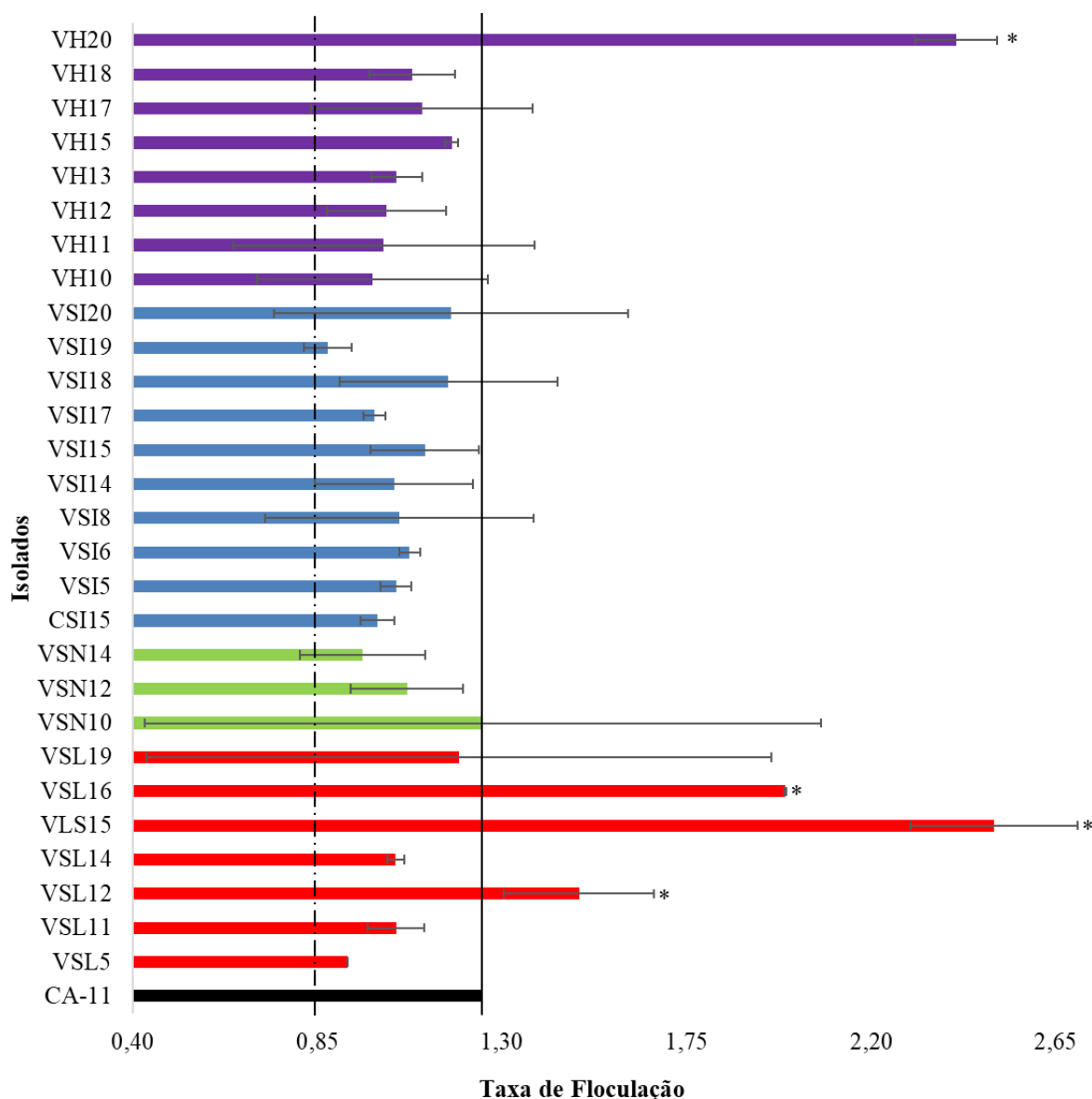


Figura 5. Taxa de Flocculação (TF) dos isolados. Barra preta correspondendo ao controle (LNF CA-11), barras em vermelho correspondendo aos isolados obtidos da propriedade SL (P1), barras em verde correspondendo aos isolados obtidos da propriedade SN (P3), barras em azul correspondendo aos isolados obtidos da propriedade SI (P4) e barras em roxo correspondendo aos isolados obtidos da propriedade H (P5). Linha contínua representando o limite máximo aceitável para TF. Linha pontilhada indicando o limite máximo de TF de leveduras de interesse industrial. “*” resultados que se destacaram dos demais e foram, portanto, eliminados.

3.6. Identificação das espécies de leveduras e candidatos para fermentação de caldo de cana-de-açúcar para produção de cachaça

As 24 leveduras selecionadas nos testes anteriores foram submetidas ao sequenciamento pela metodologia de *Sanger*, a partir da amplificação da região correspondente ao domínio D1/D2 da subunidade 26S do rDNA. A análise das sequências revelou que todas as leveduras

pertenciam à espécie *Saccharomyces cerevisiae*, com exceção do isolado CSI15, identificado como pertencente ao gênero *Meyerozyma* sp. (Tabela 2). A análise comparativa por meio do *BLASTn* não permitiu a definição precisa da espécie, indicando duas possíveis identificações: *Meyerozyma caribbica* ou *Meyerozyma guilliermondii*.

Recentemente, *Meyerozyma* spp. têm despertado interesse não apenas pelo seu papel tecnológico em fermentações, mas também pelo potencial probiótico apresentado por algumas linhagens. Estudos indicam que cepas de *M. guilliermondii* e *M. caribbica* exibem características desejáveis presentes em microrganismos probióticos, como tolerância a condições gastrointestinais adversas, capacidade de adesão a células intestinais e atividade antimicrobiana frente a patógenos (Goyal, Arora e Kocher, 2025). Além disso, essas espécies são capazes de produzir compostos antioxidantes e enzimas com potencial funcional, reforçando sua aplicação em alimentos fermentados e bebidas (Martins et al., 2025). Embora ainda não existam cepas de *Meyerozyma* sp. oficialmente reconhecidas como probióticas, os estudos da área obtidos até o momento demonstram seu potencial como microrganismos funcionais emergentes. Em paralelo, o gênero *Meyerozyma* também tem sido associado positivamente a processos fermentativos, contribuindo para o aumento da complexidade sensorial e para a formação de compostos voláteis de interesse, especialmente quando em co-inoculação com *S. cerevisiae* (Ciani e Comitini, 2011; Duarte, Amorim e Schwan, 2012).

A distinção entre essas espécies é relevante, uma vez que ambas têm sido relatadas como leveduras não-*Saccharomyces* com potencial biotecnológico. *M. caribbica*, por exemplo, tem sido associada à produção de compostos voláteis que contribuem para a complexidade aromática de bebidas fermentadas, como vinhos (Ciani e Comitini, 2011; Duarte, Amorim e Schwan, 2012). Já *M. guilliermondii* apresenta habilidade na produção de ésteres e álcoois superiores, além de contribuir para a redução de compostos indesejáveis durante a fermentação (Borren e Tian, 2020). Dessa forma, a presença de isolados desse gênero em processos fermentativos pode representar um potencial diferencial na qualidade sensorial da bebida.

Tabela 2. Identificação das espécies de leveduras envolvidas na triagem fenotípica.

Propriedade	Código	Gênero	Espécie
Controle	CA-11	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	VSL5	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
SL - P1	VSL11	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	VSL14	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	VSL19	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	VSN10	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
SN - P3	VSN12	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	VSN14	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	CSI15	<i>Meyerozyma</i>	N/ID
SI - P4	VSI5	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	VSI6	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	VSI8	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	VSI14	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	VSI15	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	VSI17	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	VSI18	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	VSI19	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	VSI20	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	H - P5	VH10	<i>Saccharomyces</i>
VH11		<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
VH12		<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
VH13		<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
VH15		<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
VH17		<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
VH18		<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>

Legenda: SL = propriedade 1; SN = propriedade 3; SI = propriedade 4 e H = propriedade 5.
N/ID - Não identificado.

A predominância de *S. cerevisiae* nas fermentações para produção de cachaça é amplamente reconhecida, sendo esta espécie considerada a principal responsável pela eficiência fermentativa e pela elevada tolerância a condições estressantes, como altas concentrações de etanol e variações de temperatura (Badotti et al., 2009). Entretanto, leveduras não-*Saccharomyces* também desempenham papel importante nas fermentações de cachaça. Essas espécies podem atuar em sinergia com *S. cerevisiae*, promovendo aumento na complexidade sensorial e melhor equilíbrio entre os compostos voláteis formados (Portugal et al., 2017). De acordo com Duarte, Amorim e Schwan, (2012) a co-cultura de *S. cerevisiae* com *Meyerozyma caribbica* na fermentação melhorou a eficiência do processo fermentativo, bem como impactou positivamente no perfil sensorial da bebida.

Durante as análises fenotípicas realizadas, observou-se que isolados pertencentes à mesma espécie apresentaram diferenças quanto ao comportamento fisiológico. Essa variação intrínseca pode ser explicada pela elevada diversidade genética existente entre linhagens de uma mesma espécie, resultante de mutações pontuais, rearranjos cromossômicos e diferentes condições ambientais às quais as leveduras foram expostas (Liti et al., 2009). Tais diferenças podem influenciar diretamente a expressão gênica e, conseqüentemente, as características metabólicas observadas nos ensaios. Apesar da região D1/D2 do 26S rDNA ser amplamente utilizada para a identificação taxonômica de leveduras (Lachance et al. 2003), essa abordagem possui limitações na distinção de linhagens muito próximas ou de variantes intraespécie. Nesse sentido, metodologias mais abrangentes, como o sequenciamento completo do genoma (*Whole Genome Sequencing* - WGS) ou o sequenciamento de regiões *multilocus* (MLST), têm se mostrado mais eficientes para revelar variações genéticas sutis, permitindo compreender de forma mais aprofundada a diversidade intraespecífica e suas implicações fisiológicas (Peter et al., 2018).

A seleção das leveduras consideradas promissoras para a produção de cachaça foi realizada com base no desempenho da atividade invertásica relativa extracelular (Apêndice C; Figura 4) dos isolados que permaneceram após o teste de floculação. Dessa forma, foram selecionados dois isolados provenientes de cada uma das quatro propriedades restantes avaliadas, totalizando oito cepas de *S. cerevisiae*, além da levedura não-*Saccharomyces* CSI15, identificada como *Meyerozyma* sp. A inclusão desta levedura na seleção se deve ao seu potencial biotecnológico e à possibilidade de contribuir para a complexidade aromática da bebida, conforme relatado em estudos recentes. Assim, as leveduras apresentadas na Tabela 3 foram consideradas as candidatas mais promissoras para a condução dos ensaios fermentativos em caldo de cana para produção de cachaça.

Tabela 3. Leveduras promissoras para fermentação de caldo de cana para produção de cachaça.

Propriedade	Leveduras
SL - P1	VSL5 / VSL19
SN - P3	VSN12 / VSN14
SI - P4	CSI15 / VSI14 / VSI19
H - P5	VH11 / VH12

Legenda: SL = propriedade 1; SN = propriedade 3; SI = propriedade 4 e H = propriedade 5.

4. CONCLUSÃO

A triagem e caracterização fenotípica das leveduras isoladas de unidades produtoras de cachaça em Salinas-MG permitiram identificar um conjunto de cepas com potencial biotecnológico relevante para uso em fermentações alcoólicas. Observou-se que a maioria dos isolados pertenciam à espécie *S. cerevisiae*, confirmando sua predominância e importância na eficiência fermentativa e estabilidade do processo. Contudo, a identificação de uma levedura não-*Saccharomyces* do gênero *Meyerozyma* destaca a diversidade microbiana presente e aponta para possíveis contribuições sensoriais diferenciadas na bebida.

Os ensaios de resistência a estresses, aliados à avaliação da atividade invertásica e da floculação, revelaram isolados com desempenho superior ao da cepa comercial (controle), demonstrando adaptabilidade às condições típicas da produção de cachaça. Dessa forma, as cepas selecionadas se configuram como candidatas promissoras para uso em fermentações controladas, abrindo perspectivas para o desenvolvimento de inoculantes a partir de leveduras nativas e a valorização microbiológica de cachaças regionais.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, F.B.M. **Seleção de isolados ambientais de *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de cachaça de alambique.** (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.
- ALVAREZ, F.; CORREA, L.F.M.; ARAÚJO, T.M. et al. Variable flocculation profiles of yeast strains isolated from cachaça distilleries. **Int J Food Microbiol.** v. 3, p. 97-104, 2014. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.024.
- AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; DE CASTRO, J.V.O. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 5, p. 1267–1275, 2011.
- AUESUKAREE, C. Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 124, n. 2, p. 133-142, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.03.009>
- BADOTTI, F.; BELLOCH, C.; ROSA, C.A. et al. Physiological and molecular characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* cachaça strains isolated from different geographic regions in Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 579-587, 2009. doi:10.1007/s11274-009-0206-0
- BARBOSA, E.A.; SOUZA, M.T.; DINIZ, R.H. et al. Quality improvement and geographical indication of cachaça (Brazilian spirit) by using locally selected yeast strains. **J Appl Microbiol.**, v. 121, n. 4, p. 51-1038, 2016. doi: 10.1111/jam.13216.
- BARBOSA, P.M.G.; SANTOS, M.S.; DOS SANTOS, E.G. et al. Leveduras selvagens isoladas do caldo de cana com perfil para a produção de enzimas. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 17, n. 2, 2019.
- BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification.** Cambridge University Press, 2000.
- BASSI, A.P.G. **Tolerância ao estresse e características fermentativas de leveduras *Dekkera bruxellensis* isoladas da fermentação alcoólica.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- BASSO, L.C.; DE AMORIM, H.V.; DE OLIVEIRA, A.J. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Res.**, v. 8, n. 7, p. 1155-63, 2008. doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x.
- BELLOCH, C.; ORLIC, S.; BARRIO, E. et al. Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **International Journal of Food Microbiology**, v.122, n.1, p.188-195, 2008. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.083
- BENDIAK, D.; AAR, P.; BARBERO, F. et al. Yeast flocculation by absorbance method. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 54, n. 4, p. 245-248, 1996. doi: 10.1094/ASBCJ-54-0245

BONATTO, D. The multiple roles of lipid metabolism in yeast physiology during beer fermentation. **Genomics and Bioinformatics**, v. 45, n. 3, 2022. doi: <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2021-0325>

BORREN, E.; TIAN, B. The important contribution of Non-*Saccharomyces* yeasts to the aroma complexity of wine: A review. **Foods**, v. 13, n. 1, p. 10, 2020. doi:10.3390/foods10010013

BREXÓ, R.P.; BRANDÃO, L.R.; CHAVES, R.D. et al. Yeasts from indigenous culture for cachaça production and brewer's spent grain: Biodiversity and phenotypic characterization for biotechnological purposes. **Food and Bioprocess Processing**, v. 2, p. 124, 2020. doi:10.1016/j.fbp.2020.08.006

CAMARGO, J.Z.; NASCIMENTO, V.M.; STEFANELLO, I. et al. Biochemical evaluation, molecular characterization and identification of novel yeast strains isolated from Brazilian savannah fruits, chicken litter and a sugar and alcohol mil with biotechnological potential for biofuel and food industries. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 390-399, 2018.

CARDOSO, M.D.G. **Produção de aguardente de cana**. 4 ed., rev. e ampl. Lavras: UFLA, 2020.

CAVALHEIRO, S.B. **Produção de invertase por cultivo submerso de linhagem comercial de *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1)**. Monografia (Curso de Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Grande Dourados, MS, 2014.

CIANI, M.; COMITINI, F. Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. **Ann Microbiol.**, v. 61, p. 25–32, 2011. doi: <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0069-5>

CLAUSEN, W.A.P. **Bioprospecção de leveduras da kombucha para produção de cerveja**. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Positivo, Curitiba, 2020.

DA SILVA, P.A.; FLORÊNCIO, N.B.; SANTOS, G.D.M. et al. Technological potential of non-*Saccharomyces* yeasts. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 10, 2022. doi: 10.33448/rsd-v11i10.32754.

