

ÉRICA NASCIF RUFINO VIEIRA

**INFLUÊNCIA DO TIPO DE MOSTO E DO GÊNERO DE LEVEDURA NA  
FORMAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS E CARBAMATO DE ETILA EM  
DESTILADOS ALCOÓLICOS**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

V658i  
2011

Vieira, Érica Nascif Rufino, 1978-

Influência do tipo de mostos e do gênero de levedura na  
formação de amins bioativas e carbamato de etila em  
destilados alcoólicos / Érica Nascif Rufino Vieira. – Viçosa,  
MG, 2011.

xii, 153f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: José Antônio Marques Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Cachaça. 2. Carbamato de etila. 3. Fermentação.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.


CDD 22. ed. 663.502

ÉRICA NASCIF RUFINO VIEIRA

**INFLUÊNCIA DO TIPO DE MOSTO E DO GÊNERO DE LEVEDURA NA  
FORMAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS E CARBAMATO DE ETILA EM  
DESTILADOS ALCOÓLICOS**

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

**APROVADA: 10 de janeiro de 2011**



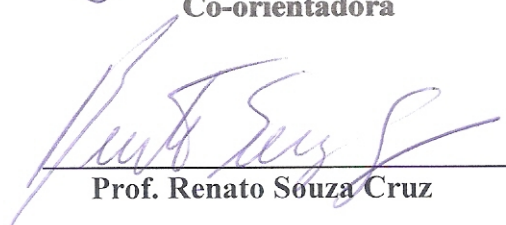
---

**Prof. Regina Célia Santos Mendonça**  
Co-orientadora



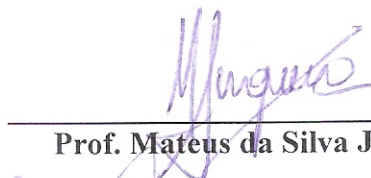
---

**Prof. Eduardo Basílio de Oliveira**



---

**Prof. Renato Souza Cruz**



---

**Prof. Mateus da Silva Junqueira**



---

**Prof. José Antônio Marques Pereira**  
(Orientador)

*Inúmeras vezes abdicaram dos seus sonhos, para que eu realizasse os meus.....  
Aos meus pais, Amélia e Rufino, pela incansável dedicação, imenso amor, exemplo e  
incentivo.*

*DEDICO.*

## **AGRADECIMENTOS**

AGRADEÇO.....

A Deus pela presença constante e pela força para superar os momentos difíceis.

À minha mãe, pelo seu amor incondicional, determinação, carinho, apoio e por todos os momentos ao meu lado.

Ao meu pai, exemplo profissional, pelo seu amor incondicional, conselhos e por se fazer sempre presente.

As minhas filhas, Maria Clara e Isadora, meus maiores tesouros, luzes da minha vida, por serem capazes de me fazer esquecer as dificuldades com um simples sorriso.

Ao André, meu grande amor, por ser presente na minha ausência e pelo apoio constante.

Aos meus irmãos, Raphael e Walisson, anjos de luz, amigos eternos, pelo apoio constante e as minhas cunhadas Mariana e Iva pela amizade e carinho.

A Professora Regina Célia Santos Mendonça, minha SEMPRE orientadora, pelo IMENSO auxílio, confiança, exemplo e amizade. Minha eterna Gratidão!

A Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela realização deste trabalho.

Ao professor José Antônio Marques Pereira pela orientação e confiança.

Aos meus conselheiros Prof. Eduardo Basílio, Prof. Renato Souza Cruz e Prof. Mateus da Silva Junqueira pela valiosa contribuição.

A Professora Maria Beatriz de Abreu Glória pela imensa colaboração, sugestões e por permitir que este trabalho alcançasse dimensões ainda maiores.

Aos funcionários do DTA, pelo auxílio e boa convivência ao longo de anos: Wandick, Zé Geraldo, Sr. Zé, Simeão, Pereca, Dimas, Fernando, Sr. Manoel, Juarez e Geralda. À Vaninha, minha amiga e conselheira, pelos milhares de informações fornecidas, pelos momentos de descontração, carinho, apoio e amizade.

Aos colegas de laboratório que foram essenciais na maratona de coleta de dados e análises: Juninho, Rogério, Juan, Rônison, Joesse, Janaina, Marcinha, Humberto e Arthur. E aos demais que tornaram os dias de trabalho mais prazerosos.

À Camila, minha amiga e companheira de todas as horas, pelo ombro amigo e amizade especial. À minha prima-irmã Victória que é a prova de que nem a distância enfraquece uma grande amizade, pela amizade, carinho e confiança e ao meu primo-irmão Ângelo sempre presente, pelo carinho, amizade e dedicação.

A todos os amigos e familiares que dividiram comigo momentos de dificuldade e angústia, agora dividam comigo a alegria desta conquista.

**MUITO OBRIGADA!**

## **BIOGRAFIA**

ÉRICA NASCIF RUFINO VIEIRA, filha de Amélia Maria Nascif Rufino e José Luis dos Santos Rufino, nasceu em Brasília, Distrito Federal, em 11 de Junho de 1978.

Engenheira de Alimentos formada pela Universidade Federal de Viçosa em maio de 2002.

Concluiu o mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa em maio de 2004.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>3</b>
<b>PARTE 1- LEVEDURAS E FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA PARA</b>	
<b>PRODUÇÃO DE CACHAÇA</b>	<b>3</b>
<b>1- LEVEDURAS</b>	
1.1-Definição e classificação	3
1.2- Composição química da célula de levedura	3
1.3- Efeito da temperatura em células de levedura	11
1.4- Efeito do pH em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
1.5-Metabolismo e funções dos carboidratos de reserva em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
1.5.1- Glicogênio	15
1.5.2- Trealose	15
<b>2- FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA</b>	<b>15</b>
2.1- Produtos Secundários da Fermentação	17
2.2- Fatores que afetam a fermentação	21
2.2.1- Agentes da Fermentação	29
2.2.2- Exigências nutricionais	29
2.2.3- Temperatura	31
2.2.4- pH	39
2.2.5 - Inibidores de Fermentação	39
2.2.6- Concentração de açúcares	40
2.2.7- Composição e concentração do inóculo	42
2.2.8 - Contaminação bacteriana	43
2.2.9 - Contaminação por leveduras	44

3- IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	49
4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
<b>PARTE 2 – CACHAÇA DE ALAMBIQUE, AMINAS BIOATIVAS E CARBAMATO DE ETILA</b>	<b>75</b>
1- CACHAÇA DE ALAMBIQUE	75
1.1- Fatores que Interferem na Qualidade da Cachaça	77
2- AMINAS BIOATIVAS	78
2.1- Aminas bioativas em bebidas alcoólicas	84
3- CARBAMATO DE ETILA	85
3.1- Formação do carbamato de etila em bebidas alcoólicas	87
4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
<b><u>CAPÍTULO 1</u></b>	
<b>INFLUÊNCIA DE NITROGÊNIO E MINERAIS EM DIFERENTES MOSTOS SOBRE A PRESENÇA/FORMAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS NO DESTILADO E NO MOSTO FERMENTADO</b>	<b>102</b>
RESUMO	102
<b>1- INTRODUÇÃO</b>	<b>102</b>
<b>2- MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>104</b>
2.1- Preparo dos diferentes mostos e produção do destilado alcoólico	104
2.2- Análises realizadas no mosto	105
2.2.1- Análise de nitrogênio e compostos nitrogenados	105
2.2.2- Análise de minerais	105
2.2.3- Determinação do teor de sólidos solúveis totais	107
2.2.4- Determinação do valor de pH	107

2.3- Análises realizada nos destilados alcoólicos	107
2.3.1- Determinação do grau alcoólico	107
2.3.2- Determinação da acidez total	107
2.4- Determinação do teor de aminos bioativas	107
2.5- Delineamento Experimental e Análise Estatística	109
<b>3- RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>109</b>
3.1- Produção do destilado alcoólico	109
3.2- Análises realizadas no mosto	110
3.2.1- Análise de nitrogênio e compostos nitrogenados	110
3.2.2- Análise de minerais	112
3.2.3- Determinação do valor pH	114
3.3- Análises realizada nos destilados alcoólicos	115
3.3.1- Determinação do grau alcoólico	115
3.3.2- Determinação da acidez total	116
3.4- Determinação do teor de aminos bioativas	117
<b>4 - CONCLUSÕES</b>	<b>118</b>
<b>5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>120</b>

## CAPÍTULO 2

<b>PERFIL DE CARBAMATO DE ETILA DURANTE A PRODUÇÃO DE DESTILADO ALCOÓLICO A PARTIR DE DIFERENTES MOSTOS.</b>	<b>122</b>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

<b>RESUMO</b>	<b>122</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>123</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>124</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>126</b>
2.1. Preparo dos diferentes mostos e produção do destilado alcoólico	126
2.2. Análise de nitrogênio e compostos nitrogenados nos mostos	126
2.3. Análise de cobre nos mostos e nas frações do destilado	127
2.4. Determinação e Quantificação de Carbamato de Etila	128
2.5. Delineamento Experimental	129
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>130</b>
3.1. Produção do destilado alcoólico	130
3.2. Análise de nitrogênio e compostos nitrogenados nos mostos	130

3.3. Análise de cobre nos mostos	130
3.4. Determinação e Quantificação de carbamato de etila durante a fermentação	131
3.5. Determinação e Quantificação de carbamato de etila no destilado alcoólico	132
<b>4 - CONCLUSÕES</b>	<b>135</b>
<b>5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>137</b>

### **CAPÍTULO 3**

<b>AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS SELECIONADAS COM BAIXO POTENCIAL DE FORMAÇÃO DE CARBAMATO DE ETILA PARA USO NA PRODUÇÃO DE CACHAÇA</b>	<b>139</b>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

<b>RESUMO</b>	<b>139</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>140</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>141</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>143</b>
2.1. Seleção, conservação e preparo do inóculo	144
2.2. Identificação de Leveduras	144
2.3. Produção da cachaça	145
2.4. Quantificação do teor de carbamato de etila na cachaça	145
2.5. Delineamento Experimental	146
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>146</b>
3.1. Identificação de Leveduras	146
3.2. Quantificação do teor de carbamato de etila na cachaça	148
<b>4 - CONCLUSÕES</b>	<b>149</b>
<b>5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>150</b>
 <b>CONCLUSÃO GERAL</b>	 <b>152</b>

## LISTA DE TABELAS

		<b>Página</b>
Tabela 1	Proporções relativas dos elementos em leveduras comerciais.	12
Tabela 2	Constituintes inorgânicos das leveduras	35
Tabela 3	Padrões de Identidade e Qualidade para cachaça	78
Tabela 4	Parâmetros utilizados na análise de minerais por absorção atômica	106
Tabela 5	Médias dos teores de sólidos solúveis totais durante a fermentação de diferentes mostos	110
Tabela 6	Teores médios de nitrogênio nos mostos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana.	111
Tabela 7	Médias da concentração de minerais nos mostos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana e faixa ótima de crescimento para leveduras.	112
Tabela 8	Médias dos valores de pH nos mostos com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana, durante a fermentação.	114
Tabela 9	Médias do teor alcoólico dos destilados produzidos a partir da fermentação de diferentes mostos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana.	115
Tabela 10	Médias do valor de acidez das frações dos destilados alcoólicos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana.	116
Tabela 11	Teor de amins bioativas nos diferentes mostos, durante a fermentação.	118
Tabela 12	Teores médios de nitrogênio nos mostos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana.	130
Tabela 13	Médias da concentração de cobre nos mostos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana.	131
Tabela 14	Teor de CE nos diferentes mostos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana, durante a fermentação.	131
Tabela 15	Média do Teor de CE nas frações dos destilados obtidos da fermentação de diferentes mostos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana.	133
Tabela 16	Teores médios de carbamato de etila nos diferentes mostos ao final da fermentação, nos diferentes destilados e no vinhoto.	134
Tabela 17	Valores médios $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ do teor de carbamato de etila e cobre nos destilados alcoólicos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana.	135
Tabela 18	Tamanho, em pb do produto de PCR e fragmentos de restrição das leveduras estudadas.	147
Tabela 19	Médias dos teores de carbamato de etila produzido por diferentes leveduras.	148