DA-SILVA, V.P. Cachaça Production: from sugar cane to spirit. **J Inst Brew**, v. 129, p. 259-275, 2023. doi: 10.58430/jib.v129i4.40

FERREIRA-D’SILVA, A.; BADOTTI, F.; PINHEIRO, C.S.R. et al. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated of the spontaneous fermentation of cachaça from northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 11, p. 27448–27461, 2019. doi: <https://doi.org/10.34117/bjdv5n11-348>

DUARTE, W.F.; AMORIM, J.C.; SCHWAN, R.F. The effects of co-culturing non-*Saccharomyces* yeast with *S. cerevisiae* on the sugar cane spirit (cachaça) fermentation process. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 1, 2012. doi: 10.1007/s10482-012-9798-8

FLEET, G.H. Wine yeasts for the future. **FEMS Yeast Res.** v. 8, n. 7, p. 979-95, 2008. doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x.

GAROFALO, C.; BANCALARI, E.; MILANOVIC, V. et al. Study of the bacterial diversity of foods: PCR-DGGE versus LH-PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 242, p. 24–36, 2017. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.008

GOYAL, R.; ARORA, R.; KOCHER, G.S. Unlocking the techno-functional and biosafety potential of a novel yeast *Meyerozyma guilliermondii* YB1 as a fermented functional food starter: A future vision for probiotics. **Molecular Nutrition & Food Research**, 2025. doi:https://doi.org/10.1002/mnfr.70226

IBRAC. **Instituto Brasileiro da Cachaça. O que é a cachaça?**. São Paulo: IBRAC, 2024.

KINZURIK, M.I.; DEED, R.C.; HERBST-JOHNSTONE, M. et al. Addition of volatile sulfur compounds to yeast at the early stages of fermentation reveals distinct biological and chemical pathways for aroma formation. **Food Microbiology**, v. 89, p. 103-435, 2020.

KRAFT, D.; ZHOU, Q.; QIAN, M. et al. Impact of nitrogen and elemental sulfur on formation of volatile sulfur compounds during fermentation of pinot noir grapes. **Fermentation**, v. 9, p. 904, 2023. doi: https://doi.org/10.3390/fermentation9100904

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The Yeasts**. Elsevier, p. 861–1000, 2011. doi: https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00044-1.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. et al. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. **The yeasts**. Elsevier, p.87-110, 2011.

LACHANCE, M.A.; DANIEL, H.M.; MEYER, W. et al. The D1/D2 domain of the large subunit of yeast species rDNA is unusually polymorphic. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 3, p. 253-258, 2003. doi:10.1016/S1567-1356(03)00113-2

LI, X.; LIAO, B.; WANG, X. et al. Non-*Saccharomyces* yeasts enhance yield and flavor in industrial xiaoqu light-flavor *baijiu* production. **Food Research International**, v. 219, p. 117-040, 2025. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.117040

LITI, G.; CARTER, D.M.; MOSES, A.M. et al. Population genomics of domestic and wild yeasts. **Nature**, v. 458, p. 337–341, 2009.

MARTINS, P.M.M.; FALÇÃO, I.J.; BATISTA, N.N. et al. Selection and characterization of non-*Saccharomyces* yeast strains for potential use in arabica and conilon coffee fermentations. **Journal of Food Science**, 2025. doi: https://doi.org/10.1111/1750-3841.70431

MEHTA, D.V.; CURTIS, S.J.; RUDOLPH, A.B. et al. A mini review: The history of yeast flocculation with an emphasis on measurement techniques. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 79, n. 4, p. 333–339, 2020. doi: https://doi.org/10.1080/03610470.2020.1806006

MULLER, G.; DE GODOY, V.R.; DÁRIO, M.G. et al. Improved sugarcane-based fermentation processes by an industrial fuel-ethanol yeast strain. **J. Fungi**, v. 9, p. 803, 2023. doi: https://doi.org/10.3390/jof9080803

NOVA, M.X.V.; SCHULER, A.R.P.; BRASILEIRO, B.T.R.V. et al. Yeast species involved in artisanal cachaça fermentation in three stills with different technological levels in Pernambuco,

Brazil. **Food Microbiology**, v. 26, n. 5, p. 460-466, 2009. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.02.005>

OLIVEIRA, V.A.; VICENTE, M.A.; FIETTO, L.G. et al. Biochemical and molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains obtained from sugar-cane juice fermentations and their impact in cachaça production. **Appl Environ Microbiol.**, v. 74, n. 3, p. 693-701, 2007. doi: 10.1128/AEM.01729-07.

PETER, J.; CHIARA, M.D.; FRIEDRICH, A.; YUE, J.X.; et al. Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. **Nature**, v. 556, p. 339–344, 2018.

PORTUGAL, C.B.; DE SILVA, A.P.; BORTOLETTO, A.M. et al. How native yeasts may influence the chemical profile of the Brazilian spirit, cachaça?. **Food Research International**. v. 91, p. 18-25, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.022>

SANTOS, A.A.; DEOTI, J.R.; MULLER, G. et al. Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca. **Braz. J. Food Technol.**, v. 20, 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.11315>

SIDDIQA, A.; GHANIMA, A. Invertase enzyme. **International Journal of Advanced Biochemistry Research**, v. 6, n. 2, p. 120-126, 2022. doi: <https://doi.org/10.33545/26174693.2022.v6.i2b.148>

SILVA, A.B. **Caracterização e avaliação do potencial biotecnológico de leveduras da cana-de-açúcar.** (Trabalho de Conclusão de Curso) - Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2024.

SOARES, T.L.; SILVA, C.F.; SCHWAN, R.F. Monitoring the fermentation process for cachaça production using microbiological and physico-chemical methods with different *Saccharomyces cerevisiae* isolates. **Food Science and Technology**, v. 31, n. 1, p. 184-187, 2011. doi: 10.1590/S0101-20612011000100027

SOUZA, M.A.C.; MUTTON, M.J.R. Flocculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum* em processos industriais de fermentação alcoólica avaliada por técnica fotométrica. **Ciênc. agrotec.**, v. 28, n. 4, p. 893-898, 2004. doi: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542004000400023>

STANLEY, D.; BANDARA, A.; FRASER, S. et al. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Appl Microbiol.**, v. 109, n. 1, p. 13-24, 2010. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04657.x.

STEWART, G. Yeast flocculation - Sedimentation and flotation. **Fermentation**, v. 4, n. 2, p. 28, 2018. doi: 10.3390/fermentation4020028

SU, C.; WANG, H.; JIA, Y. et al. Comparative adaptability of 307 *Saccharomyces cerevisiae* strains from winemaking and Mantou fermentation. **Front Microbiol.**, v. 11, n. 16, p. 158-1370, 2025. doi: 10.3389/fmicb.2025.1581370.

VALLES, B.S.; BEDRINANA, R.P.; TASCÓN, N.F. et al. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. **Food Microbiology**, v. 24, n. 2007, p. 25-31, 2006. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.04.001>

VERSTREPEN, K.J.; DERDELINCKX, G.; VERACHTERT, H. et al. Yeast flocculation: What brewers should know. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n. 3, p. 197-205, 2003. doi: 10.1007/s00253-002-1200-8

VIDGREN, V.; LONDESBOROUGH, J. 125th Anniversary review: Yeast flocculation and sedimentation in brewing, **J. Inst. Brew.**, v. 117, n. 4, p. 475–487, 2011.

WU, Y.; LI, B.; MIAO, B. et al. *Saccharomyces cerevisiae* employs complex regulation strategies to tolerate low pH stress during ethanol production. **Microb Cell Fact.**, v. 247, n. 1, p. 21-24, 2022. doi: 10.1186/s12934-022-01974-3.

XU, A.; XIAO, Y.; HE, Z. et al. Use of non-*Saccharomyces* yeast co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* to improve the polyphenol and volatile aroma compound contents in nanfeng tangerine wines. **J Fungi (Basel)**, v. 128, n. 2, p. 8-27, 2022. doi: 10.3390/jof8020128.

ZHANG, Q.; JIN, Y.L.; FANG, Y. et al. Adaptive evolution and selection of stress-resistant *Saccharomyces cerevisiae* for very high gravity bioethanol fermentation. **Electron J Biotechnol.**, v. 41, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.06.003>

CAPÍTULO 3 – PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DEFINIÇÃO DE ATRIBUTOS SENSORIAIS DE CACHAÇA DE ALAMBIQUE PRODUZIDAS POR LEVEDURAS ISOLADAS DE DESTILARIAS DA REGIÃO DE SALINAS-MG

Bárbara Côgo Venturim^a, Heliomar José dos Santos^b, Alexandre Santos de Souza^b, Ludmylla Tamara Crepalde^a, José Carlos Baffa Júnior^c, Wendel Batista da Silveira^d, Alexandre Fontes Pereira^e e José Guilherme Prado Martin^a.

^a Laboratório de Microbiologia de Produtos Fermentados, FERMICRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil;

^b Laboratório de Fenômenos de Transporte, IFNMG, Instituto Federal do Norte de Minas Gerais campus Salinas, Salinas, MG, Brasil;

^c Centro de Referência de Cachaça, CRC, Universidade Federal de Viçosa, Florestal, MG, Brasil;

^d Laboratório de Fisiologia de Microrganismos, LABFIS, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

^e Departamento de Engenharia Química, DEQ, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

Resumo

A fermentação do caldo de cana em muitos alambiques brasileiros para produção de cachaça é conduzida por microbiota nativa da matéria-prima e do ambiente, o que pode resultar em baixa reprodutividade fermentativa, elevada variabilidade sensorial e maior suscetibilidade à contaminação. O presente estudo avaliou o desempenho fermentativo de diferentes leveduras na produção de cachaça, em escala de bancada e piloto. O mosto de caldo de cana apresentou pH inicial de 5,20, com redução para valores entre 3,64 e 4,47 ao final de 24 horas de fermentação. As análises por HPLC apontam maior hidrólise de sacarose e maior disponibilidade de glicose (3,4 – 4,6%) e frutose (3,9 – 5,9%) para as cepas CSII5, VSI14, VSI19 e VH12, refletindo maior eficiência fermentativa inicial. A produção de etanol após 24 horas variou de aproximadamente 1,2% (CA-11 e CSII5) a 3,0% (VH12 e VSI19). As populações finais de leveduras situaram-se entre 7,4 e 12,7 Log UFC/mL, sendo VH12 o fermentado com maior densidade celular e maior liberação de CO₂. Em escala piloto, as cachaças apresentaram teores alcoólicos entre 41,8 e 43,2% (v/v), atendendo à legislação brasileira. A maioria dos parâmetros físico-químicos permaneceu dentro dos limites

estabelecidos pela Instrução Normativa MAPA nº 539/2022; contudo, a cachaça CA-11 apresentou teor elevado de álcoois superiores totais ($403,6 \pm 0,8$ mg/100 mL de etanol anidro), acima do limite legal, além de presença de partículas em suspensão (PPS). O grupo focal evidenciou perfis distintos entre as cachaças, com VH12 sendo a mais preferida e CSI15 destacando-se pelo perfil aromático. Os resultados confirmam que a levedura utilizada exerce influência decisiva sobre o desempenho fermentativo, a composição química e o perfil sensorial da cachaça.

Palavras-chave: Inóculo; Performance fermentativa; Fermentação alcoólica; Compostos químicos; Sensorial.

1. INTRODUÇÃO

A cachaça é uma das bebidas destiladas mais representativas do Brasil, sendo considerada um produto de relevância econômica, social e cultural (Ratkovich et al., 2023; IBRAC, 2024). Muitos alambiques brasileiros conduzem a fermentação do caldo de cana por meio de microbiota nativa presente na matéria-prima e no ambiente de produção, gerando bebidas com perfis sensoriais singulares e que preservam técnicas tradicionais centenárias (Soares, Silva e Schwan, 2011; Da-Silva et al., 2023).

Apesar do valor cultural e histórico do uso da fermentação espontânea, essa abordagem pode resultar em baixa repetibilidade fermentativa entre os ciclos, maior variabilidade sensorial e maior suscetibilidade à contaminação por microrganismos indesejados, comprometendo o rendimento alcoólico e a qualidade da cachaça (Ribeiro, 2016). Dessa forma, a seleção e aplicação de cepas autóctones, previamente caracterizadas e adaptadas às condições ambientais das destilarias, tem sido apontada como estratégia tecnológica promissora para conciliar padronização industrial com autenticidade sensorial regional (Silveira et al., 2021; Ratkovich et al., 2023).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente reconhecida como o principal agente fermentativo na produção de cachaça devido à sua elevada robustez metabólica, eficiência na conversão de açúcares em etanol e resistência a condições de estresse típicas do processo, como variações de temperatura e elevados teores alcoólicos (Alcarde, Monteiro e Belluco, 2012). Entretanto, leveduras não-*Saccharomyces* também são frequentemente associadas a fermentações espontâneas e podem contribuir de modo relevante para a formação

de compostos voláteis, como ésteres, álcoois superiores e aldeídos, os quais desempenham papel essencial no desenvolvimento do *on-flavour* do produto (Varela, 2016).

Nesse contexto, a avaliação da performance fermentativa de leveduras isoladas de unidades produtoras e a composição química dos destilados gerados pelas mesmas contribuem para avanços tecnológicos capazes de fortalecer o setor de produção da cachaça de alambique, promover aumento de produtividade e valorizar a biodiversidade microbiana brasileira (Da-Silva et al., 2023; Ratkovich et al., 2023). Diante disso, este capítulo foi conduzido com o objetivo de utilizar leveduras isoladas da região de Salinas-MG, reconhecida pela tradição na produção de cachaça de alambique, avaliando seu potencial tecnológico em escala piloto, composição química do destilado e atributos sensoriais associados à qualidade final do produto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Leveduras

Os nove isolados de leveduras avaliados neste estudo estão depositados na Coleção de Culturas do Laboratório de Microbiologia de Produtos Fermentados da Universidade Federal de Viçosa (FERMICRO/UFV). Esses isolados foram previamente obtidos a partir de cana-de-açúcar e de caldo de cana fermentado (vinho) utilizado na produção de cachaça, provenientes de quatro diferentes unidades produtoras da região de Salinas–MG. O estudo anterior foi iniciado com o isolamento de 156 leveduras, as quais foram posteriormente submetidas a etapas de caracterização fisiológica e identificação, resultando na seleção dos nove isolados utilizados neste trabalho (Tabela 1). As culturas foram mantidas a - 80 °C em tubos criogênicos contendo 30% (v/v) de glicerol estéril e 70% (v/v) de caldo YPD (2% m/v de glicose, 2% m/v de peptona, 1% m/v de extrato de levedura e 2% m/v de ágar) cultivado. A cepa *Saccharomyces cerevisiae* (LNF CA-11), cultura comercial amplamente utilizada no país para produção de cachaça, foi utilizada como controle experimental.

Tabela 1. Identificação das espécies de leveduras.

Propriedade	Código	Identificação	Origem
Controle	CA-11	<i>S. cerevisiae</i>	Comercial
SL - P1	VSL5	<i>S. cerevisiae</i>	Vinho
	VSL19	<i>S. cerevisiae</i>	Vinho
SN - P3	VSN12	<i>S. cerevisiae</i>	Vinho
	VSN14	<i>S. cerevisiae</i>	Vinho
SI - P4	CSI15	<i>Meyerozyma</i> sp.	Cana-de-açúcar
	VSI14	<i>S. cerevisiae</i>	Vinho
	VSI19	<i>S. cerevisiae</i>	Vinho
H - P5	VH11	<i>S. cerevisiae</i>	Vinho
	VH12	<i>S. cerevisiae</i>	Vinho

Legenda: SL = propriedade 1; SN = propriedade 3; SI = propriedade 4 e H = propriedade 5.

2.2. Performance fermentativa em escala de bancada

Inicialmente, foi realizado *screening* em bancada com todas as leveduras, com o objetivo de avaliar seu desempenho em condições controladas. Esse ensaio permitiu comparar parâmetros essenciais, como consumo de açúcares, produção de etanol e comportamento fermentativo no caldo de cana. Com base nesses resultados, foi selecionada a levedura *Meyerozyma* sp. e apenas uma cepa de *S. cerevisiae* que apresentou melhor performance fermentativa para a etapa de produção de cachaça em escala piloto.