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Página</b>
Figura 1	Esquema da célula de levedura	4
Figura 2	Seqüência de reações da fermentação alcoólica	19
Figura 3	Reação geral de formação de etanol e gás carbônico a partir de sacarose.	20
Figura 4	Fluxograma de Produção da Cachaça.	76
Figura 5	Estrutura química de algumas amins bioativas.	79
Figura 6	Rota metabólica para a formação de amins biogênicas	80
Figura 7	Fórmula estrutural do Carbamato de etila	85
Figura 8	Reação de síntese e via de bioativação do carbamato de etila. a) A síntese do CE nos resultados a partir da reação espontânea de etanol e uréia. b) A degradação epóxido produto da CE se liga ao DNA, causando danos e resultando em aumento das taxas de câncer em animais de laboratório.	93
Figura 9	Variação do teor de sólidos solúveis totais durante a fermentação de diferentes mostos.	110
Figura 10	Curva analítica para quantificação de cobre.	128
Figura 11	Curva analítica para quantificação de carbamato de etila.	129
Figura 12	Curva analítica para quantificação de carbamato de etila.	146

## RESUMO

VIEIRA, Érica Nascif Rufino; D.Sc., Universidade Federal de Viçosa; janeiro de 2011; **Influência do tipo de mosto e do gênero de levedura na formação de aminas bioativas e carbamato de etila em destilados alcoólicos**. Orientador: José Antônio Marques Pereira. Co-orientadoras: Regina Célia Santos Mendonça e Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência de diferentes mostos e do gênero de levedura na formação de carbamato de etila e aminas bioativas em destilados alcoólicos. Foram elaborados três diferentes mostos contendo açúcar mascavo, açúcar cristal e caldo-de-cana, todos diluídos a 16 °Brix. Os mostos foram fermentados e em seguida destilados em alambique de cobre. Foram analisados os teores de cobre e nitrogênio nos mostos, que se apresentaram diferentes em função da matéria-prima utilizada para sua elaboração. No destilado alcoólico produzido foi avaliado acidez total, teor alcoólico e teor de aminas bioativas. As amostras apresentaram valores de acidez abaixo do estabelecido pela legislação, com exceção das amostras da cauda do destilado elaborado com mosto de açúcar mascavo. Os teores alcoólicos variaram em função da fração analisada e da composição do mosto fermentado. Não se observou formação de aminas bioativas em nenhum dos mostos fermentados e em todos eles as aminas inicialmente presentes reduziram ou não foram detectadas ao final da fermentação, caracterizando-se como provenientes da matéria-prima utilizada e consumidas durante o processo de fermentação conduzido por microbiota selecionada. Os diferentes mostos não influenciaram o teor de carbamato de etila ao final da fermentação, porém o mosto elaborado com caldo-de-cana apresentou menor tempo de fermentação, provavelmente por possuir teor de nitrogênio e demais minerais que favorecer o metabolismo da levedura. Nos destilados elaborados observou-se maior teor de carbamato de etila nas frações cabeça e cauda e quantidades inferiores ao estabelecido pela legislação na fração coração, que constitui a bebida propriamente dita. Tal resultado mostra que uma separação eficiente das frações do destilado pode reduzir o teor de carbamato de etila presente na bebida e garantir sua segurança. Foram selecionadas 16 leveduras; identificadas como pertencentes aos gêneros *Pichia*, *Kluyveromyces* e *Saccharomyces*, foram utilizadas na produção de cachaça. As amostras apresentaram valor médio de carbamato de etila inferior ao admitido pela legislação brasileira, 150 µg·L<sup>-1</sup>. Os resultados indicam que a levedura presente no inóculo pode influenciar a formação de carbamato de etila na cachaça.

## ABSTRACT

VIEIRA, Érica Nascif Rufino, D.Sc., Federal University of Viçosa, January 2011; **Influence of must type and kind of yeast in bioactive amines ethyl carbamate in formation in alcoholic distillates.** Adviser: José Antonio Marques Pereira. Co-adviser: Regina Celia Santos Mendonca and Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.

This study aimed to evaluate the influence of different musts and the yeast in formation of ethyl carbamate and bioactive amines in alcoholic distillates. Three different musts were prepared containing brown sugar, granulated sugar-cane juice, all diluted to 16 Brix. The musts were fermented and distilled in a row in copper stills. We analyzed the levels of copper and nitrogen in musts, which had different depending on the feedstock used for its elaboration. In the alcoholic distillate produced was evaluated total acidity, alcohol content and content of bioactive amines. The samples had acidity values below the established by legislation, with the exception of samples from the tail of the distilled wine made with brown sugar. The alcohol levels varied depending on the analyzed fraction and composition of the fermented must. There was no significant formation of bioactive amines in fermented musts and all amines initially present were reduced or not detected at the end of fermentation, characterized as derived from the raw material used and consumed during the fermentation process conducted by microorganisms selected. The different musts did not influence the content of ethyl carbamate at the end of fermentation, but the must made with sugar-cane juice had lower fermentation time, probably because it has levels of nitrogen and other minerals that promote the metabolism of yeast. In all distillate we observe high levels of ethyl carbamate in the head and tail fractions, and amounts less than that set by the legislation in the heart fraction, which is the drink itself. This result shows that an efficient separation of the distillate fractions may reduce the content of ethyl carbamate present in the drink and ensure their safety. Sixteen yeasts were selected, identified as belonging to the genera *Pichia*, *Kluyveromyces* and *Saccharomyces* and used in the production of cachaça. The samples had an average value of ethyl carbamate lower than allowed by Brazilian law,  $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . The results indicate that the yeast present in the inoculum can influence the formation of ethyl carbamate in cachaça.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Cachaça é a denominação típica e exclusiva da Aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 a 48 % vol. a 20 °C, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo-de-cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g·L<sup>-1</sup>.

O aumento do consumo de cachaça de qualidade e a possibilidade de exportação exigem que o processo de fabricação da mesma seja baseado em boas práticas de fabricação para a obtenção de um produto padronizado e com qualidade nos aspectos físico-químicos, sensoriais e de segurança. Desta forma, a produção da cachaça de qualidade requer a aplicação de conhecimentos técnico-científicos comprovados e, além disto, competência gerencial.

Dentre os vários compostos encontrados na cachaça, o carbamato de etila tem recebido maior atenção dos órgãos de vigilância sanitária e instituições de pesquisa pela sua toxicidade. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, por meio da Instrução Normativa nº. 13, de 29 de Junho de 2005, aprovou o novo regulamento técnico para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para a Aguardente de cana e para Cachaça. Foi estabelecido neste regulamento o limite máximo de carbamato de etila em 150 µg·L<sup>-1</sup>. Este limite é o mesmo adotado pelos países importadores de cachaça que tem seus regulamentos para bebidas destiladas baseados na legislação canadense.

Carbamato de etila ou uretana é um composto potencialmente carcinogênico e forma-se naturalmente em alimentos e bebidas fermentados tais como pão, iogurte, vinho, cerveja, saquê e, principalmente, em bebidas fermento-destiladas tais como uísque, rum, vodca, grapa, cachaça e tiquira (aguardente de mandioca).

Nos últimos anos, várias pesquisas têm sido executadas no intuito de conhecer as causas da formação do carbamato de etila em bebidas, principalmente no uísque e no vinho, com o objetivo de elucidar o mecanismo de formação durante o processo de fabricação. No Brasil, a grande preocupação é com a cachaça e a aguardente de cana que, mediante estudos têm apresentado teores de carbamato de etila muito acima do limite estabelecido pela legislação vigente. Este fato pode representar uma barreira para as exportações do produto para vários países, principalmente EUA, Japão e os pertencentes à União Européia.

Aminas bioativas são bases orgânicas alifáticas ou heterocíclicas de baixa massa molecular; formadas e convertidas pelo metabolismo fisiológico de animais, plantas e micro-organismos e podem ser encontradas em diferentes tipos de alimentos, como queijos, derivados de peixes, cerveja e vinho.

Estas aminas em altas concentrações são indesejáveis em todos os alimentos e bebidas, pois podem induzir dores de cabeça, disfunções respiratórias, hipertensão, hipotensão e diversos distúrbios alérgicos, sendo também conhecidas como precursores em potencial de nitrosaminas carcinogênicas e bons indicadores da deterioração de alimentos fermentados ou não.

Bebidas alcoólicas constituem uma categoria de produtos fermentados, que podem apresentar quantidades substanciais de aminas biogênicas. Diversos estudos foram realizados para avaliar sua formação em cervejas, vinhos e espumantes. Não foram encontrados na literatura estudos que descrevam o perfil de formação de aminas bioativas durante o processo de produção da cachaça.

Sendo assim, é necessária a realização de estudos com o objetivo de verificar a formação de aminas bioativas e carbamato de etila durante o processo de produção da cachaça, sua influência na qualidade da bebida e propor medidas de controle e prevenção da sua formação.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes mostos formulados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana na formação de aminas bioativas e carbamato de etila durante a fermentação para a produção de destilado alcoólico e sua presença nas frações do destilado (cabeça, coração e cauda); e avaliar a participação de diferentes leveduras selecionadas na formação de carbamato de etila durante a produção de cachaça.

## **2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **PARTE 1 - LEVEDURAS E FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA**

#### **1- LEVEDURAS**

A importância industrial das leveduras vem se estendendo além da fermentação tradicional. Atualmente, os produtos da biotecnologia a partir de leveduras afetam muitos setores comerciais importantes, como as indústrias de alimentos, bebidas, biocombustíveis, produtos químicos, enzimas industriais, produtos farmacêuticos, produtos agrícolas e o meio ambiente. Tem-se a previsão de que a produção tradicional de álcool etílico, por indústrias cervejeiras, vinícolas, indústrias de bebidas destiladas e de combustíveis, e a produção de biomassa, pela indústria alimentícia, irão continuar a fornecer a maior quantidade de produtos fermentados do mundo. Esta suposição está baseada no fato de que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é responsável pela produção dos principais produtos de fermentação, isto é, 60 milhões de toneladas de cerveja, 30 milhões de toneladas de vinho, 800.000 toneladas de proteína microbiana (SCP – single cell protein) e 600.000 toneladas de fermento de pão.<sup>1</sup>

##### **1.1- Definição e classificação <sup>2</sup>**

As leveduras constituem um grupo de micro-organismos eucariotos unicelulares, que se reproduzem assexuadamente por brotamento ou por cissiparidade. São largamente encontradas na natureza, sendo comuns: no solo, na superfície de órgãos dos vegetais, principalmente em flores e frutos, no trato intestinal de animais, em líquidos açucarados, entre outros. Podem ser parasitas, simbiotes, sendo, em sua grande parte, saprófitos.

As células de leveduras podem ser esféricas, ovais ou elípticas podendo ainda apresentar-se bastante alargadas (Figura 1). Porém, a forma da levedura não é indicio para identificação de espécies e nem a variedade de formas em um mesmo cultivo pode ser considerada contaminação do mesmo. As leveduras não possuem flagelo e, em consequência disso, são imóveis. Suas dimensões variam consideravelmente em função da espécie, nutrição e idade entre outros fatores.

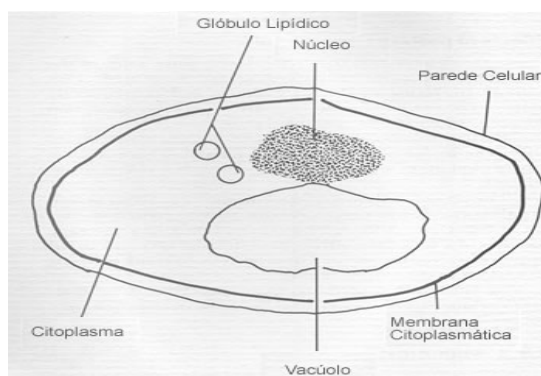


Figura 1 – Esquema da célula de levedura.<sup>3</sup>

As leveduras são capazes de crescer em uma ampla faixa de pH e em meio ácido, em concentrações de até 18 % de etanol e em concentrações de sacarose entre 55 e 60 %. Podem apresentar diferentes cores, variando de marfim ao vermelho. Alguns de seus ascósporos e artrósporos possuem alta resistência térmica.

As leveduras caracterizam-se por uma forma de reprodução vegetativa conhecida como brotamento ou gemulação. A esporulação em leveduras é um fator importante por constituir a base de um método de reprodução, desempenhar uma função de produção de novos híbridos e por manter a viabilidade das espécies durante as variações do meio ambiente. Quanto à composição química das leveduras, elas apresentam de 68% a 83% de água além de substâncias nitrogenadas, carboidratos, lipídios, vitaminas, minerais entre outros. Assim como qualquer forma de vida, as leveduras necessitam de fatores físicos e químicos importantes indispensáveis para seu crescimento e reprodução. Alguns elementos são basicamente necessários, como água, fontes de carbono e nitrogênio, oxigênio e minerais.<sup>3</sup>

Estudos demonstraram que as leveduras dependem de fontes de carbono orgânico para seu crescimento e obtenção de energia, sendo os carboidratos os nutrientes de maior importância. Alguns açúcares simples como a glicose, frutose e manose são assimiladas pela maioria das espécies estudadas, enquanto alguns oligossacarídeos, polissacarídeos, álcoois primários, polióis, ácidos orgânicos, pentoses, tetroses, hidrocarbonetos e lipídeos são utilizados seletivamente por algumas espécies. O carbono pode ser fornecido às leveduras na forma de açúcar, aldeídos, sais de ácidos orgânicos, glicerina ou etanol, e ocasionalmente de alguma outra forma, dependendo do tipo da levedura. Ao considerar os

açúcares como fonte de carbono, é importante ressaltar a diferença que existe entre a capacidade de uma levedura em assimilar e fermentar o mesmo açúcar.<sup>4</sup>

Para taxonomia das leveduras tem se utilizado métodos mais modernos que consistem na análise das características do rRNA 5S, composição das bases do DNA e perfil de coenzima Q. Devido ao maior tamanho do genoma das leveduras, as análises da sequência de rRNA 5S são mais utilizadas que a análise das porções maiores de RNA.

A taxonomia de 14 gêneros de leveduras encontrados em alimentos é mostrada a seguir.<sup>2</sup>

Divisão: Ascomycotina

Família: *Saccaromycetaceae* (formam ascósporos e artrósporos; reprodução vegetativa por fissão ou brotamento)

Subfamília: Nadsonioideae

Gênero: *Hanseniaspora*

Subfamília: Saccharomycotoideae

Gênero: *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Kluveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces*

Subfamília: SchizoSaccharomycotoideae

Gênero: *Schizosaccharomyces*

Divisão: Deuteromycotina

Família: Cryprococcaceae (fungos imperfeitos; reprodução por brotamento)

Gênero: *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*.

### ***Brettanomyces***

Leveduras não formadoras de esporos (asporogênicas) se reproduzem por brotamento terminal. Produzem ácido acético a partir da glicose somente em condições aeróbias. *B. intermedius* é a espécie mais comum, sendo capaz de crescer em pH em torno de 1,8. Causam alteração de cerveja, vinhos, refrigerantes e conservas de vegetais e algumas estão envolvidas na pós-fermentação de cervejas.

### ***Candida***

Gênero heterogêneo que pode ser dividido em 40 segmentos dentro de três grupos principais, com base, sobretudo, na composição de ácidos graxos e nos perfis eletroforéticos. As leveduras deste gênero não apresentam pigmentos carotenóides.<sup>5</sup>

Enquadram-se aqui as espécies ascomicetos imperfeitas, incluindo o antigo gênero *Torulopsis*, da seguinte forma:

- *Candida formata* (*Torulopsis candida*; *T. famata*)
- *Candida kefir* (*Candida pseudotropicalis*; *Torula kefir*; *T. cremosis*)
- *Candida stellata* (*Torulopsis stellata*)
- *Candida hlomii* (*Torulopsis holmii*)

Muitas das fases anamórficas se encontram, atualmente, incluídas nos gêneros *Kluyveromyces* e *Pichia*. *Candida lipolytica* é a forma anamórfica de *Saccharomyces lipolytica*.

Os membros deste gênero são as leveduras mais comuns em carne bovina crua moída e em carne de frango, enquanto *C. tropicalis* é encontrada em alimentos em geral. Alguns de seus membros participam da fermentação de sementes de cacau, integram grãos de kefir e podem ser encontrados em outros produtos alimentícios, tais como cervejas, ale e sucos de frutas.

### ***Cryptococcus***

Este gênero representa a forma anamórfica da *Filobasidiella* e de outros *Basidiomycetes*. Não formam esporos, se reproduzem por brotamento multilateral e não fermentam açúcares. Tem cor esbranquiçada, vermelha ou laranja e podem formar artrósporos. São encontrados nas plantas, solos, morangos e outras frutas, peixes marinhos, camarões e na carne bovina crua moída.

### ***Debaryomyces***

Leveduras formadoras de esporos podem produzir pseudomicélio e se reproduzem por brotamento multilateral. É um dos dois gêneros de leveduras mais encontrado em produtos lácteos. A espécie *D. hanseni* representa as leveduras que antigamente se

incluía nas espécies *D. subglobosus* e *Torulaspóra hansenii* e é a mais comumente encontrada em alimentos. São capazes de crescer em concentração de 24 % de NaCl e em baixa atividade de água, na ordem de 0,65. Produz micélio nas salsichas Viena, crescem na salmoura e em queijos e causam deterioração em suco de laranja concentrado e iogurte.

### ***Hanseniaspora***

São leveduras apiculadas, cuja forma anamórfica é representada pelas espécies do gênero *Kloeckera*. Apresentam brotamento bipolar e por consequência formam-se células com formato de limão. Os ascos contém 2 ou 4 esporos em forma de chapéu. Fermentam açúcares e podem ser encontrados em grande variedade de alimentos, principalmente em figos, tomates, morango, frutas cítricas e na fermentação da semente do cacau.

### ***Issactchenkia***

Os membros deste gênero produzem pseudomicélios e se multiplicam por brotamento multilateral. Estão incluídas aqui espécies que anteriormente pertenciam ao gênero *Pichia*. O telemorfo de *Candida Krusei* é *I. orientalis*. Tipicamente formam películas em meio líquido. Contém a coenzima Q-7 e são comuns em uma grande variedade de alimentos.

### ***Kluyveromyces (Fabospora)***

Estas leveduras produzem ascósporos, se reproduzem por brotamento multilateral sendo seus esporos esféricos. Na atualidade, *K. marxianus* inclui as antigas espécies *K. fragilis*, *K. lactis*, *K. bulgaricus*, *Saccharomyces lactis* e *S. fragilis*. *K. marxianus* é uma das duas leveduras mais comuns em produtos lácteos. Espécies pertencentes a este gênero produzem  $\beta$ -galactosidase e são vigorosas fermentadoras de açúcares, incluindo a lactose. *K. marxianus* contém a coenzima Q-6 e está envolvida na fermentação de coalhada. É utilizada para a produção de lactase e biomassa a partir do soro de queijo. É encontrada em grande variedade de frutas, sendo responsável pela deterioração de queijos.

### ***Pichia***

É o maior gênero de leveduras verdadeiras. Reproduzem-se por brotamento multilateral e os ascos normalmente contém quatro esporos esféricos, em forma de chapéu ou semelhante a saturno. Podem formar pseudomicélios e artrósporos. *P. guillermondii* é a fase teleomórfica de *Candida guillermondii* e a fase anamórfica de *P. membranaefaciens* é *Candida valida*. Espécies deste gênero tipicamente formam película em meio líquido e são importantes na produção de alimentos em distintas partes do mundo. Tem sido encontrado em pescado fresco e camarões, crescem em salmoura de azeitonas, causam deterioração de pickles e chucrute.

### ***Rhodotorula***

Estas leveduras são anamorfias dos Basidiomicetos. No gênero *Rhodosporidium* se encontram as produtoras de teliósporo. Reproduzem-se por brotamento multilateral e não fermentam substratos. As duas espécies mais abundantes nos alimentos são *R. glutinis* e *R. mucilaginosa*. Produzem pigmentos rosados e vermelhos, a maioria possui cor laranja ou salmão. Este gênero inclui muitas espécies psicrotróficas, as quais são encontradas em carne de frango, camarão, pescado e carne bovina fresca. Algumas crescem na superfície da manteiga.

### ***Saccharomyces***

Estas leveduras formadoras de ascósporos se reproduzem por brotamento multilateral e produzem esporos esféricos nos ascos. São diplóides e não fermentam lactose. As leveduras classificadas anteriormente como *S. bisporus* e *S. rouxii* se incluem atualmente no gênero *Zygosaccharomyces* e *S. rosei* está no gênero *Torulaspota*. As leveduras utilizadas na produção de cerveja, pães, vinho e champanhe são *S. cerevisiae*. São encontradas nos grãos de Kefir e podem ser isoladas de uma grande variedade de alimentos, como salame e diversas frutas, mesmo que raramente produza alterações nos alimentos. *S. bailii* é uma levedura que altera alimentos e que é muito conhecida por sua atividade no molho de tomate, maionese, molhos para salada, refrigerantes, sucos de frutas, cidras e vinhos. É resistente aos conservantes benzoato e sorbato.

O gênero *Saccharomyces* tem passado por inúmeras mudanças desde a sua descoberta, há 150 anos. Quando a primeira publicação sobre taxonomia de leveduras foi compilada por Guilliermond, em 1912, o gênero *Saccharomyces* compreendia 46 espécies divididas em 06 grupos separados de acordo com a atividade fermentativa sobre os açúcares. Em 1952, o número total de espécies deste gênero foi reduzido a 30, uma vez que várias espécies foram agrupadas como sinônimos em *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* variedade *elipsoideus*, *Saccharomyces carlsbergensis* ou *Saccharomyces willianus*, enquanto novas espécies foram introduzidas ao gênero. Entretanto, várias outras divisões ocorreram e outras novas espécies foram descritas, principalmente o grupo *Saccharomyces sensu stricto*, obtendo-se como resultado, em 1970, 41 espécies dentro do gênero *Saccharomyces*. Walt e Yarrow (1993), reduziram drasticamente o gênero *Saccharomyces* em 7 espécies. *Saccharomyces sensu stricto*, previamente com 21 espécies, tornou-se a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, e outras espécies previamente agrupadas por Van der Walt, em 1970, foram introduzidas a outros gêneros como *Zygosaccharomyces* e *Tolurasporea*. Esta classificação de Yarrow, mais tarde foi confirmada por alguns autores, e considerada contraditória por outros.<sup>6</sup>

Atualmente, de acordo com a última revisão taxonômica, 14 espécies são aceitas dentro do gênero *Saccharomyces*, as quais estão classificadas em três grupos previamente estabelecidos por van der Walt. O complexo *Saccharomyces sensu lato* inclui *Saccharomyces barnettii*, *Saccharomyces castellii*, *Saccharomyces dairenensis*, *Saccharomyces exiguus*, *Saccharomyces rosinii*, *Saccharomyces servazzii*, *Saccharomyces spencerorum*, *Saccharomyces transvaalensis* e *Saccharomyces unisporus*. O segundo grupo *Saccharomyces kluyveri*. O terceiro grupo, o qual inclui espécies de interesse biotecnológico, consiste do complexo *Saccharomyces sensu stricto*, compreendendo *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus*, todos associados com fermentação industrial, e *Saccharomyces paradoxus*, a única espécie *Saccharomyces sensu stricto* tipicamente isolada a partir de habitat natural (insetos, árvores e exsudatos). Recentemente, três novas espécies isoladas a partir de habitat natural, *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzvi* e *Saccharomyces mikatae*, têm sido incluídas dentro do grupo *Saccharomyces sensu stricto*.<sup>7</sup>

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um micro-organismo comumente utilizado por ser não-patogênico, e devido a sua longa história de aplicação na produção de produtos consumíveis como o etanol e o pão, ela foi classificada como micro-organismo geralmente considerado seguro (GRAS – generally regarded as safe). Além disso, os processos fermentativos e tecnológicos bem estabelecidos para a produção em larga escala com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, fazem este micro-organismo ser utilizado em muitos processos biotecnológicos. Outra importante razão para a aplicabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* dentro do campo da biotecnologia é a sua susceptibilidade a modificações genéticas pela tecnologia do DNA recombinante, que vem sendo bastante facilitado pela publicação, em 1996, do genoma completo da levedura.<sup>8</sup>

### ***Schizosaccharomyces***

Leveduras formadoras de ascósporos se dividem por fissão bilateral da parede e podem produzir hifas verdadeiras e artrósporos. Os ascos contêm de quatro a oito esporos em forma de feijão e não produzem brotos. São considerados parentes distantes das leveduras verdadeiras. *S. pombe* é a espécie mais comum. São osmofílicas e resistentes a alguns conservantes químicos.

### ***Torulaspota***

Reproduzem-se por brotamento multilateral com esporos esféricos nos ascos. Três espécies haplóides antigamente incluídas no gênero *Saccharomyces*, estão incluídas neste gênero. São grandes fermentadores de açúcares e contêm a coenzima Q-6. *T. delbrueckii* é a espécie mais comum.