2.2.1. Elaboração do fermento

Os isolados foram utilizados como inóculo para fermentação do mosto de cana-de-açúcar em escala laboratorial, conforme Gonçalves et al. (2019). Inicialmente, cada isolado foi padronizado (10^8 células/mL) e reativado em 5 mL de caldo YPD, seguido de incubação a 28 °C *overnight* sob agitação. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas (10.000 rpm /10 min.) e o *pellet* utilizado para inoculação em 10 mL de mosto estéril (5 °Brix), com incubação a 30 °C sob agitação durante 24 horas. Em seguida, uma série de quatro etapas de ativações

com diferentes volumes de mosto e teores crescentes de sólidos solúveis totais (SST) foram realizadas a fim de se produzir quantidade suficiente de fermento para a fermentação propriamente dita. Da etapa 1 até a 4, foram utilizados: 10 mL de mosto (5 °Brix); 20 mL de mosto (7 °Brix); 40 mL de mosto (9 °Brix) e 80 mL de mosto (11 °Brix), respectivamente. Após os respectivos períodos de incubação, o volume de cada frasco foi transferido assepticamente para o frasco da etapa seguinte, até que se obtivesse volume final de 160 mL de fermento. O mesmo procedimento foi realizado para a levedura controle (LNF CA-11).

2.2.2. Fermentação em escala de bancada e análises físico-químicas e microbiológica

A fermentação do mosto foi realizada em recipientes de vidro de 500 mL com tampas tipo *airlock* embutido, sendo conduzida a 30 °C por 24 horas, sem agitação. Para isso, adicionaram-se 15% (v/v) do fermento em 300 mL de caldo de cana-de-açúcar estéril com teor de sólidos solúveis (TSS) corrigido para 15 °Brix. Este procedimento foi realizado para cada um dos isolados, bem como para a levedura controle (LNF CA-11), em triplicata. Com o intuito de acompanhar o processo fermentativo, as seguintes análises foram realizadas no tempo 0 h e a cada 6 horas de fermentação: medida de pH, com potenciômetro previamente calibrado (Adolfo Lutz, 2008) e TSS (°Brix) com refratômetro digital (Dorneman, 2016). Alíquotas de 10 µL correspondentes às diluições decimais seriadas foram plaqueadas, em triplicata, utilizando-se a técnica de *drop-plate* em ágar YPD a 28 °C (Salvo et al., 2022). Após 24 horas, as colônias foram contadas e os resultados foram expressos em Log UFC/mL.

Além disso, alíquotas de 1,5 mL foram coletadas ao final do processo fermentativo para determinação das concentrações de açúcares residuais (sacarose, glicose e frutose) e de etanol em Cromatógrafo LC-20A (Prominence Shimadzu, Japão) equipado com detector de índice refrativo RID-20A e coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, 9 µm, Munich, Germany), em triplicata (Suman et al., 2011; Oriez et al., 2018). Para a corrida, utilizou-se solução de 5 mM de ácido sulfúrico (Millipore, Germany), com fluxo 0,7 mL/min e temperatura de 45 °C. A concentração dos componentes químicos foi determinada utilizando-se a corrida de modo isocrático e curvas-padrão, previamente elaboradas.

Todos os experimentos descritos foram realizados em triplicata. Inicialmente, os dados foram submetidos à análise de normalidade para verificação da distribuição dos resíduos. Como os dados não atenderam aos pressupostos de normalidade, optou-se pela utilização de testes estatísticos não-paramétricos. Assim, foi aplicada a análise de *Kruskal–Wallis* para verificar diferenças significativas entre os tratamentos, seguida do teste de *Mann–Whitney* para

comparações em pares, a fim de identificar quais tratamentos diferiram entre si, considerando nível de significância de 5%. Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* R.

2.3. Produção da cachaça em escala piloto

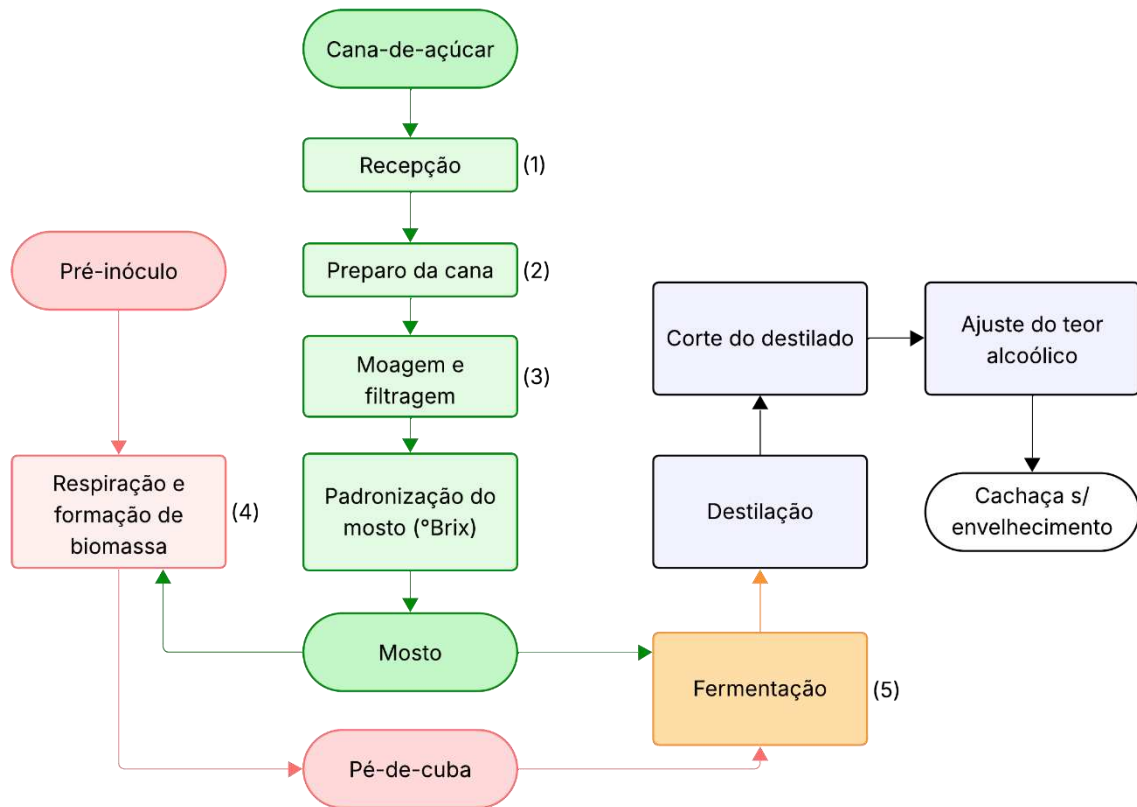
Colônias puras das leveduras selecionadas foram reativadas em 10 mL de caldo YPD e incubadas sob agitação a 30 °C por 24 h. Em seguida, o cultivo foi sucessivamente transferido para diferentes volumes e concentrações crescentes de caldo de cana estéril, de modo a promover o aumento gradual da biomassa em condições similares às aplicadas ao processo fermentativo da cachaça. A primeira transferência foi realizada para 100 mL de caldo de cana ajustado a 5 °Brix, seguido de nova incubação nas mesmas condições. Posteriormente, o cultivo foi transferido para 240 mL de caldo de cana a 7 °Brix e, por fim, para 350 mL de caldo de cana a 11 °Brix, mantendo-se a temperatura de 30 °C e agitação contínua durante todas as etapas. A produção das cachaças foi realizada nas instalações do Instituto Federal do Norte de Minas Gerais, campus Salinas (IFNMG), em planta piloto destinada à produção de cachaça de alambique (Figura 1B), conforme fluxograma a seguir (Figura 1A).

Inicialmente, a cana-de-açúcar foi avaliada quanto ao grau de maturação, selecionando-se colmos em estágio de maturação completa. Após essa avaliação, a cana foi cortada, despontada, transportada ao local de processamento e processada em período inferior a 24 horas após a colheita, a fim de evitar perdas de qualidade e alterações microbiológicas do caldo. Em seguida, realizou-se a lavagem da cana-de-açúcar para remoção de impurezas e frações deterioradas. Posteriormente, procedeu-se à moagem dos colmos para extração do caldo, o qual foi filtrado em malha com abertura de 20 µm para remoção de partículas sólidas. O caldo de cana obtido foi utilizado como substrato para propagação dos inóculos em maior escala. Para cada pré-inóculo, preparou-se um mosto nutritivo contendo 500 mL de caldo de cana ajustado para 1,5 °Brix. Em seguida, 700 mL de pré-inóculo contendo a biomassa de leveduras foram incorporados ao mosto, realizando-se homogeneização por 10 minutos com auxílio de compressor de ar e pedras porosas, seguida de repouso por 40 min, sem aeração.

O inóculo ativo foi transferido para dornas de propagação com volume útil de 50 L, iniciando-se a alimentação com mosto cru na concentração de 5 °Brix, sob aeração contínua e temperatura entre 28 e 30 °C. Sempre que o teor de açúcares decaía para cerca de 2 °Brix, 3 L de mosto a 6 °Brix eram adicionados, de modo a se assegurar as condições adequadas para o crescimento celular. Esse procedimento foi repetido até que o volume útil da dorna fosse completado (50 L), o que ocorreu ao final de aproximadamente quatro dias. Após a completa

atenuação dos açúcares (0 °Brix), a aeração foi interrompida e o sobrenadante foi removido, preservando-se apenas o “pé-de-cuba”.

A



B

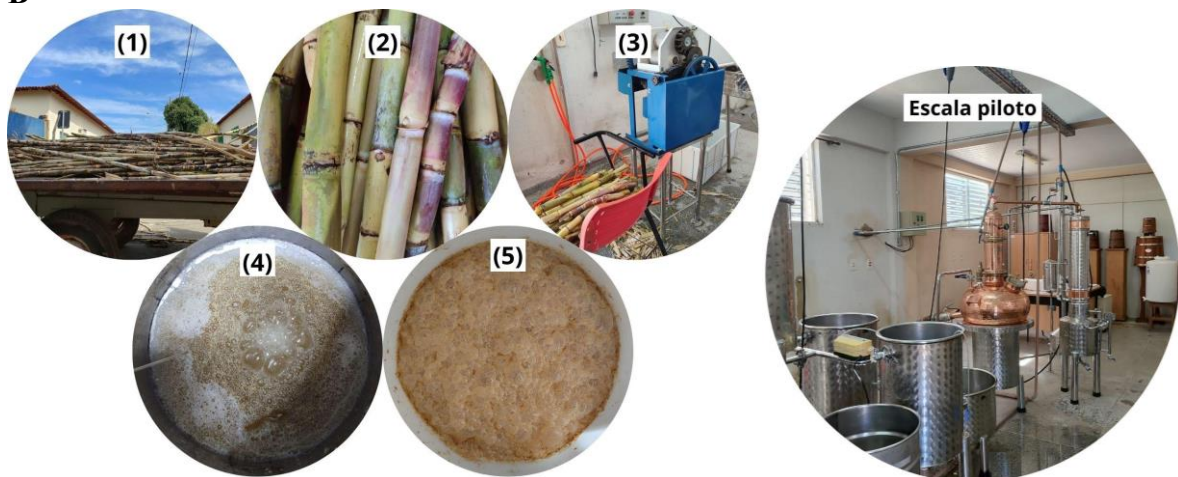


Figura 1. Produção de cachaça de alambique em escala piloto. A) Fluxograma simples de produção. B) Operações da produção de cachaça: (1) - Recepção da cana; (2) - Corte e lavagem da cana; (3) - Moagem da cana; (4) - Elaboração do fermento “pé-de-cuba” com aeração e (5) - Fermentação do mosto sem aeração. Fotografia à direita - Planta piloto de produção de cachaça de alambique do IFNMG campus Salinas (MG).

Na etapa de fermentação, o “pé-de-cuba” remanescente recebeu sucessivas alimentações com mosto entre 10 e 15 °Brix, sem aeração e mantendo-se a temperatura entre 28 e 30 °C. Quando o teor de açúcares atingia 3 °Brix, novas adições eram realizadas de forma crescente: seis alimentações de 8 L cada, utilizando mosto cru com concentrações progressivas de açúcares. Foram realizadas uma adição de mosto ajustado para 10 °Brix, seguidas por duas adições de mosto a 12 °Brix e, nas etapas finais, duas adições de mosto ajustado para 15 °Brix. Por fim, foram adicionados 10 L de mosto a 15 °Brix, obtendo-se um volume total de 50 L de vinho fermentado. Após a nova queda dos açúcares a 0 °Brix, o vinho passou por “espelhamento” para sedimentação da biomassa (remoção da levedura em suspensão), garantindo maior limpidez da fração destinada à destilação, enquanto o “pé-de-cuba” foi mantido para condução de ciclos fermentativos subsequentes. Ao todo, foram conduzidos 15 ciclos fermentativos consecutivos, com reaproveitamento do “pé-de-cuba”.

A destilação foi realizada em alambique de cobre durante aproximadamente 150 min., com temperatura de aquecimento da panela a 92 °C e 60 °C na coluna de destilação (fluxo lento), resultando em temperatura de saída do destilado de cerca de 28 °C. A fração inicial do destilado, denominada “cabeça”, equivalente a cerca de 5% do volume total, e a fração final “cauda” foram descartadas, coletando-se exclusivamente a fração intermediária, denominada “coração”. A cachaça obtida em cada ciclo foi acumulada para posterior padronização do teor alcoólico a 40 °GL mediante adição de água destilada. As cachaças obtidas foram acondicionadas em garrafas de vidro âmbar e armazenadas em ambiente arejado. Por fim, as cachaças passaram pelo processo de descanso e amaciamento dos seus componentes químicos durante três meses.

2.4. Análise físico-química das cachaças

As amostras de cachaça produzidas neste estudo foram enviadas ao Centro de Referência em Cachaça da Universidade Federal de Viçosa (UFV) Florestal para realização das análises físico-químicas de acordo com os métodos oficiais estabelecidos pela legislação brasileira (Portaria nº 539/2022), conforme as metodologias apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Metodologias utilizadas para análise físico-químicas de cachaças.

Parâmetros	Unidade de medida	Metodologia*
Aparência e cor	-	Visual
Teor alcoólico	% v/v a 20 °C	Densímetro
Acidez volátil (ácido acético)	mg/100 mL etanol	Titulação
Ésteres totais (acetato de etila)	mg/100 mL etanol	CG – FID
Aldeídos totais (acetaldeído)	mg/100 mL etanol	CG – FID
Álcool metílico	mg/100 mL etanol	CG – FID
Alcool sec-butilico	mg/100 mL etanol	CG – FID
Alcool n-butilico	mg/100 mL etanol	CG – FID
Álcool isobutilico	mg/100 mL etanol	CG – FID
Álcool isoamílico	mg/100 mL etanol	CG – FID
Álcool n-propílico	mg/100 mL etanol	CG – FID
Alcoois Superiores Totais	mg/100 mL etanol	-
Furfural e Hidroximetilfurfural	mg/100 mL etanol	HPLC
Coefficiente de Congêneres	mg/100 mL etanol	-
Lactato de Etila	mg/100 mL etanol	CG – FID
Carbamato de Etila	µg/L	CG – MS
Teor de Cobre	mg/L	FAAS

* Metodologias utilizadas pela equipe técnica do Centro de Referência em Cachaça da Universidade Federal de Viçosa campus Florestal. GC - FID (Cromatografia gasosa com detector de ionização por chama); HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector UV); GC - MS (Cromatografia gasosa acoplado com Espectrometria de Massas); AAS (Espectrometria de Absorção Atômica com Chama).

2.5. Grupo de foco (*Foccus group*)

Os padrões de percepção dos atributos sensoriais das cachaças produzidas foram obtidos por meio de um grupo focal composto por seis participantes maiores de 18 anos, relatando gostar moderadamente a muitíssimo de cachaça, com frequência de consumo semanal a mensal.

A participação foi voluntária, sendo adotado como critério de inclusão possuir o hábito de consumir cachaça, independentemente de experiência prévia em análise sensorial. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no processo sob o nº 57221222.1.0000.5153, e todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes do início das atividades (Anexo I). A sessão foi conduzida conforme a técnica de grupo focal descrita por Ginon et al., (2014) e Costa et al., (2024), com adaptações. Foram avaliadas duas amostras de cachaça, apresentadas individualmente e em ordem sequencial monádica e codificadas com três dígitos aleatórios. Cada cachaça foi servida em copo plástico transparente, contendo 5 mL do produto. Entre as degustações, os participantes receberam biscoitos água e sal e água para limpeza do paladar, além de pó de café para neutralização de possíveis resíduos aromáticos.