### ***Trichosporon***

Estas leveduras oxidativas, não formadoras de ascósporos, se multiplicam por brotamento e por formação de arthroconídios. Produzem micélio verdadeiro e não fermentam açúcares ou são ineficientes na fermentação dos mesmos. Estão envolvidos nas fermentações de idli e sementes de cacau. Foram encontrados em carne bovina moída, frango, ovelha congelada e outros alimentos. *T. pullulans* produz lipase e é a espécie prevalente.

## *Zygosaccharomyces*

O brotamento multilateral é a forma de reprodução destas leveduras e os ascósporos na forma apiculada se encontram geralmente livres no interior dos ascos. A maioria é haplóide e são potentes fermentadoras de açúcares. *Z. rouxii* é a espécie mais comum, sendo capaz de crescer em atividade de água de 0,62, equiparando somente a *Xeromyces bisporus* quanto a capacidades de crescer em baixas atividades de água. Algumas estão envolvidas nas fermentações de shoyu e miso e outras deterioram maionese e molhos para salada, em especial *Z. bailii* que é capaz de crescer em pH 1,8.<sup>9</sup>

### **1.2- Composição química da célula de levedura**

A composição química é amplamente afetada em função da linhagem, fase de crescimento e condições físicas e químicas do meio de cultivo, mas podem ser resumidas como tendo alto teor de proteína, alto conteúdo de ácidos nucleicos, baixo conteúdo de lipídeos, alto conteúdo de cinzas, conteúdo moderado de carboidratos e alto conteúdo de vitaminas.<sup>10,11</sup>

*Saccharomyces cerevisiae* apresenta cerca de 35 % de matéria seca, da qual 10 % é representada pela trealose, 12 % pelo glicogênio, 8 % por glucana e 6 % por manana.<sup>12</sup>

Os lipídeos não excedem 7 % da matéria seca, sendo representados principalmente por glicerídeos de ácidos graxos, fosfolipídios (lecitina e cefalina) e esteróis (ergosterol).<sup>13</sup>

As cinzas representam de 1,9 a 19 % do peso seco da levedura dependendo da linhagem e do meio de crescimento, sendo o fósforo e o potássio, seus maiores componentes.<sup>14</sup>

A Tabela 1 mostra intervalos relativos a proporções dos elementos em leveduras comerciais.<sup>15</sup>

### **1.3- Efeito da temperatura em células de levedura**

Linhagens mesofílicas de *Saccharomyces cerevisiae* crescem em um intervalo compreendendo temperatura mínima de 10 °C e máxima de 40 °C, sendo a temperatura ótima entre 28 e 35 °C.<sup>16</sup>

A manutenção das células em temperatura próxima a máxima ocasiona alterações bioquímicas nas mesmas. Tais alterações consistem em aumento no requerimento de ácidos

graxos para manutenção da rigidez da membrana,<sup>17</sup> aumento acentuado na fração de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético,<sup>18</sup> maior sensibilidade ao etanol, diminuição da atividade enzimática teores de proteína, RNA e DNA da célula.<sup>19</sup>

Tabela 1- Proporções relativas dos elementos em leveduras comerciais.<sup>15</sup>

ELEMENTO	LEVEDURA (g.100g <sup>-1</sup> matéria seca)
C	45-77
H	6,0-6,5
O	31-32
N	7,5-9,0
K	0,9-3,5
P	1,1-2,0
S	0,3-0,5
Mg	0,15-0,5
Ca	0,04-0,9
Na	0,02-0,2
Zn	0,004-0,13
Fe	0,003-0,10
Cu	0,002-0,012
Mn	0,004-0,0035
Co	0,0005
Mo	0,000005-0,000009
Cl	0,004-0,1
I	0,00005-0,0005
PB	0,0001-0,0007
As	0,00001
Si	-
Sr	-
B	-

À medida que se eleva a temperatura há acentuada diminuição da capacidade respiratória das leveduras e conseqüente aumento na taxa de fermentação.<sup>17</sup>

Diversos fatores ambientais atuam sinergisticamente com a alta temperatura. O efeito nocivo da alta temperatura sobre as leveduras, é acentuado em condições de pH menos favorável e células em fase de crescimento exponencial são mais sensíveis a temperatura alta do que aquelas em fase estacionária de crescimento.<sup>19</sup>

Leveduras incubadas a temperaturas acima da ótima apresentam maior requerimento nutricional durante o crescimento. No entanto, células sob jejum, são mais resistentes ao calor do que células em meio rico em nutrientes (PARIS e PRINGLE, 1983).

Nesta condição ocorre liberação de aminoácidos hidrofóbicos pelas mesmas, os quais atuam como “termoprotetores”, estabilizando a membrana e aumentando a resistência das células ao calor. A maior termotolerância observada por leveduras em suspensão com alta concentração de massa celular, é consequência dos maiores níveis desses aminoácidos “termoprotetores” no meio, atingidos nessas condições.<sup>19</sup>

Estudos correlacionando o teor de trealose da célula e sua resistência ao calor sugeriram que micro-organismos termotolerantes produzem mais trealose quando mantidos em temperatura alta, como um mecanismo para prevenir a desidratação, sem que haja necessidade de aumentar a rigidez da membrana.<sup>20</sup>

Outro fator relacionado ao crescimento em temperatura alta é a presença de proteínas do choque térmico (HSP). Uma breve exposição de células a temperatura acima do ótimo (37 °C por 30 min) induz uma série de HSP específicas, as quais conferem termoresistência às células. Tal fenômeno parece ser comum, tendo sido observado em *Drosophila*, leveduras e bactérias.<sup>21</sup>

#### **1.4- Efeito do pH em *Saccharomyces cerevisiae***

As leveduras, como qualquer outro organismo, requerem para seu crescimento uma determinada faixa de concentração de íons hidrogênio no meio, na qual são mantidas a estrutura e atividade de suas moléculas.

Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* toleram ampla variação de pH, crescendo entre os limites de 2,5 a 8,5. O índice ótimo de pH obtido para essa levedura aproxima-se de 4,5. A manutenção do pH intracelular durante o crescimento das leveduras está relacionada com a excreção de íons H<sup>+</sup> gerados pela absorção de íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.<sup>22</sup>

A liberação de íons H<sup>+</sup> juntamente com ácidos orgânicos, ocasiona o abaixamento do pH do meio de suspensão de células, após a alcalinização do mesmo. No meio celular suplementado com glicose, ocorre uma intensificação no abaixamento do pH demonstrando haver estreita correlação entre a glicose e a liberação de íons H<sup>+</sup>.<sup>23</sup>

A liberação de íons H<sup>+</sup> aumenta acentuadamente quando, além da glicose, são adicionados cátions monovalentes à suspensão de leveduras, na seqüência K<sup>+</sup> > Rb<sup>+</sup> > Li<sup>+</sup> = Na<sup>+</sup>.<sup>24</sup>

A associação entre metabolismo de carboidratos e absorção de potássio foi demonstrado por Rothstein e Enns (1946)<sup>25</sup> e seus dados corroborados por Scott et al.

(1951)<sup>26</sup>. De acordo com estes autores, a inibição da via glicolítica por ácido indol acético, além de bloquear a absorção de potássio, provoca a perda desse elemento pela célula.

A constatação de que a absorção de potássio era acompanhada da liberação de íon  $H^+$ , levou diversos autores a proporem mecanismos de troca  $K^+/H^+$  entre o meio e a célula. Tal mecanismo de troca envolveria um carreador, atuando como uma bomba de prótons, cujo funcionamento se daria à custa de energia proveniente do metabolismo celular.<sup>27</sup>

Essa hipótese foi suportada por Mitchell (1961)<sup>28</sup> o qual propôs ainda a presença de atividade de ATPase de membrana criando um potencial eletroquímico necessário para a transferência do íon  $K^+$  para dentro da célula contra gradiente de concentração.

No entanto, Pena (1975)<sup>29</sup> tratando células de levedura com dinitrofenol (DNP), conhecido inibidor da fosforilação oxidativa, observou que a inibição da absorção de potássio ocorreu antes que o ATP das células reduzisse a níveis críticos. Foi proposto pelo autor que a inibição da absorção de potássio não foi devida a diminuição da ATP, mas sim ao aumento da liberação desse elemento pela célula, observado em tais condições. O efluxo de  $H^+$  da célula durante o experimento, ocorreu através de um mecanismo a parte do transporte de  $K^+$ .

A liberação de  $H^+$ , através do mecanismo distinto de troca direta  $K^+/H^+$  também foi relatado por Kotik e Sigler (1981)<sup>30</sup> e confirmado por Ramos (1985)<sup>31</sup>. Este último, submetendo célula de levedura a tratamento com os antibióticos nistatina e anfotericina obteve inibição na absorção de  $K^+$  antes da inibição da excreção de  $H^+$ . Por outro lado, dinitrofenol inibiu o fluxo do íon  $H^+$  antes de inibir o fluxo do íon  $K^+$ .

## **1.5- Metabolismo e funções dos carboidratos de reserva em *Saccharomyces cerevisiae***

### **1.5.1- Glicogênio**

O primeiro modelo proposto para a molécula consistia de unidades de glicose ligadas através de ligações glicosídicas  $\alpha$  (1-4) e  $\alpha$  (1-6), apresentando regularidade de cadeias de dois tipos, A e B. As cadeias do tipo A se ligariam a molécula por ligações  $\alpha$  (1-6), não sofrendo ramificações e sendo sempre exteriores. As cadeias do tipo B, ou cadeias principais, seriam constituídas por ligações  $\alpha$  (1-4) e ramificadas por cadeias do tipo A.<sup>32</sup>

O modelo físico-químico do glicogênio proposto por French (1964)<sup>33</sup> consiste numa molécula com forma esférica, capaz de conter em sua superfície, uma enorme quantidade

de cadeias A e B, cujo massa molecular é em torno de  $2 \times 10^7 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  na forma anidra e  $4 \times 10^7 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  quando hidratado.

De fato, existem dois tipos de glicogênio. O primeiro tipo estaria contido no material solúvel da célula, enquanto o segundo estaria fisicamente acoplado a uma membrana de glucana, sendo insolúvel.<sup>32</sup>

O método de extração de carboidratos de leveduras por processo de fracionamento, leva à distinção de uma fração de glicogênio alcali e outra ácida solúvel.<sup>34</sup> Entretanto, os dois tipos de glicogênio (solúvel e insolúvel) são quimicamente iguais, sendo a fração ácida solúvel apenas um artefato da extração alcalina, desaparecendo quando se utiliza álcali forte para a extração.<sup>35</sup>

Além da diferenciação física do glicogênio, foi proposta uma diferenciação metabólica para a molécula. Estudos cinéticos sobre o metabolismo endógeno do glicogênio revelaram que as cadeias externas da molécula são metabolizadas por fermentação endógena, enquanto que as cadeias internas são mobilizadas por via oxidativa.<sup>36</sup>

#### 1.5.2- Trealose

A trealose tem importância relevante quando seu acúmulo foi relacionado à manutenção da viabilidade celular durante armazenamento de levedura de panificação, manutenção de esporos viáveis e a manutenção da viabilidade, bem como na melhora da capacidade de produção de etanol em cepas com altos teores iniciais de trealose.<sup>37</sup>

Encontra-se amplamente distribuída na natureza, tendo sido isolada de bactérias, algas, fungos, insetos, nematóides, anelídeos e vegetais. Nestes organismos, a trealose está envolvida com os mais diversos mecanismos. Em micobactérias, a trealose aparece associada com outras substâncias formando glicolipídeos, sulfolipídeos e polissacarídeos importantes na composição da parede celular e muitas vezes relacionada com a antigenicidade. Nos insetos, é observada na hemolinfa, ocorrendo em todos os estágios e atuando, nos adultos, como reserva para vôo.<sup>38</sup>

A trealose é importante para a manutenção da viabilidade celular da levedura, contudo, é utilizada como carboidrato de reserva durante períodos de não proliferação, quando a sobrevivência da célula depende do nível de trealose e de glicogênio.<sup>39</sup>

A aerobiose favorece a síntese da trealose, se comparada à anaerobiose. Como uma grande quantidade de trealose é acumulada em condições adversas, esse dissacarídeo exerceria uma profunda influência na atividade de água do citossol, podendo contribuir para a desaceleração do metabolismo e promover a transição da célula para o estado de repouso.<sup>40</sup>

A trealose tem importante participação na manutenção da integridade da membrana em condições de baixa atividade de água, substituindo moléculas de água da membrana, com participação de um transportador capaz de permitir a presença de trealose nos dois lados da dupla camada fosfolipídica, sendo também considerada termoprotetora, com papel importante na ocorrência de choque térmico.<sup>41</sup>

A correlação entre a manutenção da viabilidade e o teor de trealose endógena é observada em linhagens de leveduras osmotolerantes e naquelas que mantêm a viabilidade quando armazenadas a temperaturas de 4 a 20 °C.<sup>37</sup> O estudo de 86 leveduras provenientes de 3 destilarias de produção artesanal de cachaça revelou que todos os isolados apresentaram capacidade de produzir invertase e acumular trealose na presença de glicose, além disso foi observada uma forte relação entre o acúmulo de trealose intracelular e a viabilidade celular sob condições de estresse.<sup>42</sup>

De modo geral, a síntese de trealose é favorecida quando há superprodução de ATP, que desacelera o fluxo glicolítico, é intensa no jejum e quando não há crescimento em células, como na fase estacionária.<sup>43</sup>

A degradação da trealose ocorre rapidamente na presença de glicose, o que induz o abaixamento do pH intracelular, a formação de AMP cíclico, que é o principal regulador dos níveis de trealose na célula e também pela redução das atividades das enzimas de síntese por fontes de nitrogênio.<sup>40</sup>

Os teores de trealose e glicogênio sofrem alterações consideráveis expressas pela queda sofrida logo no início da fermentação (30 minutos) e se repõem durante o período subsequente, atingindo no final da fermentação teores superiores aqueles do início do processo.<sup>41</sup> A diminuição de reservas de trealose e glicogênio correspondem estequiometricamente a produção de glicerol (0,25 g·100 mL<sup>-1</sup> de vinho) e ácidos orgânicos (800 mg·L<sup>-1</sup>) até a primeira hora de fermentação. As quedas nos teores de ambas reservas coincidem com a fase de maior velocidade de produção de etanol. Foi constatada a

mobilização da trealose e a formação contínua de etanol até 72 horas com o fermento Fleischmann suspenso em água destilada.<sup>42</sup>

## **2- FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA**

Entre os alimentos contendo carboidratos, costuma-se distinguir os diretamente fermentescíveis e os não diretamente fermentescíveis. Os primeiros são os que contêm monossacarídeos e se limitam aos sucos de frutas. Sua importância reside na produção de álcool em bebidas como vinho e sidra. Os não diretamente fermentescíveis são os que contêm os dissacarídeos, que fermentam após uma hidrólise, a qual se dá o nome de inversão, e que se realiza naturalmente por ação da invertase, enzima produzida pelo agente de fermentação. A sacarose é a representante mais importante dos componentes da cana-de-açúcar e dos melaços.<sup>46</sup>

Metabolicamente as leveduras são predominantemente anaeróbias facultativas, sendo capazes de crescer tanto na ausência de ar (fermentação) como na sua presença (respiração ou metabolismo oxidativo), e a contribuição de cada um destes eventos depende das condições do meio.<sup>47</sup> Assim, enquanto uma porção do açúcar é transformada em biomassa, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O em aerobiose, a maior parte é convertida em etanol e CO<sub>2</sub> em anaerobiose, processo denominado fermentação alcoólica. Os carboidratos considerados substratos para a fermentação, tanto podem ser endógenos (constituintes da levedura, como glicogênio e trealose) como exógenos (sacarose, glicose, frutose e outros), estes últimos fornecidos a levedura.<sup>46</sup>

A transformação da glicose em etanol e CO<sub>2</sub> envolve doze reações em seqüência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Tal aparato enzimático está confinado no citoplasma celular, sendo, portanto nessa região da célula que a fermentação alcoólica se processa (Figura 2).<sup>46</sup>

A fermentação é um processo espontâneo decorrente da presença de micro-organismos nos substratos, que normalmente ocorre na ausência de oxigênio. Além disso, é um processo no qual a fosforilação ocorre em nível de substrato. Na biotecnologia, o principal aspecto se refere a quais produtos poderão ser obtidos a partir da fermentação.<sup>47</sup>

As leveduras possuem dois tipos de metabolismo celular: oxidativo e fermentativo. O metabolismo oxidativo (respiração) ocorre na presença de oxigênio, havendo a

multiplicação intensa da levedura. Na ausência de oxigênio, o metabolismo passa a ser fermentativo.<sup>48</sup>

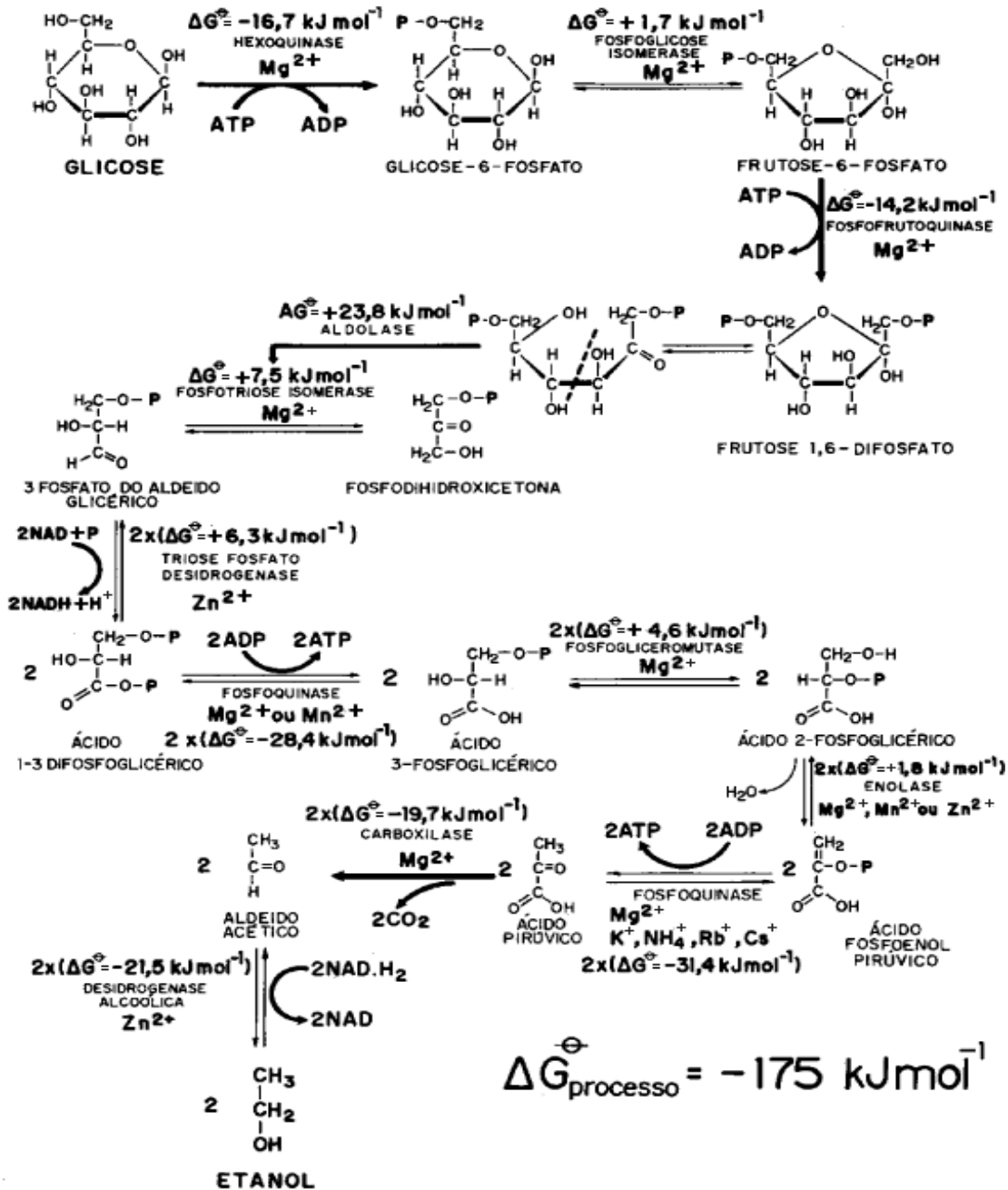


Figura 2- Sequência de reações da fermentação alcoólica.<sup>49</sup>

A grande maioria dos organismos fermentadores tem em comum o fato de metabolizar a fonte de carbono até o piruvato e, deste, sintetizar outros compostos orgânicos que retêm energia, tais como ácido lático (fermentação láctica), ácido acético (fermentação acética), etanol (fermentação alcoólica), ácido propiônico e outros.<sup>50</sup>

As leveduras, em condições anaeróbicas, metabolizam a glicose pela via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), originando, no final do processo, etanol e gás carbônico. Cada molécula de glicose metabolizada dá origem a 2 moléculas de etanol, 2 moléculas de gás carbônico e 2 ATP, não requerendo oxigênio e uma cadeia de transporte de elétrons. O produto final é uma molécula de etanol comoceptor final de elétrons. Dessa maneira, a fermentação de um grama de glicose resulta na formação de 0,511 g de etanol, porém, na prática, essa taxa de conversão nunca excede 90 % a 93 %. Esta diferença é resultante da utilização de açúcares para biossíntese de material celular de reposição e para reações de manutenção das células vivas. Além disso, parte dos açúcares é usada para reações paralelas, como formação de glicerol, ácido succínico, butanodiol e outros compostos.<sup>51</sup>

A utilização do substrato inicia com sua absorção. Durante a fermentação alcoólica, a sacarose, principal substrato empregado no processo, é absorvida na forma de seus monossacarídeos estruturais glicose e frutose, após hidrólise pela exoenzima invertase, produzindo 4 moléculas de etanol e 4 moléculas de CO<sub>2</sub> (Figura 3). A glicose e a frutose são diretamente fermentadas, mas a sacarose não. Isso ocorre porque as leveduras a fermentam transformando-as em açúcar invertido por meio da inversão enzimática da sacarose.<sup>52</sup>

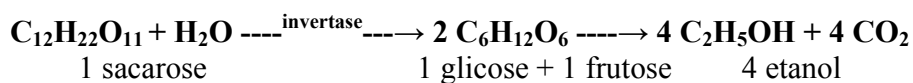


Figura 3 - Reação geral de formação de etanol e gás carbônico a partir de sacarose.

Com a difusão facilitada através da membrana por permeases específicas, esses açúcares, são imediatamente fosforilados, e, portanto, aptos a fluírem pela via Embden-Meyerhof-Parnas.<sup>53</sup>

Em termos energéticos, a respiração é muito mais favorável que a fermentação. Assim, sempre que possível a levedura utiliza em aerobiose o açúcar oxidando-o completamente a nível mitocondrial.<sup>47</sup>

As condições de cultivo que proporcionam o máximo crescimento celular podem não ser necessariamente aquelas que proporcionem o máximo rendimento de algum produto do metabolismo.<sup>54</sup> A presença do oxigênio molecular, como ocorre na aeração, induz a mudança no metabolismo energético de fermentação para respiração.<sup>55</sup>

É comumente aceito que anaeróbios facultativos têm a habilidade de crescer sob ambas as condições de aerobiose ou anaerobiose usando, respectivamente, oxigênio molecular ou outro composto como aceptor final de elétrons ou redutores equivalentes vindos do processo anabólico.<sup>56</sup>

A célula de levedura possui compartimentações para adequação da atividade metabólica. A fermentação alcoólica (glicólise anaeróbia) ocorre no citoplasma, enquanto que a oxidação total do açúcar (respiração) se dá na mitocôndria.<sup>57</sup>

O objetivo primordial que induz todos os organismos a metabolizarem os carboidratos é, via de regra, a máxima produção de energia no catabolismo oxidativo, a formação de estruturas celulares e a estocagem de reservas para a posterior utilização.