Um moderador treinado conduziu a discussão de maneira imparcial, estimulando a participação de todos sem interferir nas respostas individuais. Durante a avaliação, os consumidores foram incentivados a descrever espontaneamente atributos relacionados ao aroma, sabor e sensação na boca, bem como aspectos ligados à qualidade percebida, preferência e contexto de consumo da bebida. O diálogo seguiu um roteiro estruturado previamente definido (Apêndice D). Toda a sessão foi registrada em áudio para posterior transcrição e análise das informações. Os dados obtidos foram analisados qualitativamente por meio de *software* IRaMuTeQ, empregando-se análise de conteúdo para identificação de categorias temáticas e padrões de percepção entre os participantes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Performance fermentativa em escala de bancada

O caldo de cana utilizado no experimento apresentou pH inicial de 5,2, valor compatível com o reportado pela literatura para caldos recém-extraídos, que geralmente variam entre 5,0 e 6,0, dependendo da variedade, maturação, condições de colheita e armazenamento, bem como da presença de microrganismos (Prati e Camargo, 2008). Logo após a adição do fermento (mosto com inoculação - 0 h), observou-se uma brusca redução do pH, efeito associado à presença de produtos metabólicos previamente acumulados, como ácidos orgânicos e compostos intermediários resultantes das sucessivas propagações para formação do inóculo propriamente dito (Figura 2A). Esse comportamento indica que o fermento apresenta elevada atividade metabólica, com pH variando de $4,33 \pm 0,31$ a $3,36 \pm 0,14$, refletindo a presença de

leveduras ativas e adaptadas ao ambiente fermentativo (Figura 2B). Essa condição é desejável, uma vez que o meio ácido do fermento atua como barreira natural contra microrganismos contaminantes, garantindo maior estabilidade microbiológica durante o início da fermentação principal (Ladino-Garzon, Barrios-Rodríguez e Amorocho-Cruz, 2024).

Nas primeiras horas de fermentação (6 h), ocorreu elevação do pH, seguida de uma queda gradual até o final do processo. Estudos demonstram que o pH de mostos fermentativos não é estático, mas varia de forma dependente da composição química inicial, da fonte de nitrogênio assimilável e da produção de ácidos orgânicos pelas leveduras. A capacidade tampão da matriz do mosto pode atenuar eventuais variações, mas a dinâmica de consumo dos açúcares continua a influenciar o pH ao longo da fermentação (De-Barros e Ribeiro-Filho, 2025). À medida que o crescimento celular prossegue e o metabolismo fermentativo se intensifica, há produção de novos ácidos provenientes do catabolismo de açúcares e aminoácidos, o que leva novamente à redução gradual do pH (Amorim et al., 2011). Por fim, à medida que a fermentação avança, há acúmulo de ácidos orgânicos, etanol e CO₂, resultando em queda progressiva do pH até valores próximos de 3,5, conforme descrito por Müller et al., (2023) e Felix, Ogbebor e Vincent (2014).

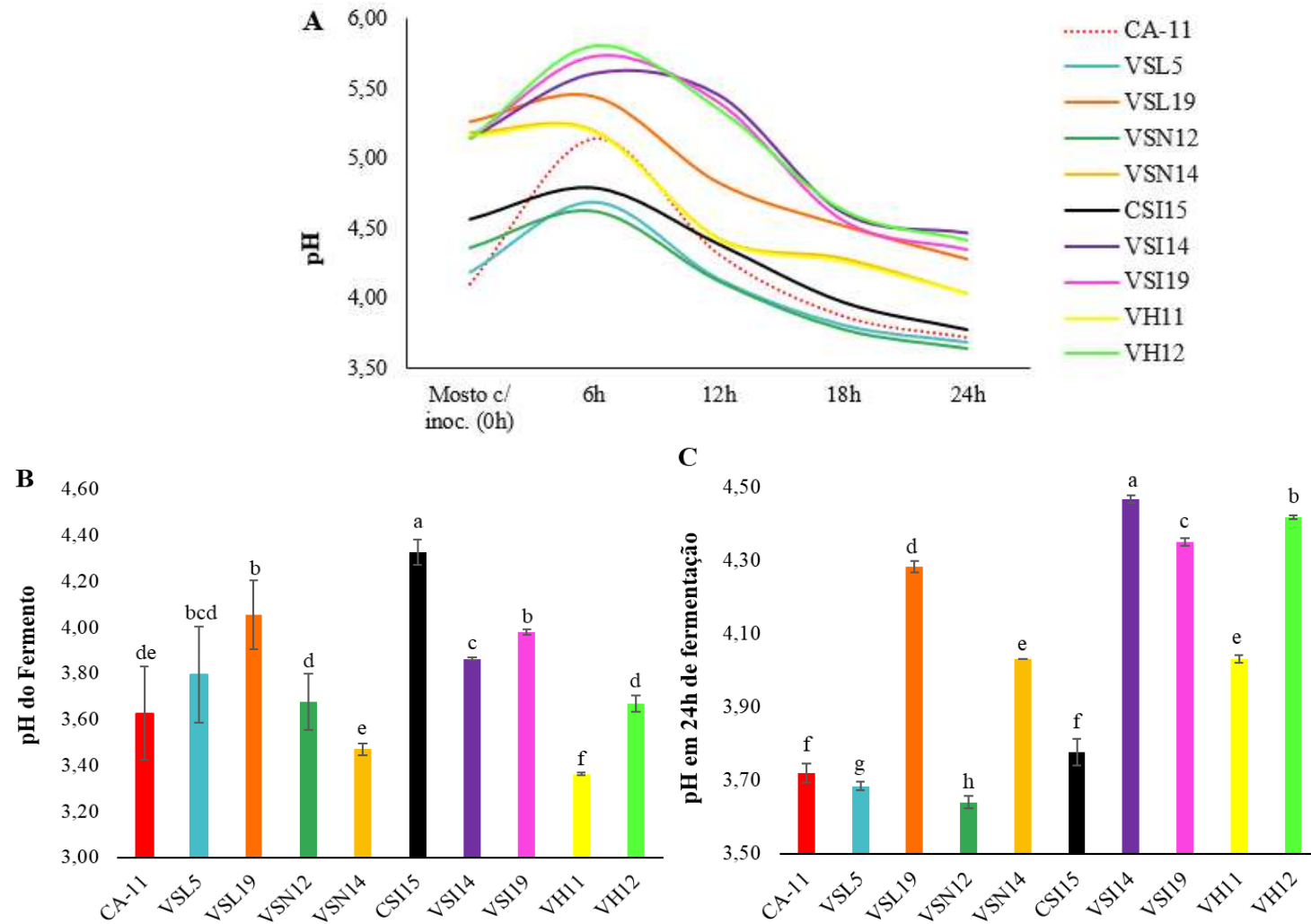


Figura 2. Resultados do pH. A) Performance dos isolados em relação ao pH ao longo das 24 h de fermentação. B) pH do fermento oriundo de diferentes leveduras. C) pH do vinho ao final do processo de fermentação. Barras seguidas da mesma letra não diferem entre si (nível de significância de 5% pelo teste *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney*).

A importância do acompanhamento do pH durante o processo fermentativo está relacionada ao controle microbiológico (Cardoso, 2020). Valores de pH do vinho acima de 4,5 favorecem a proliferação de bactérias indesejáveis, especialmente espécies de *Lactobacillus* e *Acetobacter*, que competem com as leveduras por nutrientes e produzem ácidos indesejáveis, prejudicando o rendimento e a qualidade do destilado (Reis et al., 2018; Pirrone et al., 2025). Por outro lado, valores inferiores a 3,5 podem reduzir a atividade enzimática das leveduras, levando à fermentação incompleta (Monteiro et al., 2018). No vinho fermentado por 24 h, observou-se diferença estatística para cada um dos mostos fermentados (com exceção de CA-11 e CSI15; VSN14 e VH11), bem como variação de pH entre $4,47 \pm 0,01$ e $3,64 \pm 0,02$, demonstrando uma faixa esperada e de interesse ao final do processo fermentativo. Não foi observada correlação direta entre o pH inicial dos fermentos e o pH final dos vinhos após 24 horas de fermentação, indicando que a dinâmica do pH no meio fermentativo é influenciada por diversos fatores metabólicos e microbianos que ocorrem durante o processo de fermentação.

No que se refere aos SST, todas as amostras apresentaram valores iniciais próximos de 15,5 °Brix, evidenciando a homogeneidade do mosto utilizado. Observou-se uma redução progressiva dos valores de °Brix ao longo do tempo em todos os tratamentos, com valores finais variando entre 8,5 e 12,5 °Brix (Figura 3A), o que era esperado tendo vista que as leveduras metabolizam os açúcares fermentescíveis do substrato (Amorim et al., 2011). VSI14 e VH12 destacaram-se pela maior eficiência na redução dos SST durante as 24 horas avaliadas, enquanto CA-11 apresentou cinética mais lenta de consumo de açúcares. Entretanto, os valores finais observados sugerem que as fermentações não foram concluídas dentro do período analisado. De acordo com Cardoso (2020), ao final de uma fermentação alcoólica completa, os valores de °Brix devem se aproximar de zero, refletindo o esgotamento dos açúcares disponíveis. Ainda assim, a queda significativa observada em 24 horas já indica que algumas leveduras apresentaram maior vigor fermentativo inicial, característica desejável para processos industriais de produção de cachaça, indicando uma rápida adaptação ao meio e maior eficiência na conversão de açúcares em etanol (Basso, Basso e Rocha, 2011).

Além do acompanhamento do SST ao longo da fermentação, foi realizada quantificação dos açúcares residuais presentes nos vinhos após 24 horas de fermentação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (Figura 3B). O mosto sem inoculação apresentou 16% de sacarose, 0,5% de glicose e 0,4% de frutose. As amostras CA-11, VSL5, VSL19, VSN12, VNS14 e VH11 apresentaram maior porcentagem de sacarose residual (variando de 9,6 a 12,4%), e, conseqüentemente, pouca hidrólise em glicose (variando de 0,7 a 1,8%) e frutose (variando de 0,5 a 1,3%) nas 24 horas avaliadas. Esse comportamento sugere menor capacidade

inicial de adaptação metabólica, baixa eficiência da enzima invertase ou baixa expressão dos genes relacionados a enzima, cuja ação é essencial para disponibilizar monossacarídeos para a glicólise e posterior produção de etanol (Reis et al., 2018). Por outro lado, CSI15, VSI14, VSI19 e VH12 apresentaram quantidades consideráveis de glicose (variando de 3,4 a 4,6%) e frutose (variando de 3,9 a 5,9%); esse perfil é condizente com leveduras mais adaptadas ao meio, que demonstram maior velocidade fermentativa inicial e maior capacidade de metabolizar açúcares simples, o que tende a resultar em maior produtividade alcoólica (Maicas, 2020).

A análise dos teores de etanol (%) produzidos em 24 horas corroborou a relação entre o consumo de açúcares e a conversão alcoólica (Figura 3C). Os cultivos com as linhagens VSI19 e VH12, que apresentaram maiores proporções de glicose e frutose residuais no meio, também foram os que resultaram nos maiores teores de etanol, alcançando valores próximos a 3%. Esses resultados indicam que essas leveduras apresentam maior eficiência fermentativa inicial, confirmando seu potencial biotecnológico para uso como culturas iniciadoras em processos de produção de cachaça. Em contrapartida, CSI15 e CA-11 apresentaram os menores valores de etanol produzidos (aproximadamente 1,2%). A levedura *Meyerozyma* sp. apresenta menor eficiência na conversão de açúcares em etanol; entretanto, diversos trabalhos destacam a participação de diferentes leveduras não-*Saccharomyces* na modulação do aroma e do sabor da bebida (Padilla, Gil e Manzanares, 2016; Ciani, Canonico e Comitini, 2022).

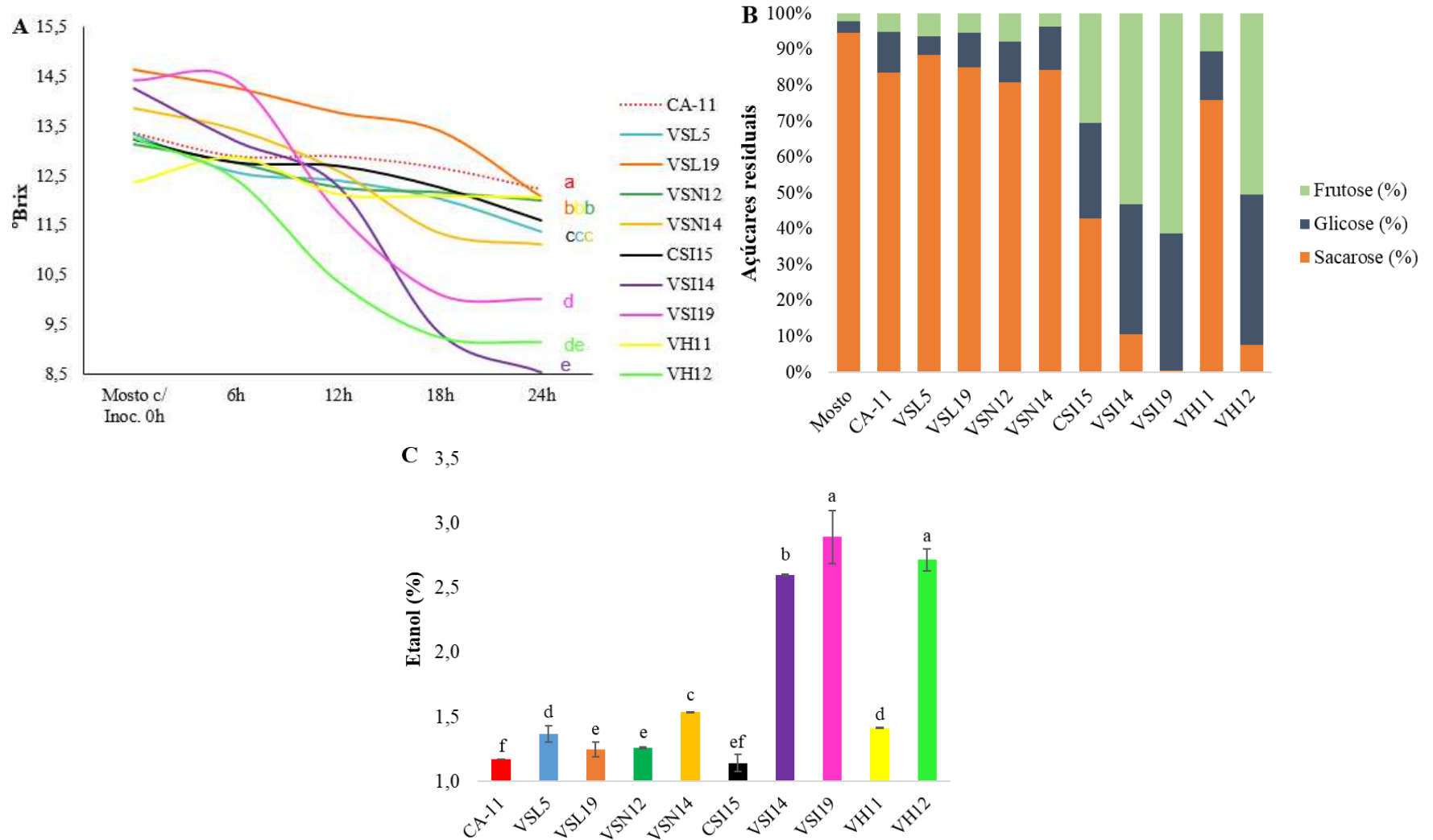
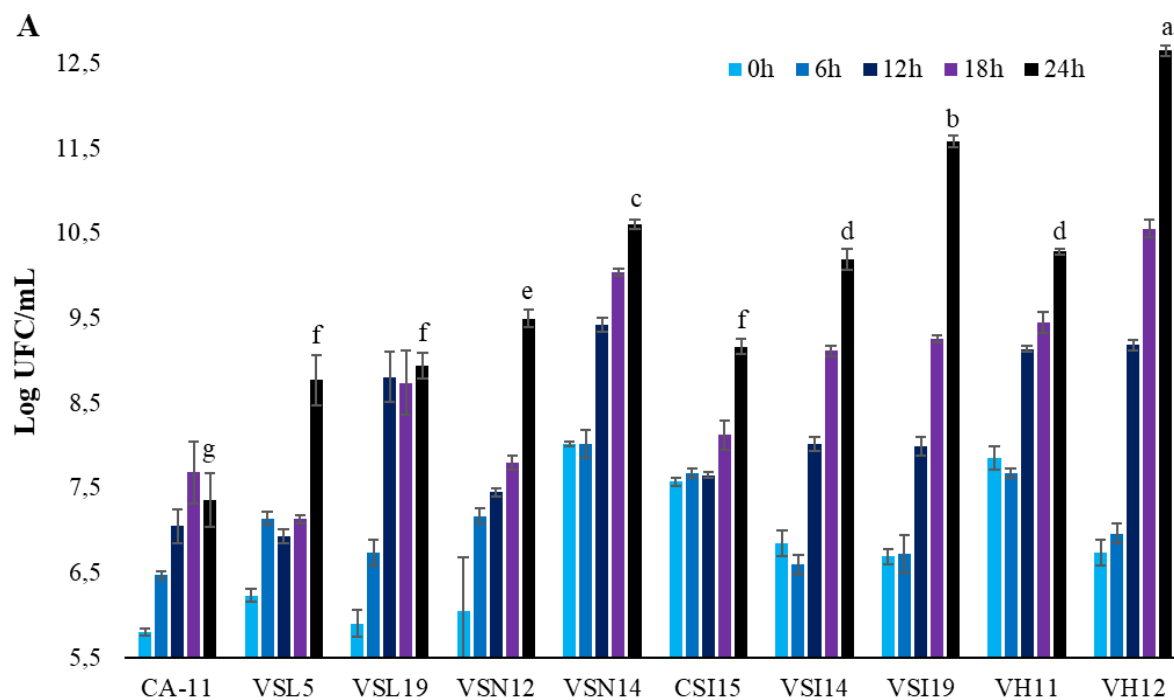