O etanol e o CO<sub>2</sub> resultantes constituem, tão somente, produtos de excreção, sem utilidade metabólica para a célula em anaerobiose. Entretanto, o etanol, bem como outros produtos de excreção (como o glicerol e ácidos orgânicos) pode ser oxidado metabolicamente, gerando mais ATP e biomassa, mas apenas em condições de aerobiose.<sup>46</sup>

Uma ambigüidade das leveduras se nota no que tange ao metabolismo biossintético: ao invés de um carboidrato de reserva, como nos demais organismos, as leveduras possuem dois, o glicogênio e a trealose.<sup>58</sup>

Tão logo se mistura o inóculo ao mosto, inicia-se o processo de fermentação alcoólica dos açúcares fermentescíveis nele contido. Embora, não se possam estabelecer com rigidez, os limites de separação entre as fases, pode-se distinguir em uma fermentação alcoólica fase preliminar, fase tumultuosa e fase final ou complementar.<sup>46</sup>

A *fase preliminar* inicia-se no momento do contato do fermento com o mosto. Caracteriza-se por multiplicação celular intensa, pequena elevação de temperatura e pequeno desprendimento de dióxido de carbono. Nessa fase garante-se a produção de grande quantidade de células de poder fermentativo máximo, o que se consegue em temperatura baixa e mosto com características adequadas. Sua duração varia de acordo com o sistema de fermentação; podendo ser reduzida pelo uso de um inóculo bem volumoso.

Um número adequado de células pode iniciar a segunda fase bem rapidamente, atuando diretamente no desdobramento dos açúcares. Isso não significa que não haja multiplicação celular, mas ela se faz menos intensamente. Normalmente a produção de etanol se relaciona com o crescimento da levedura.

A *fase tumultuosa* caracteriza-se pelo desprendimento volumoso e intenso de dióxido de carbono, conseqüência da existência de um número suficiente de células para desdobrar os açúcares fermentescíveis do mosto. É a fase de maior tempo de duração. A temperatura eleva-se rapidamente, a densidade do mosto reduz e elevam-se a porcentagem de álcool e acidez. O substrato agita-se como em ebulição, com o desprendimento evidente de dióxido de carbono. O aspecto da espuma difere para cada tipo de mosto e fermento. No caldo-de-cana não clarificado é espessa, viscosa e volumosa, a ponto de transbordar em dorna aberta.

A *fase complementar* caracteriza-se pela diminuição da intensidade do desprendimento do dióxido de carbono, menor agitação do líquido e diminuição da temperatura. Nessa fase a concentração de açúcares chega ao fim.

O tempo total da fermentação nas fermentações descontínuas varia de acordo com o volume de inóculo e com a maneira de alimentá-lo.<sup>46</sup>

## **2.1- Produtos Secundários da Fermentação**

Na seqüência de reações enzimáticas de produção de ATP e intrínsecas a formação de etanol, rotas metabólicas alternativas aparecem para propiciar a formação de materiais necessários à constituição da biomassa (polissacarídeos, lipídios, proteínas, ácidos nucléicos e outros), bem como para a formação de outros produtos de interesse metabólico, relacionados direta ou indiretamente com a adaptação e sobrevivência. Dessa forma, juntamente com o etanol e o CO<sub>2</sub>, o metabolismo anaeróbico permite a formação e excreção de glicerol, ácidos orgânicos (succínico, acético, pirúvico e outros), alcoóis superiores, acetaldeído, acetoína, butilenoglicol, além de outros compostos de menor significado quantitativo; simultaneamente ocorre a formação de biomassa).

Estima-se que 5 % do açúcar metabolizado pela levedura sejam desviados para gerar tais produtos secundários da fermentação, resultando num rendimento de 95 % de etanol, conforme já observado por Pasteur em condições adequadas de fermentação.

Entretanto em condições industriais, nas quais fatores químico, físicos e microbiológicos afetam a levedura, rendimento de 90 % normalmente é obtido, o que implica em desvios de 10 % do açúcar para formação de outros produtos que não etanol.<sup>46</sup>

Depois do etanol, o glicerol é o segundo composto formado em maior quantidade pela *S.cerevisae* durante a fermentação. O glicerol é formado pela redução da di-hidroxiacetona fosfato para glicerol 3-fosfato, concomitantemente com a oxidação do NADH para NAD<sup>+</sup>, sendo que o glicerol 3-fosfato é desfosforilado até glicerol. Em condições anaeróbicas, a *S. cerevisae* produz glicerol para manter o balanço de redox para sustentar o processo de glicólise.<sup>59</sup>

O glicerol é o único poliálcool produzido pela *Saccharomyces cerevisiae* cuja biossíntese foi estudada por Gancedo et al. (1968)<sup>60</sup>, identificando a reação enzimática NADH-dependente responsável pela redução da triose-fosfato ao glicerol-fosfato. Lagunas e Gancedo (1973)<sup>61</sup> observaram que as principais reações de regeneração do NADH eram as do acetaldeído e da fosfodi-hidroxiacetona. De fato, Radler e Schtz (1982)<sup>62</sup> consideraram que a formação de glicerol fosse resultado da competição entre a desidrogenase alcoólica e a desidrogenase de glicerol-fosfato para a regeneração de NADH. No início da fermentação, quando a atividade descarboxilase pirúvica ainda é baixa, o piruvato e o glicerol são produzidos em quantidades maiores que o próprio etanol.<sup>63</sup>

O glicerol é considerado um metabólito osmorregulador presente em *S. cerevisiae*, pois sua formação é aumentada em meios com baixa atividade de água e determinada pela presença de solutos, tais como sais e açúcares.<sup>64</sup>

A síntese de glicerol relaciona-se inversamente com a eficiência fermentativa.<sup>65</sup> A utilização de antiespumantes que diminuem a resistência das membranas à saída de glicerol, estimula sua síntese e diminui a de etanol, acarretando um decréscimo no conteúdo de ATP intracelular.<sup>66</sup>

A produção de glicerol pode ser favorecida na presença de sulfito em condições alcalinas. Energeticamente a formação de glicerol resulta em consumo de ATP, portanto, a levedura teria que apresentar boas razões para sintetizar glicerol em excesso, posto que uma superprodução seria prejudicial à célula. O glicerol necessário à biossíntese de lipídios pode ser considerado insignificante em relação ao montante que é produzido.<sup>47</sup>

Uma das condições em que se tem excesso de  $\text{NAD} + \text{H}^+$  na célula é quando ocorre o crescimento. Para haver crescimento é necessária a síntese de proteínas, onde parte dos aminoácidos provém do piruvato. Assim, para se restabelecer o equilíbrio de redox durante a fermentação, quando há crescimento, o único caminho é a formação de glicerol. E embora a fermentação alcoólica não seja um processo oxidativo, havendo formação de material celular, está compreende uma oxidação em termos globais.<sup>67</sup>

Além do crescimento, há outras condições que desequilibram o balanço de redox da célula: as formações oxidativas de ácidos orgânicos, notadamente succínico e acético.

### **Ácidos orgânicos**

Os ácidos orgânicos são expressos em acidez total, composta pela acidez volátil e fixa, sendo que os ácidos orgânicos voláteis são os mais comuns em bebidas destiladas.<sup>68</sup> O ácido acético representa a maior parte dos ácidos orgânicos presentes no destilado, variando de 60 a 95 % da acidez total. A produção de ácido acético pode ser causada pela contaminação do mosto por bactérias acéticas e pelas próprias leveduras, que produzem o ácido acético, para gerar acetil-coenzima-A, utilizada na síntese de ácidos graxos, esteróis e aminoácidos.<sup>69</sup> Vários outros ácidos não voláteis também são formados no mosto, devido ao metabolismo normal das leveduras, como por exemplo, os ácidos oxaloacético, cítrico, pirúvico, málico, maleico, etc. Outro motivo para formação desses ácidos é a transição do metabolismo aeróbico (fase de crescimento da levedura) para o metabolismo anaeróbico, a fermentação propriamente dita, onde são formados ácidos graxos de cadeia curta.<sup>70</sup>

Durante a fase de crescimento e propagação as leveduras produzem ácidos graxos de cadeia longa, moléculas usadas para formação de membranas, sem as quais não ocorre a divisão e multiplicação de células do fermento. Entrando no estado de anaerobiose, as leveduras param imediatamente a síntese desses ácidos, contendo dentro delas ainda ácidos com 4, 6, 8, 10 carbonos, como por exemplo, ácidos butíricos, capróico, caprílico e cáprico, os quais se tornam inúteis para o seu metabolismo, já que não possuem 16 carbonos. Dessa forma esses ácidos são então secretados para o meio, como produtos secundários, da fase de propagação da levedura e tem efeito tóxico sobre as leveduras, pois se infiltram nas estruturas de suas membranas afetando sua permeabilidade e causando extravasamento de material intracelular.<sup>70</sup>

A acidez em excesso causa perda da qualidade, pois confere a bebida um sabor indesejável e “agressivo”.<sup>71</sup> Por outro lado, Lima (1964)<sup>72</sup> afirma que a presença de ácidos em pequena quantidade é muito importante para a qualidade da bebida, já que reagem com os álcoois do meio, aumentando a formação de ésteres, substâncias responsáveis pelo aroma de bebidas destiladas.

#### - Ácido succínico

O ácido succínico é quantitativamente o principal ácido formado pela levedura. Seus teores finais na fermentação variam de 0,2 a 1,7 g.L<sup>-1</sup><sup>73</sup> e dependem de vários fatores, como linhagens de leveduras e condições ambientais, sendo que a maior parte é formada nas duas primeiras horas de fermentação.<sup>63</sup>

As razões fisiológicas que levam a levedura a produzir e excretar o ácido succínico (segundo produto orgânico secundário mais abundante) ainda são discutíveis; admite-se que sua formação se deve a um meio fermentativo inadequado, pois não há evidências da necessidade metabólica desse ácido pela levedura, na proporção em que é produzido. Entretanto, parece que sua formação e excreção conferem às leveduras maior competitividade em relação às bactérias contaminantes numa fermentação industrial. O ácido succínico em ação sinérgica como o etanol, exerceria uma intensa atividade antibacteriana, o que é notado durante uma fermentação alcoólica.<sup>46</sup>

#### - Ácido acético

O ácido acético é o principal ácido volátil produzido durante a fermentação. Embora sua presença em alguns casos deva-se a atividade bacteriana, bactérias lácticas e acéticas. Ainda assim, o ácido acético é encontrado em teores geralmente menores que o ácido succínico. Os teores finais de ácido acético dependem das condições ambientais e da levedura utilizada.<sup>63</sup>

Segundo Pampulha (1989)<sup>74</sup> embora o ácido acético seja fonte de carbono para a levedura, principalmente em aerobiose, precursor de acetil-CoA para o Ciclo de Krebs, bem como para a biossíntese de lipídios e gluconeogênese, durante a fermentação ele pode encontrar-se em concentrações suficientes para exercer seu efeito tóxico. Este é tão maior quanto menor o pH, notadamente quando inferior ao seu pKa e exibe um efeito sinérgico

com o etanol na inibição da fermentação acelerando a morte térmica, sendo trinta vezes mais tóxico que o etanol em altas temperaturas.

O ácido acético, à semelhança de outros ácidos orgânicos fracos, perturba a homeostase de células microbianas, por penetrar na forma não-dissociada e dissociar-se no citoplasma, promovendo um abaixamento do pH, com o acúmulo do ânion acetato. A acidificação intracelular reduz o pH, afetando a força protomotriz para os sistemas de transporte, e é uma das causas, conjuntamente com a ação do ânion acetato sobre as enzimas glicolíticas, da ação inibitória do ácido acético sobre a fermentação. A presença do ácido acético, seja oriundo da levedura, das bactérias contaminantes ou adicionado ao meio, torna-se indesejada, mesmo que um aumento na produção de etanol com redução do crescimento seja verificado, pois esse aumento pode ser estequiometricamente relacionado com o acetato utilizado, que por sua vez provoca distúrbios na célula que lhe causam estresse, avaliado pela redução do teor de trealose.<sup>74</sup>

### **Aldeídos**

O acetaldeído, principal aldeído da fermentação, e os outros aldeídos são produzidos pelas leveduras principalmente durante os primeiros estágios da fermentação alcoólica, diminuindo sua presença gradativamente até o estágio final, pela oxidação a ácido acético.<sup>75</sup>

Os aldeídos com até oito átomos de carbono têm aroma penetrante e enjoativo, considerados indesejáveis em bebidas destiladas. Os aldeídos maiores, com mais de dez átomos de carbono, apresentam aroma agradável.<sup>76</sup>

A presença de oxigênio favorece a formação de outros aldeídos, provenientes da oxidação de álcoois superiores que por sua vez são gerados pela degradação parcial de aminoácidos.<sup>70</sup>

Aldeídos como o furfural e o hidroximetilfurfural também aparecem na cachaça, mas sua presença não está associada ao processo de fermentação. Condições de colheita, como a queima da cana, destilação quando ainda existem açúcares residuais e/ou resíduos de bagacilho de cana e envelhecimento, que dependo muito do tipo de madeira, são elementos favoráveis à formação de furfural e hidroximetilfurfural.<sup>70</sup>

O furfural é formado, principalmente, pela pirogênese da matéria orgânica depositada no fundo dos alambiques. A sua formação é evitada pela destilação do vinho limpo, livre de substâncias orgânicas em suspensão. Nas cachaças envelhecidas, o furfural pode ser oriundo da ação de ácidos sobre as pentoses e seus polímeros, como a hemicelulose.<sup>77,51</sup>

Segundo Maia e Campelo (2005)<sup>70</sup> quando ocorre a aeração do mosto durante o processo de fermentação, ocorre também um aumento na formação de aldeídos, sendo essencial não aerar o mosto nas primeiras horas do processo de fermentação. Durante o processo de destilação, os aldeídos se concentram na porção cabeça do destilado. Micro-aerações durante algumas horas por dia ao longo do período de armazenamento podem diminuir o teor de aldeídos da cachaça

Os aldeídos oxidam-se com facilidade, convertendo-se nos ácidos correspondentes, como por exemplo, o acetaldeído, que se converte em ácido acético. Os aldeídos fenólicos, provenientes da madeira dos barris e tonéis, convertem-se nos ácidos fenólicos correspondentes e posteriormente ocorre esterificação destes com o etanol, requerendo para tal, um período que varia de 1 a 2 anos.<sup>70</sup>

### **Álcoois superiores**

Álcoois superiores, com três a cinco átomos de carbono, apresentam odores característicos (“bouquet”), tradicionalmente associados à bebidas destiladas. Acima disso, os álcoois tornam-se oleosos e alguns lembram fortemente o aroma de flores. Os álcoois de 4 e 5 átomos de carbono são formados pela degradação do açúcar dentro das leveduras, e em parte pela degradação de aminoácidos<sup>76</sup> e em teor elevado desvaloriza a cachaça<sup>51</sup>. Do ponto de vista quantitativo, a formação de álcoois superiores depende acentuadamente da cepa empregada, assim como da ocorrência de micro-organismos contaminantes. A formação desses álcoois é maior quando a fermentação é mais demorada devido à atividade fraca do fermento.<sup>76</sup>

A capacidade de produção de álcoois superiores é característica individual, sendo diferentes entre as linhagens de levedura.<sup>78</sup>

A aeração do mosto durante o processo de fermentação pode favorecer a formação dos álcoois superiores, em especialmente o isoamílico, formado por cinco átomos de

carbonos. Outro fator que também pode gerar um aumento na produção desses álcoois é a alta temperatura durante a fermentação. O pH do mosto também influencia o aumento dos álcoois superiores, pois mostos com pHs na faixa de 3,0 a 3,5 podem ter um aumento na formação de álcoois superiores em até 80 %, em relação a mostos com o pH entre 4,0 a 5,0.<sup>70</sup>

### **Ésteres**

O acetato de etila, principal éster encontrado na cachaça, é obtido pela reação entre etanol e ácido acético, provenientes do processo de fermentação.<sup>75,79</sup> Durante a fermentação o desenvolvimento de um aroma agradável, que lembra frutas maduras, está relacionado à formação desse éster, porém, em grandes quantidades, confere à cachaça um sabor enjoativo e indesejado.<sup>76,80</sup>

Da mesma forma, outros álcoois reagem, em parte, com o ácido acético resultando em diferentes ésteres. Reações de esterificação ocorrem também durante o envelhecimento da cachaça, conferindo à bebida um aroma típico, agradável e pungente suave, contribuindo muito para a formação de seu buquê, mas em uma velocidade muito menor.<sup>51,81</sup>

A proporção de ésteres no mosto fermentado varia acentuadamente de uma região para outra, sendo um dos itens mais importantes para a identificação da origem da cachaça, já que diferentes cepas de leveduras produzem proporções de ésteres bem variadas. A proporção de ésteres gerada durante o processo de fermentação é fortemente influenciada por micronutrientes do solo que são incorporados à cana (como o zinco), pois esses atuam como cofatores enzimáticos na reação intracelular de esterificação.<sup>70</sup> Aproximadamente 80 % da quantidade de ésteres presentes no mosto é representado pelo acetato de etila, podendo sua formação ser estimulada através do resfriamento do mosto, logo após o término da fermentação.<sup>76</sup>

### **Metanol**

O metanol é um álcool tóxico originado pela degradação da pectina, um polissacarídeo presente na cana-de-açúcar. A molécula de pectina é um polímero, formado pela associação de centenas de moléculas de ácido galacturônico, que possuem fragmentos

de moléculas de metanol, as quais são liberadas durante o processo de fermentação, através das reações de hidrólise ácida ou enzimática.<sup>76</sup>

No organismo humano o metanol é oxidado a ácido fórmico e posteriormente a gás carbônico, provocando acidose grave afetando o sistema respiratório, podendo levar ao coma e até mesmo à morte (MAIA, 1994). A ingestão de metanol, mesmo em quantidades reduzidas, durante períodos freqüentes de consumo da bebida, pode ocasionar cegueira e morte.<sup>80</sup>

### **Carbamato de etila**

O carbamato de etila ou uretana é o éster etílico do ácido carbâmico, apresenta ponto de ebulição de 185 °C e é muito solúvel em água e álcool.<sup>82</sup>

Segundo Labanca; Glória; Afonso (2008)<sup>83</sup> estudos apontaram o composto como carcinogênico em diversas espécies animais, incluindo ratos, camundongos, hamsters e macacos. Segundo Beland et al. (2005)<sup>84</sup> em testes de toxicidade realizados em ratos o carbamato de etila causou um aumento dose-dependente de carcinomas no fígado, pulmões, pele e estômago e de tumores do ovário e da glândula mamária.

Em 1987, a Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) classificou o carbamato de etila como um possível agente cancerígeno, devendo sua concentração em alimentos ser a menor possível.<sup>83</sup> No Brasil a regulamentação da presença de carbamato de etila em aguardentes foi dada pela Instrução Normativa Nº 13 de 20 de junho de 2005, que estabeleceu o limite máximo de 150  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , e que entrou em vigor a partir de junho de 2010.<sup>85</sup>

Em bebidas destiladas o carbamato de etila pode ser formado antes, durante ou após a destilação, através da reação do etanol com compostos nitrogenados. O mosto fermentado quando aquecido aumenta seu teor de carbamato, que é dependente de fatores como temperatura, pH, luz e tempo de armazenagem.<sup>82</sup>

O mecanismo de formação de carbamato de etila em bebidas alcoólicas ainda não é bem compreendido. Nos vinhos a uréia, o carbamilsfosfato, a arginina e a citrulina são os precursores, formados durante a fermentação, que podem reagir com o etanol em meio ácido, formando o carbamato de etila, sendo a reação favorecida pelo aumento da concentração dos reagentes, do tempo e da temperatura.<sup>86</sup>

Um dos principais mecanismos de formação do carbamato de etila em bebidas destiladas é o íon cianeto, que na presença do cobre se oxida, formando um complexo que pode dar origem ao carbamato.<sup>87</sup>

## **2.2- Fatores que afetam a fermentação**

Diversos fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos e microbiológicos afetam o rendimento das fermentações, ou seja, a eficiência da conversão de açúcar em etanol. Geralmente as quedas na eficiência fermentativa decorrem de uma alteração na estequiometria do processo, levando à maior formação de produtos secundários e biomassa.<sup>46</sup>

### **2.2.1- Agentes da Fermentação**

As leveduras são os micro-organismos responsáveis pela fermentação alcoólica, ou seja, pela transformação de açúcares presentes no mosto em etanol e dióxido de carbono, como produtos principais desta transformação.<sup>88</sup>

A seleção de micro-organismos é de vital importância para a qualidade e a quantidade de metabólitos primários como etanol e dióxido de carbono que deverão ser obtidos no final da fermentação, pois trata-se de um processo químico decorrente da atividade de micro-organismos que agem sobre diversos substratos orgânicos, alterando-o e originando a formação de outras substâncias.<sup>89</sup>

As leveduras alcoólicas devem apresentar características específicas para o seu uso industrial, entre as quais, boa produtividade, tolerância ao álcool, osmotolerância, resistência à acidez elevada e às variações de temperatura, fácil propagação, capacidade de utilizar diversos substratos, resistência a resíduos tóxicos, mínima geração de calor durante a fermentação.<sup>90</sup>

As leveduras mais comumente utilizadas para produção de aguardente são fermento prensado de padaria, *Saccharomyces cerevisiae* e *S. uvarum*, podendo ser também encontradas outras linhagens de *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*.<sup>69</sup>

As fermentações se iniciam com uma determinada levedura, as culturas puras são isoladas ou obtidas através de melhoramento genético. Como o tempo, as linhagens que iniciam o processo são substituídas por leveduras comuns a região da destilaria,

denominadas leveduras selvagens. Isso mostra que fermentos ditos “caipiras” usados pelos pequenos fabricantes regionais de aguardente, podem ser considerados bons inóculos, pois são desenvolvidos com leveduras regionais. No entanto, tais leveduras “selvagens” se mostram com as mais variadas habilidades fermentativas, podendo muitas vezes, acarretar problemas na fermentação.<sup>46</sup>

A atividade de invertase é diferente entre diferentes linhagens e aumenta durante a fermentação, mas independe da viabilidade celular. A atividade de invertase das células, assim como a temperatura ótima para crescimento e a velocidade de formação do etanol são dependentes da composição do meio e do tipo de linhagem utilizada.<sup>91</sup>

O efeito do pH (de 4,0 a 5,0), temperatura (de 30 a 40 °C) e concentração do oxigênio dissolvido (DO) (de 0,2 a 60 mg O<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>) na formação de glicose 6-fosfato desidrogenase e invertase por *S. cerevisiae* foram estudados por Abrahão-Neto et al. (1997)<sup>92</sup>. As melhores condições de cultura para a formação destes compostos foram: 2,55 L de meio de cultura (3,0 g·L<sup>-1</sup> de extrato de levedura; 5,0 g·L<sup>-1</sup> de peptona; 2,0 g·L<sup>-1</sup> de glicose; 15,0 g·L<sup>-1</sup> de sacarose; 2,4 g·L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O; 5,1 g·L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,075 g·L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O); 0,45 L de inóculo (0,70 g de célula seca·L<sup>-1</sup>); pH = 4,5; T= 35 °C e DO = 4 mg·L<sup>-1</sup>. Quanto a atividade de invertase eles concluíram que esta decresceu em todas as células no mínimo 50 % em valores extremos de DO (2.0 a 6.0 mg O<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>) e pH (4,0 a 5,0). Além disso, a atividade de invertase oscilou durante a fermentação devido ao mecanismo de repressão /desrepressão da glicose.