Figura 3. A) Performance dos isolados em relação ao SST ao longo das 24 h de fermentação. B) Porcentagem de sacarose, glicose e frutose presente no vinho após 24 h de fermentação. C) Resultados da produção de etanol (%) após 24 h de fermentação. Linhas e barras seguidas da mesma letra não diferem entre si (nível de significância de 5% pelo teste *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney*).

Em relação à densidade populacional, os dados obtidos indicam que as populações de leveduras ao final da fermentação variaram entre $7,4 \pm 0,3$ e $12,7 \pm 0,1$ Log UFC/mL, sendo CA-11 o tratamento que apresentou os menores valores; já VH12 apresentou as maiores densidades celulares, aproximando-se do valor atípico de 13 Log UFC/mL (Figura 4A). Valores dessa ordem de grandeza são incomuns em fermentações alcoólicas em batelada; a maioria dos estudos envolvendo fermentações alcoólicas por leveduras, em escala laboratorial ou semi-industrial, reporta concentrações celulares geralmente entre 6 e 8 Log UFC/mL, podendo atingir valores mais elevados (9 a 10 Log UFC/mL) apenas sob condições específicas, como reciclo celular, elevada carga de inóculo ou processos industriais otimizados (Basso, Basso e Rocha, 2011). O que poderia explicar em parte este fenômeno é a ocorrência de floculação e formação de agregados celulares que podem afetar tanto a dinâmica do processo quanto a avaliação quantitativa da biomassa. A floculação, fenômeno bem caracterizado para *S. cerevisiae*, resulta da adesão célula-a-célula mediada por proteínas e glicoproteínas codificadas por genes do tipo *FLO* e é modulada por variáveis do meio e pelas condições de cultivo (Rossouw et al., 2015; De et al., 2025). Esse comportamento leva à formação de agregados que podem sedimentar ou flutuar e, dependendo do protocolo de amostragem e pré-tratamento, superestimar ou subestimar as contagens aparentes.

Além de VH12 ter apresentado as maiores populações, foi responsável pela mais alta formação de espuma registrada entre as fermentações avaliadas, o que indica um vigor fermentativo elevado (Figura 4B). As demais fermentações por diferentes leveduras avaliadas exibiram perfis de formação de espuma menos intensos: VSN14, VSI14, VSI19 e VH11 classificaram-se como de formação moderada; VSL19 e VSN12 como de formação leve; enquanto CA-11 (controle), VSL5 e CSI15 apresentaram baixa formação de espuma. Essas diferenças refletem variações intrínsecas no vigor fermentativo, na capacidade de atenuação dos açúcares e possivelmente no comportamento de agregação celular e resistência ao estresse, fatores que impactam diretamente no rendimento etanólico e na eficiência do processo (Westman et al., 2014; Divate et al., 2016).



B

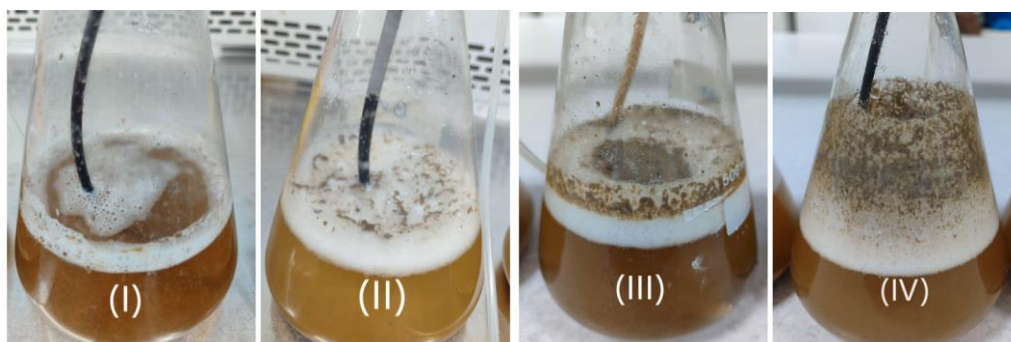


Figura 4. Comportamento fermentativo das leveduras. A) Populações de leveduras ao longo de 24 h de fermentação (Log UFC/mL). Barras seguidas da mesma letra não diferem entre si (nível de significância de 5% pelo teste *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney*). B) Formação de espuma durante o processo de fermentação: (I) - Baixa produção de espuma; (II) - Leve produção de espuma; (III) - Moderada produção de espuma e (IV) - Alta produção de espuma.

A correlação observada entre atenuação dos açúcares, produção de etanol, populações finais de leveduras e produção de CO₂ justificou a priorização de cepas para escala piloto. Sendo assim, a VH12 (*S. cerevisiae*) foi selecionada por combinar esses resultados; já CSI15 (*Meyerozyma* sp.) foi mantida por apresentar características complementares que podem contribuir para perfis sensoriais da bebida; e o controle CA-11 (LNF CA-11) foi incluído como referência para comparação com padrões comerciais.

3.2. Produção da cachaça em escala piloto

Durante a propagação das leveduras avaliadas, observaram-se comportamentos tecnológicos distintos que merecem destaque (Figura 5). As leveduras CSI15 e CA-11 exibiram a formação de bolhas de gás mais dispersas e de maior diâmetro no meio de propagação, enquanto VH12 apresentou uma massa de leveduras concentrada na região superficial, similar a um depósito de células (“borra”). Esse tipo de fenômeno pode estar associado à floculação ou agregação celular da levedura, o que afeta a suspensão celular e a oxigenação do meio de propagação, fatores que influenciam o desempenho fermentativo (Parapouli et al., 2020).

Na fase de fermentação (sem aeração), as três cepas apresentaram diferenças visuais na formação de bolhas de CO₂, o que sugere variações em taxa de fermentação, liberação de gás e formação de massa de células no tanque fermentador. A levedura CSI15 apresentou formação de bolhas menores, VH12 manifestou alta formação de CO₂, inclusive com aparência de massa de pão, e CA-11 exibiu bolhas maiores e irregulares. Em termos sensoriais, todas as três fermentações apresentaram aromas agradáveis, mas diferenciados entre si. VH12, por exemplo, se destacou pelo aroma de fruta madura (como banana). Esse resultado é coerente com a literatura que demonstra que leveduras distintas produzem diferentes composições de compostos voláteis que conferem aroma e sabor característicos à cachaça. Nova et al., (2009) apontaram que o perfil aromático da cachaça depende fortemente da levedura utilizada, das condições de fermentação e da microbiota presente no mosto (Nova et al., 2009).

Outro aspecto tecnológico relevante é a velocidade de decantação da biomassa ao final da fermentação, visando o espelhamento do mosto (remoção da levedura em suspensão), antes da destilação. A decantação influencia diretamente na qualidade do fermentado a ser destilado, reduzindo sólidos suspensos e biomassa residual, que podem gerar defeitos ou alterar o rendimento e composição da destilação (Cardoso, 2020). Em todas as fermentações foi observado tempo mínimo de 24 h para que ocorresse o espelhamento, sendo que VH12 não chegou a espelhar completamente no tempo observado. Esse atraso de espelhamento pode estar relacionado à forte floculação superficial e baixa sedimentação da biomassa, o que pode comprometer o processo subsequente. Estudos com fermentação de cachaça já apontam para a importância da reciclagem celular e clarificação entre ciclos para manter o desempenho e a composição volátil equilibrada (Stewart, 2018; Farias, Alcarde e Filho, 2020).

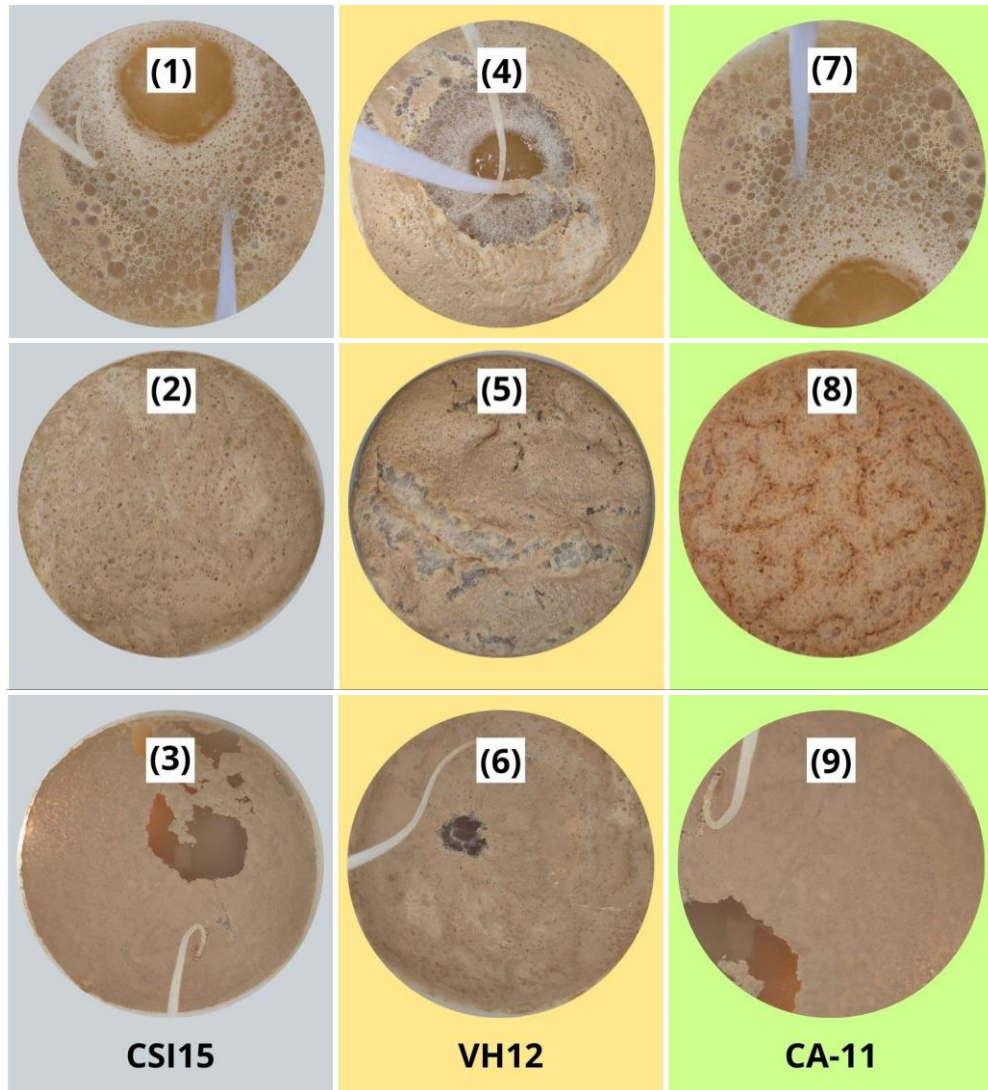


Figura 5. Comportamento das leveduras nos estágios de propagação (1, 4 e 7), fermentação (2, 5 e 8) e espelhamento antes da destilação (3, 6 e 9). Cinza - Levedura CSI15; Amarelo - Levedura VH12 e verde - Levedura CA-11 (controle).

Finalmente, no processo de destilação, embora as primeiras destilações “lambicadas” tenham apresentado rendimento menor de destilado “coração” (fração de interesse da cachaça) – com o avanço dos ciclos de fermentação e adaptação do fermento ao processo – o rendimento aumentou nos ciclos subsequentes. Esse fenômeno pode ser explicado pela adaptação fisiológica da levedura, além de possível melhoria no controle e operação nos ciclos iniciados. A literatura de destilação de bebidas alcoólicas e de cachaça em particular destaca que a consistência da levedura em relação ao vigor fermentativo e à adaptação entre os ciclos são fatores críticos para se otimizar o rendimento e a qualidade (Farias, Alcarde e Filho, 2020; Pereira, Acevedo e Alcarde, 2024).

3.3. Análise química das cachaças

A avaliação dos parâmetros físico-químicos das cachaças CA-11, CSI15 e VH12, à luz dos limites estabelecidos pela Instrução Normativa MAPA nº 539/2022 (Tabela 3), evidencia que, de modo geral, as amostras encontram-se em conformidade com a legislação brasileira vigente, com exceção do parâmetro de álcoois superiores para CA-11.

A aparência e a cor são atributos sensoriais relevantes na avaliação da qualidade da cachaça, pois refletem diretamente as condições de processamento e a estabilidade físico-química do produto. Embora a Portaria MAPA nº 539/2022 não apresente um critério explícito para aparência e coloração, esses atributos estão implicitamente associados ao padrão de identidade da cachaça, especialmente no caso de bebidas não envelhecidas, que devem apresentar aspecto límpido e incolor. Nesse contexto, as amostras CSI15 e VH12 apresentaram transparência e ausência de partículas em suspensão, indicando adequado controle das etapas de destilação e repouso (descanso). Em contraste, a presença de partículas em suspensão observada na cachaça CA-11, ainda que sem alteração de cor, indica menor estabilidade da bebida final, possivelmente relacionada à precipitação de ácidos graxos, ésteres de cadeia longa ou complexos metálicos, conforme descrito na literatura (Róžański, Pielech-Przybylska e Balcerek, 2020).

O teor alcoólico das três bebidas situou-se entre 41,8 e 43,2% (v/v a 20 °C), atendendo plenamente à faixa legal de 38 a 48% (v/v). Da mesma forma, os valores de acidez volátil, aldeídos totais, ésteres totais, álcool metílico, furfural e hidroximetilfurfural, carbamato de etila e teor de cobre permaneceram abaixo dos limites máximos permitidos, indicando adequado controle das etapas de fermentação, destilação e contato com materiais metálicos. No entanto, a cachaça CA-11 apresentou o maior teor de álcoois superiores totais ($403,6 \pm 0,8$ mg/100 mL de etanol anidro), ultrapassando o limite máximo de 360 mg/100 mL estabelecido pela normativa, enquanto CSI15 e VH12 permaneceram em conformidade. Os álcoois superiores, também conhecidos como álcoois fúsel, são formados predominantemente durante a fermentação alcoólica a partir do metabolismo de aminoácidos pelas leveduras, especialmente *S. cerevisiae*, e, em concentrações elevadas, podem resultar em aroma excessivamente intenso e sensação gustativa mais áspera (Rodrigues Junior et al., 2025). Estudos clínicos e experimentais demonstram que bebidas alcoólicas com maior teor de congêneres, incluindo os álcoois superiores, estão associadas a sintomas de ressaca mais intensos quando comparadas a bebidas com baixo conteúdo desses compostos, mesmo quando a ingestão de etanol é equivalente (Rohsenow e Hoewland, 2010; Verster et al., 2018). Como consequência, há

intensificação de processos inflamatórios e de estresse oxidativo, associados aos sintomas clássicos da ressaca, incluindo náusea, fadiga e mal-estar geral (Van de Loo et al., 2020). Nesse contexto, o teor elevado de álcoois superiores observado na cachaça CA-11 pode representar não apenas um impacto negativo do ponto de vista regulatório e sensorial, mas também um potencial fator agravante dos efeitos fisiológicos associados ao consumo da bebida.

Considerando-se que as três cachaças foram produzidas a partir dos mesmos parâmetros operacionais, as diferenças observadas para a CA-11, tanto em relação à instabilidade visual quanto ao teor elevado de álcoois superiores, são atribuídas principalmente às características metabólicas da levedura utilizada como inóculo inicial. A literatura indica que diferentes cepas de leveduras apresentam comportamentos metabólicos distintos (Moura et al., 2020). Apesar do excesso de álcoois superiores, o coeficiente de congêneres da CA-11 (479,1 mg/100 mL) permaneceu dentro da faixa permitida pela legislação (200 - 650 mg/100 mL), indicando que, de forma global, a bebida mantém a identidade compatível com a cachaça, embora o teor elevado desse grupo de compostos represente um fator crítico do ponto de vista tecnológico e regulatório.

Durante a caracterização físico-química dos destilados, observou-se que a amostra de cachaça identificada como CA-11 apresentou concentração de álcoois superiores totais acima do limite máximo estabelecido pela legislação brasileira para cachaça. Em razão dessa não conformidade, a amostra foi excluída da etapa subsequente de avaliação sensorial. Dessa forma, a cachaça CA-11 não foi incluída na análise sensorial conduzida por meio de grupo focal, garantindo que apenas amostras em conformidade com os padrões legais fossem submetidas à avaliação dos participantes.

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos das cachaças produzidas em comparação com as referências (mínimos e máximos) estabelecidas pela Instrução Normativa MAPA nº 539/2022.

Parâmetros	Cachaça			Referência	
	CA – 11	CSI15	VH12	Mínimo	Máximo
Aparência e cor	PPS Transparente	APS Transparente	APS Transparente	-	-
Teor Alcoólico (% v/v a 20 °C)	43,2 ± 0,0	41,8 ± 0,0	42,0 ± 0,0	38,0	48,0
Acidez Volátil	57,9 ± 0,2	51,1 ± 0,1	86,7 ± 0,4	-	150
Ésteres totais*	8,4 ± 0,0	7,8 ± 0,6	9,6 ± 0,1	-	200
Aldeídos totais*	9,2 ± 0,0	11,9 ± 0,2	10,9 ± 0,2	-	30
Álcool metílico*	3,1 ± 0,0	4,2 ± 0,1	4,3 ± 0,0	-	20
Alcool sec-butílico*	0,9 ± 0,0	< LQ	< LQ	-	10
Alcool n-butílico*	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0	-	3
Álcool isobutílico*	73,9 ± 0,3	52,0 ± 1,5	47,7 ± 0,1	-	-
Álcool isoamílico*	281,1 ± 0,4	173,9 ± 2,4	180,3 ± 0,3	-	-
Álcool n-propílico*	48,6 ± 0,1	40,1 ± 1,0	48,4 ± 0,1	-	-
Álcoois Superiores Totais*	403,6 ± 0,8	266,0 ± 4,9	276,4 ± 0,5	-	360
Furfural e Hidroximetilfurfural*	< LQ	< LQ	< LQ	-	5
Coef. Congêneres*	479,1	336,8	383,6,9	200,0	650,0
Lactato de Etila*	1,8 ± 0,1	1,6 ± 0,0	1,0 ± 0,9	-	-
Carbamato de Etila (µg/L)	< LQ	< LQ	< LQ	-	210
Teor de Cobre (mg/L)	0,2	0,5	0,5	-	5

Legenda: LQ: Limite de Quantificação; APS: Ausência de partículas em suspensão; PPS: Presença de partículas em suspensão; *mg/100 mL de etanol: miligrama por 100 mililitros de álcool anidro (etanol). A portaria MAPA nº 539/2022 determina que os teores de acidez volátil (ácido acético), aldeído totais (acetaldeído), ésteres totais (acetato de etila), álcoois superiores totais e furfural devem ser somados para se obter o coeficiente de congêneres.

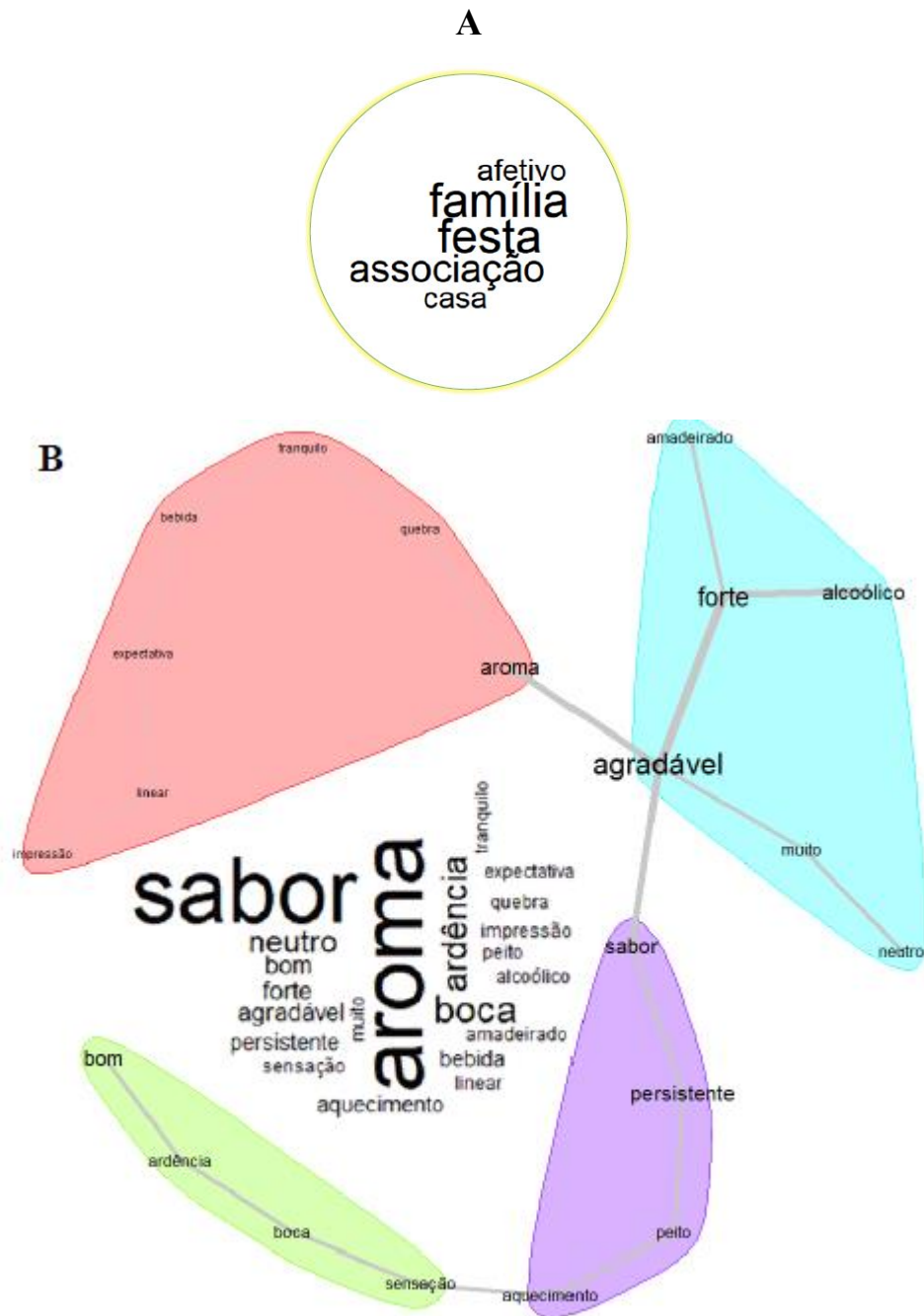
3.4. Análise de grupo focal

A etapa inicial do grupo focal evidenciou que a cachaça possui forte valor afetivo para os participantes, sendo associada a contextos de celebração, festas e a estabelecimentos familiares (Figura 6A). Esses resultados corroboram com estudos que apontam a cachaça não apenas como produto alcoólico, mas como um marcador identitário e cultural brasileiro, fortemente ligado à convivência, tradições regionais e memória afetiva (Almeida e Dias, 2018). No geral, todas as cachaças avaliadas foram mencionadas como agradáveis de serem consumidas, porém cada uma delas apresentaram particularidades que evidenciam pontos positivos e negativos em relação ao aroma, sabor e sensação na boca.

A cachaça CSI15 foi destaque em relação aos aromas, que foram definidos como agradáveis de álcool e com fortes notas amadeiradas, apesar da cachaça não ser envelhecida em barris de madeira (Figura 6B). Esse comportamento é consistente com a literatura, que demonstra que leveduras não-*Saccharomyces* são reconhecidas por sua elevada capacidade de produção de ésteres e compostos aromáticos de impacto positivo, tais como acetato de isoamila, fenóis leves e álcoois superiores em concentrações moderadas, contribuindo para aromas frutados, florais e adocicados (Jolly, Varela e Pretorius, 2014; Padilla, Gil e Manzanares, 2016). Esses achados dão *insights* em relação ao potencial tecnológico das leveduras não-*Saccharomyces* como ferramentas para a modulação e diferenciação sensorial de cachaças, sobretudo quando o objetivo é a valorização do aroma e a redução da agressividade alcoólica. Esses resultados preliminares sugerem que os atributos sensoriais auxiliaram na discriminação entre as amostras, refletindo diferenças no perfil de fermentação das cachaças. Ao ingerir, relatou-se predomínio de percepção de forte ardência na boca e reduzido aquecimento torácico, sugerindo-se uma maior concentração de compostos irritantes, como aldeídos, que são responsáveis pela sensação de pungência e queimação (Bortoletto, Correa e Alcarde, 2016; Cardoso, 2020). O sabor foi descrito como neutro com persistência, sendo frequentemente associado a um perfil fácil de beber (“bebida tranquila”). A “quebra de expectativa” e “impressão linear” sugerem desequilíbrio entre aroma, sabor e sensação tátil, atributos que são interessantes estarem em equilíbrio na construção da qualidade sensorial de destilados.

A cachaça VH12 apresentou um perfil sensorial caracterizado por forte aquecimento na garganta / peito (Figura 6C). Os ácidos orgânicos presentes na cachaça reduzem o pH da bebida e podem atuar como agentes irritantes da mucosa da garganta, intensificando a sensação de aquecimento e ardor. Esses compostos também potencializam o efeito do etanol, tornando a queimação mais intensa e persistente (Bortoletto, Correa e Alcarde, 2016). Aromaticamente e

no sabor, destacou-se pelas notas adocicadas, de caldo-de-cana. A coexistência de descritores como “bebida suave” e “bebida forte” indica elevada complexidade sensorial, com impacto tátil elevado. A cachaça VH12 também apresentou forte polarização de preferência, sendo indicada como “preferida”. Isso evidencia que seu perfil sensorial intenso pode ser atrativo para consumidores que buscam cachaças mais encorpadas e expressivas.



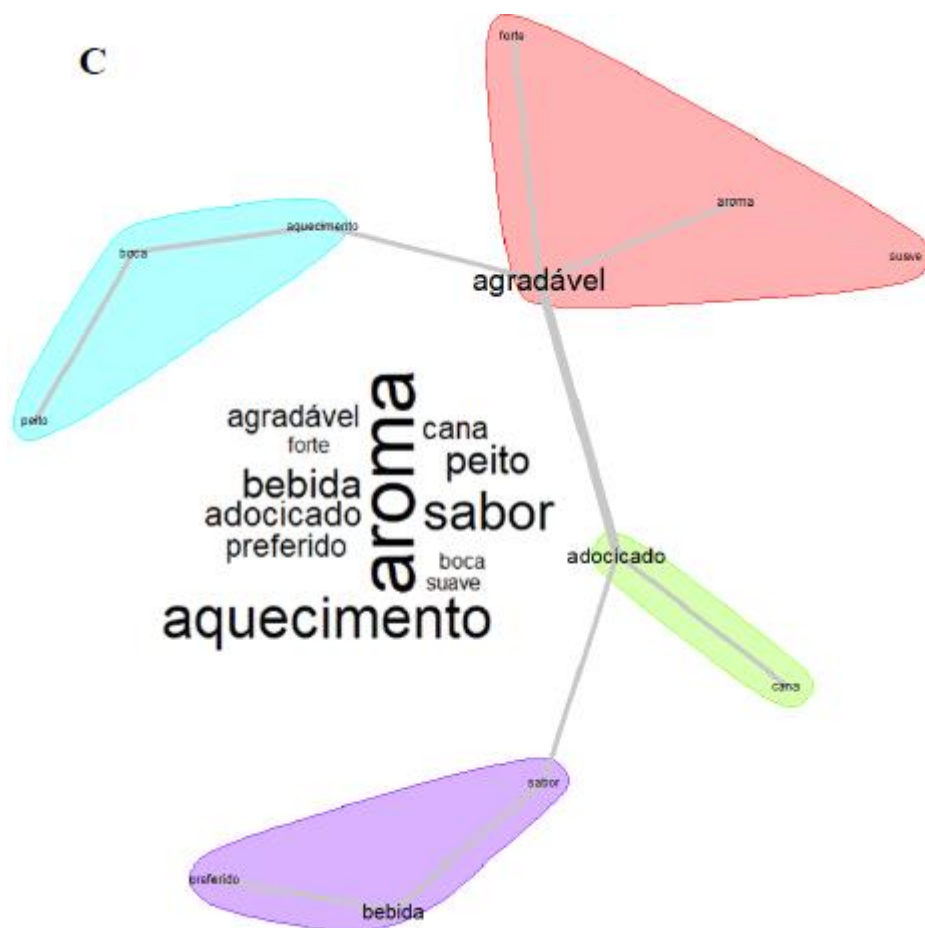


Figura 6. Gráficos de similitude e nuvem de palavras dos atributos sensoriais das cachaças. A) Nuvem de palavras do papel social da cachaça; B) Atributos sensoriais da cachaça CSI15; e C) Atributos sensoriais da cachaça VH12.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que as leveduras avaliadas apresentaram comportamentos fermentativos, tecnológicos e sensoriais distintos, influenciando diretamente no desempenho do processo e a qualidade final das cachaças produzidas. Em escala de bancada, observou-se que a dinâmica do pH, o consumo de açúcares, a produção de etanol, a densidade celular e a liberação de CO₂ variaram significativamente entre os isolados, evidenciando diferenças intrínsecas no vigor fermentativo e na adaptação metabólica ao mosto de caldo de cana. A levedura VH12 destacou-se por maior eficiência fermentativa inicial e potencial biotecnológico, enquanto a levedura CA-11 apresentou cinética mais lenta, menor densidade celular e menor produção de etanol em 24 horas. Em escala piloto, as diferenças observadas no comportamento de propagação, floculação, liberação de CO₂ e decantação celular reforçaram a influência da levedura na condução do processo fermentativo. A análise físico-química das

cachaças evidenciou conformidade geral com a Instrução Normativa MAPA nº 539/2022, com exceção do teor de álcoois superiores da cachaça CA-11, que ultrapassou o limite estabelecido, além de apresentar menor estabilidade visual em decorrência de partículas em suspensão. Ainda assim, o coeficiente de congêneres permaneceu dentro da faixa legal. A avaliação sensorial por grupo focal permitiu discriminar os perfis das bebidas, indicando que as diferenças químicas e fermentativas se refletiram nos atributos sensoriais, sobretudo em aroma, sabor e sensação na boca. A cachaça CSI15 apresentou perfil aromático diferenciado, com potencial de aplicação tecnológica. De forma geral, os resultados evidenciam que a seleção criteriosa de leveduras é um fator determinante para a modulação do desempenho fermentativo, da composição química e do perfil sensorial da cachaça, reforçando o potencial do uso de cepas alternativas, incluindo leveduras não-*Saccharomyces*, como estratégia para a diversificação e inovação no setor produtivo da cachaça.

REFERÊNCIAS

- ALCARDE, A.R.; MONTEIRO, B.M.S.; BELLUCO, A.E.S. Composição química de aguardentes de cana-de-açúcar fermentadas por diferentes cepas de levedura. **Química Nova**, v. 35, n. 8, 2012.
- ALMEIDA, J.; DIAS, L. **Os Segredos da Cachaça**. Ed. Alaúde, São Paulo, SP, 2018.
- AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; DE CASTO, J.V.O. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 91, p. 1267 - 1275, 2011. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3437-6>
- BASSO, L.C.; BASSO, T.O.; ROCHA, S.N. Ethanol production in Brazil: The industrial process and its impact on yeast fermentation. In book: **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**, 2011.
- BORTOLETTO, A.M.; CORREA, A.C.; ALCARDE, A.R. Aging practices influence chemical and sensory quality of cachaça. **Food Research International**, v. 86, p. 46-53, 2016.
- BRASIL. **Instrução Normativa n. 539, de 26 de dezembro de 2022**. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana para Cachaça. Publicado no Diário Oficial da União de 26/12/2022, Seção 1, Página 3. Disponível em www.agricultura.gov.br.
- BREXÓ, R.P.; BRANDÃO, L.R.; CHAVES, R.D. et al. Yeasts from indigenous culture for cachaça production and brewer's spent grain: Biodiversity and phenotypic characterization for biotechnological purposes. **Food and Bioproducts Processing**. v. 124, p. 107-120, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.08.006>
- CARDOSO, M.D.G. **Produção de aguardente de cana**. 4 ed., rev. e ampl. Lavras: UFLA, 2020.
- CIANI, M.; CANONICO, L.; COMITINI, F. Improving white wine aroma and structure by non-*Saccharomyces* yeasts. In: **White wine technology**. Academic Press, p. 117-130, 2022. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823497-6.00020-X>.
- COSTA, A.A.S.X.; BARROS, V.A.M.; NORONHA, R.L.F. et al. Como você se sente ao tomar este café? Um estudo sobre percepções, emoções e linguagem. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 41, 2024. doi: [10.35977/0104-1096.cct2024.v41.27350](https://doi.org/10.35977/0104-1096.cct2024.v41.27350)
- DE-BARROS, M.C.; RIBEIRO-FILHO, N. Genotype-dependent variation in buffering capacity and pH stability of sugarcane juice during fermentation. **Society of Chemical Industry (SCI)**, 2025. doi: <https://doi.org/10.1002/bbb.70067>
- DE, S.; STADMAYR, G.; REBNEGGER, C. et al. *Flo5-1* and *Nrg1* are involved in reversible pH-dependent flocculation in *Komagataella phaffii*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 109, p. 178, 2025. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-025-13562-7>

DIVATE, N.R.; CHEN, G.H.; DIVATE, R.D. et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improvement in stresses tolerance. **Bioengineered.**, v. 8, n.5, p. 524-535, 2017. doi: 10.1080/21655979.2016.1257449.

FARIAS, F.C.; ALCARDE, A.R.; FILHO, J.H.D.O. Spontaneous fermentation and selected yeast fermentation for the production of cachaça by cell-recycle batch process. **B. CEPPA**, v. 36, n. 1, 2020.

FELIX, E.; OGBEBOR, C.; VINCENT, A. A kinetic study of the fermentation of cane sugar using *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Physical Chemistry**, v. 4, n.1, p.26 - 31, 2014. doi: 10.4236/ojpc.2014.41005

GINON, E.; ARES, G.; ISSANCHOU, S. et al. Identifying motives underlying wine purchase decisions: Results from an exploratory free listing task with Burgundy wine consumers. **Food Research International**, v. 62, p. 860-867, 2014. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.052>

GONÇALVES, C.M.; CARVALHO, S.; NETO, A.G. et al. Produção e análise química de cachaça de alambique a partir de cepa selecionada de *Saccharomyces cerevisiae*. **B. CEPPA**, v. 37, n. 2, 2019.

IBRAC. Instituto Brasileiro da Cachaça. O que é a cachaça?. São Paulo: IBRAC, 2024.

JOLLY, N.P.; VARELA, C.; PRETORIUS, I.S. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. **FEMS Yeast Res.**, v. 14, n. 2, p. 37-215, 2014. doi: 10.1111/1567-1364.12111.

LADINO-GARZON, W.L.; BARRIOS-RODRÍGUEZ, Y.F.; AMOROCHO-CRUZ, C.M. Inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* with sugar cane juice as a starter culture in coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Rev. bras. eng. agríc. ambient.**, v. 28, n.1, 2024. doi: <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v28n1e272094>

LUTZ, I.A. **Métodos físicos químicos para comparação de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 4ª ed. (1ª Edição digital), 2008. Disponível em:< <https://wp.ufpel.edu.br/nutricaoobromatologia/files/2013/07/NormasADOLFOLUTZ.pdf>>. Acesso em fev. 2023.

MAICAS, S. The role of yeasts in fermentation processes. **Microorganisms**, v. 8, p. 11-42, 2020. doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>

MINIM, V.P.R. **Análise sensorial: estudos com consumidores**. 4. ed. Viçosa: UFV, 2018.

MONTEIRO, B.; FERRAZ, P.; BARROCA, M. et al. Conditions promoting effective very high gravity sugarcane juice fermentation. **Biotechnol Biofuels**, v. 11, p. 251, 2018. doi: <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1239-0>

MOURA, J.A.A.; BELISÁRIO, C.M.; VIANA, L.F. et al. Qualidade de cachaças artesanais produzidas com leveduras de diferentes origens. **Scientia Plena**, v.16, n.3, 2020. doi: <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2020.031501>

MULLER, G.; DE GODOY, V.R.; DÁRIO, M.G. et al. Improved sugarcane-based fermentation processes by an industrial fuel-ethanol yeast strain. **J. Fungi**, v. 9, p. 803, 2023. doi: <https://doi.org/10.3390/jof9080803>

NOVA, M.X.V.; SCHULER, A.R.P.; BRASILEIRO, B.T.R.V. et al. Yeast species involved in artisanal cachaça fermentation in three stills with different technological levels in Pernambuco, Brazil. **Food Microbiology**, v. 26, n. 5, p. 460-466, 2009. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.02.005>

ORIEZ, V.; BEYERLE, M.; PONTALIER, P.Y. et al. Sugarcane bagasse mild alkaline fractionation and production of purified fractions by pulse chromatography with water. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 370 - 378, 2018.

PADILLA, B.; GIL, J. V.; MANZANARES, P. Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: from spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 411, 2016.

PARAPOULI, M.; VASILEIADIS, A.; AFENDRA, A.S. et al. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. **AIMS Microbiol.**, v. 11, n. 6, p. 1-31, 2020. doi: [10.3934/microbiol.2020001](https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001).

PEREIRA, A.A.M.; ACEVEDO, M.S.F.; ALCARDE, A.R. Improvement of the chemical quality of Cachaça. **Beverages**, v. 10, 2024. doi: <https://doi.org/10.3390/beverages10030079>

PIRRONE, A.; JACUZZI, N.; MONTE, M. et al. Bio-agronomic assessment and quality evaluation of sugarcane with optimized juice fermentation in view of producing Sicilian “Rum Agricole”. **Appl. Sci.**, v. 15, p. 76-96, 2025. doi: <https://doi.org/10.3390/app15147696>

PRATI, P.; CAMARGO, G.A. Características do caldo de cana e sua influência na estabilidade da bebida. **BioEng**, v. 2, n.1, p. 37 - 44, 2008.

RATKOVICH, N.; ESSER, C.; MACHADO, A.M.R, et al. The spirit of cachaça production: An umbrella review of processes, flavour, contaminants and quality improvement. **Foods**, v. 12, p. 25-33, 2023. doi: <https://doi.org/10.3390/foods12173325>

REIS, V.R.; BASSI, A.P.; CERRI, B. et al. Effects of feedstock and co-culture of *Lactobacillus fermentum* and wild *Saccharomyces cerevisiae* strain during fuel ethanol fermentation by the industrial yeast strain PE-2. **AMB Expr.**, v. 8, p. 23, 2018. doi: <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0556-9>

RIBEIRO, M.L.D. **Qualidade da cachaça em função do tratamento do caldo e tipo de fermento.** (Dissertação de mestrado) Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2016.

RODRIGUES JÚNIOR, L.A.R.; LIMA, L.S.; LAGO, M.A.P. et al. Avaliação físico-química e conformidade regulatória de cachaças e tiquiras artesanais do Maranhão, Brasil. **Observatório de la economía latinoamericana**, v. 23, n.5, p. 64-100, 2025. doi: <https://doi.org/10.55905/oelv23n5-160>

ROHSENOW, D.J.; HOWLAND, J. The role of beverage congeners in hangover and other residual effects of alcohol intoxication: a review. **Curr Drug Abuse Rev.**, v. 3, n. 2, p. 9-76, 2010. doi: 10.2174/1874473711003020076.

ROSSOUW, D.; BAGHRI, B.; SETATI, M.E. et al. Co-flocculation of yeast species, a new mechanism to govern population dynamics in microbial ecosystems. **PLoS One.** v. 10, n. 8, p. 136-249, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0136249.

RÓZANSKI, M.; PIELECH-PRZYBYLSKA, K.; BALCEREK, M. Influence of alcohol content and storage conditions on the physicochemical stability of spirit drinks. **Foods**, v.9, p.12-64, 2020. doi:<https://doi.org/10.3390/foods9091264>

SALVO, L.P.; GARCÍA, J.E.; PUENTE, M.L. et al. The drop plate method as an alternative for *Azospirillum* spp viable cell enumeration within the consensus protocol of the REDCAI network. **Rev. argent. microbiol.**, v. 54, n. 2, p. 61 - 70, 2022.

SILVEIRA, A.L.; MACHADO, A.M.R.; GOMES, F.C.O. et al. Profile of volatile organic compounds in musts and distilled spirits. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, 2021. doi: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i4.14009>

SOARES, T.L.; SILVA, D.D.; SCHWAN, R. Acompanhamento do processo de fermentação para produção de cachaça utilizando diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Sci. Technol.**, v. 31, n.1, 2011.

STEWART, G.G. Yeast Flocculation - Sedimentation and flotation. **Fermentation**, v.4, p. 2 - 8, 2018. doi:<https://doi.org/10.3390/fermentation4020028>

SUMAN, P.A.; URBANO, L.H.; LEONEL, M. et al. Efeitos de parâmetros de fermentação na produção de etanol a partir de resíduo líquido da industrialização da mandioca (manipueira). **Acta Scientiarum Technology**, v. 33, n. 4, p. 379-384, 2011. doi:10.4025/actascitechnol.v33i4.9279

VAN DE LOO, A.J.A.E.; MACKUS, M.; KWON, O. et al. The inflammatory response to alcohol consumption and its role in the pathology of alcohol hangover. **J Clin Med.**, v. 2, n. 7, p. 20-81, 2020. doi: 10.3390/jcm9072081.

VARELA, C. The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 100, n. 23, p. 9861-9874, 2016. doi: 10.1007/s00253-016-7941-6.

VERSTER, J.C.; VAN, M.S.L.; MACKUS, M. et al. Differences in the temporal typology of alcohol hangover. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 42, n. 4, p. 691-697, 2018. doi:10.1111/acer.13610.

WESTMAN, J.O.; MAPELLI, V.; TAHERZADEH, M.J. et al. Flocculation causes inhibitor tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* for second-generation bioethanol production. **Appl Environ Microbiol.**, v. 80, n. 22, p. 18-6908, 2014. doi: 10.1128/AEM.01906-14.

APÊNDICE A – QUADRO DE PONTUAÇÃO DOS ISOLADOS EM RELAÇÃO A PERFORMANCE DE LNF CA-11 FRENTE A DIFERENTES ESTRESSES FERMENTATIVOS

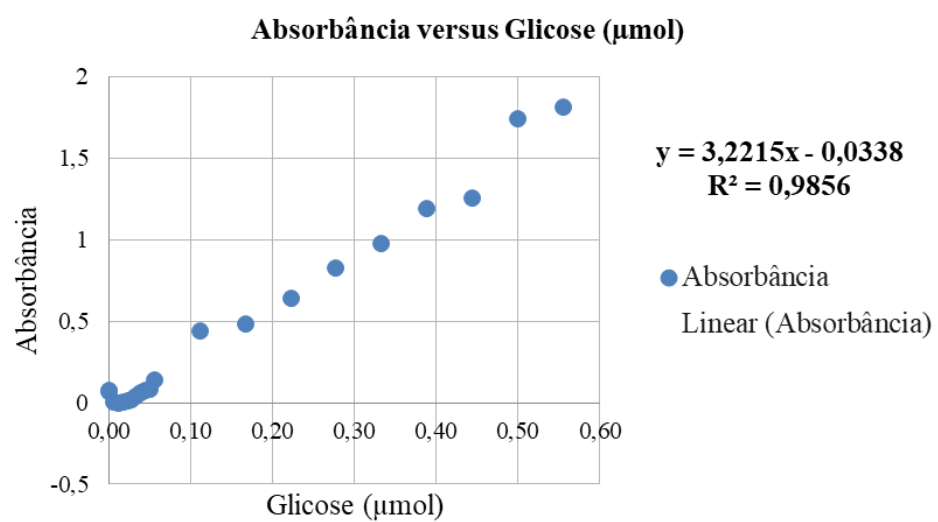
Amostra	Açúcares (%)												Temperatura (°C)		pH			Etanol (%)				Resultado (%)	Propriedade
	Sacarose			Glicose				Frutose															
	15	20	25	15	20	25	30	15	20	25	30	18	37	2,8	3,2	4,2	8	10	12	15			
CA-11	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-	100*	Controle	
CSL11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	20	SL - P1	
CSL12	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	75		
CSL15	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	90		
CSL19	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	60		
VSL5	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	90		
VSL6	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	90		
VSL8	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	90		
VSL9.1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	95		
VSL9.2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	90		
VSL11	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	100		
VSL12	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	>100		
VSL14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	>100		
VSL15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	>100		
VSL16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	>100		
VSL19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	>100		
VSB6.1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100		
VSB6.2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	90		
VSB7.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	25		
VSB7.2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	90		

VSB13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	95	SB - P2	
VSB14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100		
VSB19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1		95		
VSB20	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	80		
VSB21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1		90		
VSN10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1		>100	SN - P3	
VSN12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1		>100		
VSN14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1		>100		
VSN16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1		90		
VSN17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	95		
CSI5	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	75	SI - P4	
CSI6	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	70		
CSI15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1		90		
VSI5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1		>100		
VSI6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		100		
VSI7	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	95		
VSI8	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	100		
VSI14	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	95		
VSI15	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	95		
VSI17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5	1	1		>100		
VSI18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100		
VSI19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100		
VSI20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100		
CH12	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	35		
VH1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100		
VH2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100		
VH3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100		

VH5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100	H - P5
VH6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	95		
VH7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100		
VH8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100		
VH9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100		
VH10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	>100		
VH11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	>100		
VH12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	>100		
VH13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	>100		
VH14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	90		
VH15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	>100		
VH16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	95		
VH17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	>100		
VH18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	>100		
VH20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	>100		

*São 20 diferentes tratamentos, considerando os ensaios de estresse osmótico, temperatura, pH e etanol, desta forma, considerou-se a pontuação de 20 pontos para a levedura CA-11 (referência) = 100%.

APÊNDICE B – CURVA-PADRÃO DE GLICOSE PARA ANÁLISE DOS RESULTADOS DE ATIVIDADE INVERTÁSICA RELATIVA EXTRACELULAR



APÊNDICE C – RESULTADOS GERAIS DA ATIVIDADE INVERTÁSICA RELATIVA EXTRACELULAR DOS ISOLADOS AVALIADOS

Propriedades	Isolados	Média ± Desvio-Padrão (U)	
Controle	CA-11	0,0017 ± 0,0001 *	
	CSL 15	0,0028 ± 0,0006	
SL - P1	VSL5	0,0075 ± 0,0013 a	
	VSL6	0,0045 ± 0,0010	
	VSL8	0,0019 ± 0,0002 *	
	VSL9.1	0,0025 ± 0,0004	
	VSL9.2	0,0025 ± 0,0005	
	VSL11	0,0037 ± 0,0011	
	VSL12	0,0076 ± 0,0019 a	
	VSL14	0,0028 ± 0,0002	
	VSL15	0,0025 ± 0,0002	
	VSL16	0,0023 ± 0,0008 *	
	VSL19	0,0038 ± 0,0021 *	
	SB - P2	VS6	0,0035 ± 0,0009
		VS6.2	0,0020 ± 0,0002 *
VS7.2		0,0022 ± 0,0001	
VS13		0,0024 ± 0,0009 *	
VS14		0,0028 ± 0,0014 *	
VS19		0,0012 ± 0,0009 *	
VS20		0,0013 ± 0,0007 *	
VS21		0,0033 ± 0,0010	
SN - P3	VSN10	0,0034 ± 0,0003	
	VSN12 a	0,0061 ± 0,0016	
	VSN14	0,0048 ± 0,0008	
	VSN16	0,0020 ± 0,0010 *	
	VSN17	0,0031 ± 0,0003	
	CSI15	0,0063 ± 0,0007 a	
	VSI5	0,0073 ± 0,0020 a	
	VSI6	0,0071 ± 0,0012 a	
	VSI7	0,0050 ± 0,0009	

SI - P4	VSI8	0,0084 ± 0,0014 a
	VSI14	0,0120 ± 0,0044 a
	VSI15	0,0075 ± 0,0003 a
	VSI17	0,0078 ± 0,0022 a
	VSI18	0,0093 ± 0,0026 a
	VSI19	0,0107 ± 0,0018 a
	VSI20	0,0082 ± 0,0003 a
<hr/>		
H - P5	VH1	0,0021 ± 0,0007 *
	VH2	0,0028 ± 0,0007
	VH3	0,0027 ± 0,0016 *
	VH5	0,0035 ± 0,0008
	VH6	0,0044 ± 0,0004
	VH7	0,0023 ± 0,0004 *
	VH8	0,0042 ± 0,0003
	VH9	0,0046 ± 0,0008
	VH10	0,0013 ± 0,0002 *
	VH11	0,0062 ± 0,0008 a
	VH12	0,0043 ± 0,0011
	VH13	0,0026 ± 0,0013 *
	VH14	0,0021 ± 0,0004 *
	VH15	0,0014 ± 0,0007 *
	VH16	0,0026 ± 0,0007
	VH17	0,0024 ± 0,0009 *
	VH18	0,0031 ± 0,0010
	VH20	0,0026 ± 0,0014 *

Legenda: Medida de atividade invertásica (U) expressa em μmol de açúcar redutor/minuto. “*” Correspondem a resultados que não diferiram estatisticamente do controle (LNF CA-11) e “a” Maiores valores de atividade invertásica que não diferem entre si (nível de significância de 5% pelo teste *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney*)

APÊNDICE D – ROTEIRO UTILIZADO PARA CONDUÇÃO DO GRUPO FOCAL DE CACHAÇA

Regras Gerais
<ol style="list-style-type: none"> 1. Falar um de cada vez; 2. Opiniões divergentes são bem-vindas; 3. Nada é técnico demais ou simples demais; 4. Foco no que cada um percebe;
Introdução ao tema
<ol style="list-style-type: none"> 1. “Quando vocês pensam em uma cachaça que marcou a vida de vocês (boa ou ruim), que cena, cheiro ou história vem à mente?”; 2. “Se esta mesa fosse uma viagem pelo universo da cachaça, qual seria o papel de vocês nela? Exploradores? Críticos? Curiosos?”;
Explicação da dinâmica
<ol style="list-style-type: none"> 1. Cada amostra será avaliada uma de cada vez; 2. Os participantes podem cheirar, olhar, provar e conversar entre si; 3. A moderação fará perguntas criativas, não técnicas;
Avaliação das amostras (Estruturada para cada amostra)
<ul style="list-style-type: none"> ● Primeiro contato – Impressões iniciais: <ol style="list-style-type: none"> 1. “Ao levantar o copo pela primeira vez, o que chamou sua atenção? Nada muito técnico - apenas o que veio à cabeça.”; 2. “Se esta cachaça fosse um personagem, como ela chegaria na festa? Discreta, exuberante, intensa, misteriosa?”; 3. “Qual foi a primeira palavra, cor ou imagem que surgiu quando você sentiu o aroma?”. ● Exploração do aroma (sem mencionar ‘aroma’ diretamente): <ol style="list-style-type: none"> 1. “Fechem os olhos por um momento - que lugares ou memórias aparecem quando vocês aproximam o copo do nariz?”; 2. “Conte em uma frase o que veio à sua mente quando você aproximou o copo do nariz e que elementos da bebida fizeram você lembrar disso.”; 3. “Se tivéssemos que organizar esta cachaça em uma prateleira de sensações, qual seria a seção? Frutas? Químico? Campo? Algo industrial? Outra?”; 4. “O que vocês percebem que muda entre a primeira e a segunda inspiração?”; 5. “O que na segunda inspiração fez você perceber algo diferente?”. ● Exploração do sabor: <ol style="list-style-type: none"> 1. “Depois do gole, o que aconteceu primeiro na boca? O que apareceu em seguida?”; 2. “O que na bebida provocou essa mudança?”; 3. “Imaginem que a cachaça está contando uma história. O início é como? E o meio? E o fim?”;

4. “O que te leva a perceber esse ‘meio’ ou esse ‘fim’ dessa forma?”;
 5. “Que elementos vocês percebem que continuam na boca mesmo após alguns segundos?”.
- **Sensação bucal / corpo:**
 1. “Descreva, em uma frase completa, como essa bebida se comporta na boca e com que tipo de sensação você a compararia?”;
 2. “Ela passeia devagar, permanece, corre rápido, é afiada, macia, cremosa... como vocês descreveriam?”;
 3. “Quais elementos da sensação contribuíram para essa percepção?”;
 4. “Se a textura dela fosse um material (seda, lixa, algodão, água, óleo...), qual seria?”
 5. “Quais percepções te levaram a essa descrição?”.
 - **Algum ponto destoante (defeitos sem induzir):**
 1. “Há algo que chamou a atenção de vocês de forma inesperada ou destoante?”;
 2. “Se pudessemos ajustar um único aspecto desta bebida, qual seria? E por quê?”;
 3. “O que na bebida fez você ter essa impressão?”.
 - **Encerrando cada amostra:**
 1. “Se essa amostra tivesse uma personalidade, como vocês a descreveriam em uma frase?”

Comparação entre as amostras

1. “Se vocês tivessem que montar um ranking emocional - não técnico - qual delas ficaria em primeiro lugar e qual em último? E o que motivou isso?”;
2. “Qual das cachaças se comporta como ‘a mais fácil de beber’? E qual é a mais desafiadora? Por quê?”;
3. “Qual cachaça vocês acham que agradaria mais o público geral? E qual é mais ‘para iniciados’?”;
4. “Qual delas tem a personalidade mais marcante? E qual é mais tímida?”;

Conclusão

1. “Se vocês fossem recomendar uma dessas cachaças a um amigo, como contariam a experiência para ele?”;
2. “Com base em tudo que conversamos, como vocês definiriam a identidade dessa linha de cachaças?”;
3. “Que tipo de consumidor vocês imaginam que mais apreciaria cada uma delas?”.

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr.(a) está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa “Produção de cachaça de alambique de qualidade no semiárido de Minas Gerais”, realizada sob responsabilidade do professor José Guilherme Prado Martin. Nesta pesquisa pretendemos avaliar a qualidade de 2 amostras de cachaça produzidas a partir de leveduras isoladas no semiárido de Minas Gerais. Esta análise sensorial permitirá identificar as principais características sensoriais e a aceitação global de cada cachaça produzida através da fermentação com essas leveduras. A pesquisa contribuirá para a caracterização de novas cachaças, contribuindo para o desenvolvimento do setor de bebidas mineiro.

Para esta pesquisa adotaremos o seguinte procedimento: os participantes provarão 5 mL de cada amostra de cachaça (previamente testadas quanto à presença de componentes tóxicos a partir de análise cromatográfica por HPLC e CG-MS) e será realizada uma análise denominada Grupo Focal, na qual os participantes deverão provar as amostras e através de uma conversa entre os participantes, indicar aspectos que caracterizam as amostras, levando-se em consideração a percepção sensorial das amostras provadas. Haverá gravações e sua participação será de apenas 1 dia. O tempo total para realização do teste é estimado em 60 minutos. Os riscos envolvidos na pesquisa estão relacionados principalmente à participantes que apresentem qualquer indício e/ou histórico de dependência alcoólica ou intolerância ao álcool. Dessa forma, caso o Sr.(a) voluntário apresente algum nível de intolerância ou alergia aos componentes do produto, solicitamos que não participe desta pesquisa, para evitar quaisquer riscos e transtornos à sua saúde. Indivíduos propensos à dependência ao álcool não devem participar do estudo. Em caso de necessidade, os pesquisadores se comprometem a prestar assistência médica por eventuais problemas decorrentes do consumo das amostras de cachaça.

Para participar deste estudo o Sr.(a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. No entanto, a participação se dá de forma voluntária, sendo que os pesquisadores não se responsabilizam por eventuais gastos do participante, como deslocamento e alimentação. Apesar disso, diante de eventuais danos, identificados e comprovados, decorrentes da pesquisa, o Sr.(a) tem assegurado o direito à indenização. O Sr.(a) tem garantida plena liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem necessidade de comunicado prévio.

A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr.(a) é atendido(a) pelo pesquisador. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. O(A) Sr.(a) não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar. Seu nome ou o material que indique sua participação não serão liberados sem a sua permissão.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no Laboratório de Microbiologia de Produtos Fermentados (FERMICRO/UFV), localizado no Edifício Chotaro Shimoya (ECS/UFV), sala 326, e a outra será fornecida ao Sr.(a). Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por período permanente após o término da pesquisa. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo e

confidencialidade, atendendo à legislação brasileira, em especial, à Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, e utilizarão as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____, contato _____, fui informado(a) dos objetivos da pesquisa “Produção de cachaça de alambique de qualidade no semiárido de Minas Gerais” de maneira clara e detalhada, e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer minhas dúvidas.

Nome do Pesquisador Responsável: José Guilherme Prado Martin

Endereço: Edifício Chotaro Shimoya, 326, Universidade Federal de Viçosa, Av. PH Rolfs, s/n Campus Universitário, Viçosa/MG.

Telefone: (31) 3612-5070

Email: guilherme.martin@ufv.br

Em caso de discordância ou irregularidades sob o aspecto ético desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP/UFV – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

Universidade Federal de Viçosa

Edifício Arthur Bernardes, piso inferior

Av. PH Rolfs, s/n – Campus Universitário

Cep: 36570-900 Viçosa/MG

Telefone: (31)3612-2316

Email: cep@ufv.br

www.cep.ufv.br

Viçosa, _____ de _____ de 2025.

Assinatura do Participante

Assinatura do Pesquisador

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

Os resultados desta tese demonstram que a levedura utilizada na fermentação exerce papel determinante na eficiência do processo, na composição química e no perfil sensorial da cachaça, configurando-se como um fator central para a qualidade e diferenciação da bebida. A abordagem integrada, envolvendo revisão da literatura, prospecção de leveduras autóctones e validação experimental em escala de bancada e piloto, permitiu uma compreensão abrangente dos impactos fisiológicos, metabólicos e tecnológicos associados à seleção de linhagens fermentativas.

A prospecção e caracterização das leveduras isoladas de unidades produtoras da região de Salinas (MG) confirmaram a predominância de *Saccharomyces cerevisiae*, ao mesmo tempo em que incluindo a identificação de uma levedura não-*Saccharomyces* do gênero *Meyerozyma*. Os ensaios de tolerância a estresses fermentativos, atividade invertásica e floculação possibilitaram a seleção de cepas adaptadas às condições típicas da produção de cachaça e com desempenho superior ao controle, indicando elevado potencial biotecnológico.

A validação em escala de bancada e piloto demonstrou que as leveduras apresentam comportamentos fermentativos e tecnológicos distintos, influenciando a cinética do processo, a composição físico-química e os atributos sensoriais das cachaças. As análises indicaram conformidade geral com a legislação vigente e evidenciaram diferenças sensoriais relevantes entre as bebidas, reforçando o impacto direto da levedura na qualidade final do produto.

Como perspectivas futuras, destaca-se a necessidade de ensaios voltados à avaliação da estabilidade genética e tecnológica das leveduras promissoras ao longo de sucessivos ciclos fermentativos, visando sua aplicação como culturas iniciadoras padronizadas e seu potencial de produção e comercialização. Adicionalmente, estudos envolvendo co-culturas entre leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* devem ser conduzidos para aprofundar o entendimento das interações microbianas e seu efeito sobre a cinética fermentativa e a complexidade sensorial da cachaça. De forma geral, esta tese evidencia que a seleção criteriosa de leveduras autóctones, associada à avaliação de sua estabilidade e ao uso estratégico de culturas mistas, constitui uma abordagem promissora para a melhoria do processo fermentativo, a diversificação sensorial e a valorização de cachaças regionais.

DEMAIS PUBLICAÇÕES

ARTIGOS

DA SILVA VALE, A.; **VENTURIM, B.C.**; DA SILVA ROCHA, A.R.F.; MARTIN, J.G. P.; MASKE, B.L.; BALLA, G.; DE DEA LINDNER, J.; SOCCOL, C.R.; DE MELO PEREIRA, G.V. Exploring microbial diversity of non-dairy fermented beverages with a focus on functional probiotic microorganisms. *fermentation-basel*, v. 9, p. 496, 2023.

LIMA, T.T.M.; HOSKEN, B.D.O.; **VENTURIM, B.C.**; LOPES, I.L.; MARTIN, J.G.P. Traditional brazilian fermented foods: cultural and technological aspects. *Journal of Ethnic Foods*, v. 9, p. 9-35, 2022.

ROCHA, A.R.F.D.S.; **VENTURIM, B.C.**; ELLWANGER, E.R.A.; PAGNAN, C.S.; SILVEIRA, W.B.D.; MARTIN, J.G.P. Bacterial cellulose: Strategies for its production in the context of bioeconomy. *Journal of Basic Microbiology*, v. 1, p. 1-19, 2022.

CAPÍTULOS DE LIVROS

COSTA JÚNIOR, P.S.P.; ROCHA, A.R.F.S.; **VENTURIM, B.C.**; HOSKEN, B.D.O.; MARTIN, J.G.P. Metagenome of the kombucha microbiome. *Kombucha*. 1ed.: Elsevier, 2025, v., p. 129-145.

ALVES, S.J.F.; **VENTURIM, B.C.**; NEUBANER, L.S.; GOMES, J.R.O.; RODRIGUES, G. B.; ALEXANDRE, M.A.S.; QUEIROZ, L.F.V.; MENDONÇA, D.A.; PIRES, E.B.E.; DE SANTANA, T.N.; MARTIN, J.G.P.; ELLER, M.R. Toxicity and stress evaluation of yeasts isolated from different ecosystems for the production of single-cell proteins. *Lecture Notes on Multidisciplinary Industrial Engineering*. 1ed.: Springer Nature Switzerland, 2025, p. 15-21.

VENTURIM, B.C.; SOARES, D.L.O.; COSTA JUNIOR, P.S.P.; SANTOS, P.T.M.; MARTIN, J.G.P. Diversity of brazilian amerindian fermented beverages. *Unconventional Functional Fermented Beverages*. 1ª ed. San Diego: Academic Press, 2024, v. 1, p. 63-79

MARTIN, J.G.P.; ROCHA, A.R.F.S.; **VENTURIM, B.C.**; RODRIGUEZ, A.D.D. Bebidas não alcoólicas fermentadas. *Microbiologia de Alimentos Fermentados*. 1ª ed. São Paulo: Blucher, 2022, v. 1, p. 1-75