O etanol exerce um efeito estressante sobre a levedura, sendo esse efeito mais pronunciado quando combinado com um choque térmico.<sup>93</sup>

O etanol produzido na fermentação pode reduzir a multiplicação e a viabilidade da levedura. O mecanismo de inibição é complexo e muitos mecanismos são propostos, sendo que incluem a desnaturação e inibição de enzimas e danos na membrana plasmática alterando a sua permeabilidade. Fosfolípidios presentes na membrana plasmática desempenham um importante papel no mecanismo de tolerância ao etanol. Acréscimos de ácidos graxos insaturados, além disso, fatores como o acúmulo de etanol intracelular, temperatura e pressão osmótica influem sobre a tolerância ao etanol.<sup>94</sup>

O principal indicador de estresse na levedura é a viabilidade celular, sendo que a influência da viabilidade celular sobre a contaminação bacteriana é estudada e os principais

fatores envolvidos são a concentração de etanol, a competitividade pelo substrato, a atividade de invertase, o estímulo promovido pela autólise de células e excreção de nutrientes.<sup>95</sup> Em algumas situações a presença de leveduras favorece o desenvolvimento bacteriano, em outros casos a fermentação é considerada um ótimo inibidor da multiplicação bacteriana, seja pela presença do etanol, ácidos orgânicos ou pela rápida assimilação do substrato.<sup>96</sup>

### 2.2.2- Exigências nutricionais

As leveduras, organismos saprófitos, exigem uma fonte de carbono elaborada (glicose ou outro açúcar) que forneça a energia química e o esqueleto carbônico de suas estruturas celulares, constituídas predominantemente de carbono, oxigênio e hidrogênio. Algumas vitaminas, como tiamina e ácido pantotênico, também são exigidas. O meio deve, igualmente, fornecer nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto, iodo e outros elementos em quantidades diminutas.<sup>46</sup>

O conteúdo de nitrogênio nas leveduras pode chegar a 10% da matéria seca, o qual representa um importante constituinte para qualquer meio de crescimento.<sup>16</sup>

A concentração mínima de nitrogênio que satisfaça o requerimento da levedura é ditada pela amplitude de crescimento que permite uma fermentação satisfatória, e em uma fermentação o teor de nitrogênio é crítico para uma rápida e completa utilização do açúcar.<sup>97</sup> Em meios com alta concentração de substrato, a exigência é maior, provavelmente porque o etanol formado interfere na absorção de amônio e aminoácidos inibindo os sistemas de transporte das membranas.<sup>98</sup>

*Saccharomyces cerevisiae* é capaz de utilizar uma ampla gama de compostos nitrogenados, tais como aminoácidos, bases nitrogenadas, uréia e amônio, empregando vários sistemas de transporte para cada fonte nitrogenada. A absorção de amônio ocorre com gasto de energia e relaciona-se com o efluxo de prótons, acidificando o meio. Para a uréia, há dois sistemas de transporte, de alta afinidade, dependente de energia, capaz de concentrar uréia internamente até 200 vezes mais que o meio, e difusão facilitada, quando o meio possui altos teores de uréia. Quanto à absorção dos aminoácidos existe a denominada permease geral de aminoácidos.<sup>53</sup> Porém as leveduras não têm habilidade metabólica para

aproveitar o nitrato e pouquíssima ou nenhuma capacidade de utilizar as proteínas do meio.<sup>46</sup>

A maioria dos sistemas metabólicos de assimilação do nitrogênio gera amônia, que por intermédio da enzima desidrogenase glutâmica NADP- dependente, é incorporada ao glutamato, o qual é o principal doador de nitrogênio para o metabolismo biossintético. A levedura possui urease, gerando amônia a partir da carboxilação de uréia formando ácido alofânico que é hidrolisado a amônio e gás carbônico pela hidrolase.<sup>99</sup>

Os níveis intracelulares de nitrogênio são muito importantes para a manutenção do equilíbrio metabólico, de forma que a limitação de nitrogênio faz com que os níveis de AMPc baixem, refletindo no acúmulo dos carboidratos de reserva.<sup>47</sup>

O excesso de nitrogênio assimilável, ou seja, concentração acima dos níveis recomendados demonstrou ser favorável às fermentações com altas concentrações de açúcar, permitindo maior produção de etanol e material celular (parcialmente devido ao aumento do teor protéico) sem, no entanto favorecer o aumento no número de células, nem a viabilidade celular. A menor produção de etanol apresentada pelo meio não suplementado foi explicada pelo desvio do açúcar para a produção de glicogênio, acetaldeído e glicerol, assim o carbono a partir da glicose foi divergido para um número de componentes celulares, via passagens alternativas do metabolismo. A síntese de ácidos orgânicos também é diretamente afetada pelos teores, bem como pelas diferentes formas nitrogenadas fornecidas ao meio fermentativo.<sup>97</sup>

As leveduras geralmente podem sintetizar todos os aminoácidos e bases nitrogenadas necessárias para seu crescimento celular à partir do íon amônio. O crescimento é acelerado quando estão disponíveis no meio de crescimento “unidades de construção”, como aminoácidos, para a síntese de enzimas celulares e componentes estruturais.<sup>100</sup> No entanto, a utilização de sulfato de amônio como fonte nitrogenada resulta em maior acidez do meio, que embora possa favorecer o controle da contaminação bacteriana (e conseqüente redução da formação de ácidos láctico e acético), causa estresse à levedura, diminuindo a viabilidade e multiplicação.<sup>101</sup>

Pode-se usar suplementação com amônio ou sais de amônio, porém o crescimento é mais rápido quando se usa nitrogênio orgânico.<sup>54</sup> A produção específica de células de

levedura aumenta linearmente com o aumento do nitrogênio protéico no meio de fermentação sintético.<sup>11</sup>

A reprodução de *S. cerevisiae* varia em função do nível de nutrientes encontrados na matéria-prima, e dentre estes o nitrogênio é o que apresenta uma resposta mais significativa. A levedura não assimila instantaneamente o nitrogênio quando adicionado na forma de uréia (46 % de N) ou sulfato de amônio (21 % de N).<sup>102</sup>

Visando verificar a influência da adição de nitrogênio protéico na fermentação alcoólica de caldo de cana-de-açúcar para produção de cachaça, Jerônimo (2004)<sup>103</sup> testou o uso de três diferentes fontes de nitrogênio protéico, dentre elas, um isolado protéico de soja (denominado comercialmente de SUPRO 780 – Bunge Alimentos), obtendo uma boa multiplicação e viabilidade da levedura, propiciando assim, melhor qualidade no fermento reciclado. Neste experimento, a viabilidade manteve-se elevada até o final do experimento (6 ciclos), e a massa celular produzida também. Segundo esta autora, o nitrogênio protéico original do caldo de cana-de-açúcar foi praticamente todo consumido, o que significa estar em forma assimilável pela levedura. Do ponto de vista nutricional da levedura, os resultados deste trabalho mostram que o N protéico presente no caldo é insuficiente para suprir a nutrição da levedura em fermentação.

As leveduras exigem diversos íons inorgânicos em concentrações tanto micro como milimolar para manifestarem ótimos crescimento e rendimento fermentativo. Deficiências ou concentrações elevadas de tais minerais, ou seja, um desequilíbrio entre os nutrientes minerais provocam alterações metabólicas significativas.<sup>57</sup>

Microelementos têm uma função importante no metabolismo celular, principalmente devido aos seus requerimentos como cofatores para várias enzimas. Aparentemente, íons metálicos são vitais para todos os organismos, e desta forma, transportadores destes íons têm um papel crucial na manutenção da homeostase. Todavia, quantidades excessivas destes mesmos íons são tóxicas e podem causar danos às funções às quais se prestam.<sup>104</sup> As funções destes íons são divididas em duas: enzimática e estrutural. Na função enzimática, alguns íons atuam como o centro catalítico de uma enzima, como um ativador ou estabilizador da função enzimática, ou mantêm controle fisiológico por antagonismo entre ativadores e desativadores. Dentre estes,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  são comumente centros catalíticos. A função estrutural é desempenhada pelos íons que agem

neutralizando forças eletrostáticas presentes nas muitas unidades celulares aniônicas. Na maioria das vezes,  $K^+$  e  $Mg^{2+}$  são encontrados em polifosfatos, RNA, DNA e proteínas.<sup>105</sup> A adição de sais minerais é vantajosa para corrigir deficiências que o caldo-de-cana normalmente apresenta. De um modo geral, a adição não é feita em todo o volume do mosto, mas nos “pés de cuba”, ou periodicamente, nas dornas de fermentação.<sup>46</sup>

A composição elementar de uma célula microbiana depende de muitos fatores, como condições de cultivo, espécie do micro-organismo, e até mesmo do substrato utilizado para seu crescimento. Zinco, cobre e manganês são muito interessantes devido ao efeito positivo na atividade respiratória e na taxa de crescimento de *S. cerevisiae*.<sup>106</sup>

Fósforo, potássio, enxofre e magnésio são os minerais mais encontrados na composição de micro-organismos, estes e outros elementos presentes em quantidades significativas devem ser suplementados ao meio de cultura.<sup>54</sup>

Os constituintes inorgânicos de leveduras, segundo os autores Aiba et al. (1973)<sup>54</sup> e Reed e Nagodawithana (1991)<sup>107</sup> estão presentes na Tabela 2.

Tabela 2- Constituintes inorgânicos das leveduras

<b>Elementos (g 100g<sup>-1</sup> peso seco)</b>	<b>Aiba et al. (1973)</b>	<b>Reed e Nagodawithana (1991)</b>
Fósforo	0,8 – 2,6	1,35
Enxofre	0,01 – 0,24	0,39
Potássio	1,0 – 4,0	2,1
Magnésio	0,1 – 0,5	0,165
Sódio	0,01 – 0,1	0,012
Cálcio	0,1 – 0,3	0,075
Ferro	0,01 – 0,5	0,002
Zinco	0,017	-
Cobre	0,002 – 0,01	0,0008
Manganês	0,0005 – 0,007	0,000002
Molibdênio	0,0001 – 0,0002	0,00004
Total de Minerais	5 - 10	

## **Zinco**

O zinco, na sua forma biologicamente mais relevante (íons  $Zn^{2+}$ ) é essencial como cofator catalítico em várias enzimas, inclusive álcool desidrogenase, fosfatase alcalina, anidrase carbônica e várias carboxipeptidases, não sendo substituído por nenhum outro íon em suas funções.<sup>105</sup> Tem sido apontado que a presença de íons  $Zn^{2+}$  em quantidades de 5-

15  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  no meio nutriente otimizam o fator de crescimento de células de levedura, assim como a produção de etanol. De forma oposta, sua deficiência paralisa o crescimento celular e atividade fermentativa. Todavia, altas concentrações de zinco no meio de crescimento podem ser tóxicas, uma vez que o zinco afeta a permeabilidade das membranas ao potássio, causando um efeito antagonista no crescimento e fermentação.<sup>106</sup>

## Cobre

O cobre é um cátion divalente vital para células de leveduras, agindo como cofator de algumas enzimas como citocromo c-oxidase, lactase e Cu-Zn superóxido dismutase (STEHLIK-TOMAS et al., 2004). A concentração ótima no meio nutritivo para crescimento da levedura e atividade fermentativa está na faixa de 1-10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . A concentração de 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pode inibir o crescimento, estando a concentração ótima entre 1-1,5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .<sup>105</sup>

O cobre é um dos metais indesejáveis na cachaça e seu limite permitido é de 5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .<sup>85</sup> Sua presença na bebida provém do material tradicionalmente utilizado na construção dos alambiques. A legislação de alguns países do hemisfério norte estabelece um limite inferior a 2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) nos destilados alcoólicos, dificultando a exportação da cachaça para esses países.

A aguardente produzida em alambique de cobre apresenta melhor qualidade sensorial quando comparada à produção em alambique confeccionado com outros materiais, como aço inox, alumínio e porcelana. A utilização de equipamentos de cobre nos alambiques é favorável por reduzir a acidez e os níveis de aldeídos e compostos sulfurosos, os quais conferem à bebida, sabor e odores indesejáveis, porém, o cobre pode contaminar o produto quando o manejo da produção for inadequado.<sup>108</sup>

A presença de elevadas concentrações de cobre na aguardente é indesejável, pois é prejudicial à saúde humana. A mais conhecida enfermidade decorrente do acúmulo de cobre nos tecidos é a doença de Wilson, que é um transtorno congênito que se transmite por herança autossômica recessiva, associada a um defeito no transporte de cobre, com diminuição de ceruloplasmina, provocando um acúmulo patológico de cobre, principalmente no fígado e cérebro. O cobre também está associado a doenças neurodegenerativas, como a esclerose e as doenças de Menkes e de Alzheimer.<sup>109</sup>

Além do efeito adverso direto à saúde humana, estudos têm indicado que o cobre está associado à formação de carbamato de etila, em aguardente. O principal precursor do carbamato de etila em bebidas destiladas é o íon cianeto, sendo o cobre um dos fatores que afetam a formação. A complexação do Cu II com cianato, formado pela oxidação do cianeto, torna-o mais susceptível ao ataque nucleofílico do etanol, formando o carbamato de etila.<sup>87</sup>

Assim sendo, os teores de cobre devem ser minimizados na aguardente de cana para prevenir a formação destas substâncias e conseqüentes danos à saúde humana.

### **Manganês**

Células de levedura requerem manganês como um elemento traço essencial a uma concentração de 2-10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  para otimizar o crescimento. O manganês tem uma função importante no metabolismo de *S. cerevisiae* como parte de algumas enzimas, por exemplo, piruvato descarboxilase. O manganês na concentração de 7  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  estimula os efeitos do zinco.<sup>106</sup>

Stehlik-Tomas et al. (2004)<sup>104</sup> conduziram um experimento visando estudar a incorporação de alguns microelementos a células de *S. cerevisiae* e o impacto no estado fisiológico das células. A adição de 0,1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de cada um dos sais  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$  e  $\text{MnSO}_4$  aumentou o rendimento em biomassa celular em 30 % em condições semiaeróbias. Em condições de anaerobiose, o rendimento de biomassa aumentou 10 %, e a produção de álcool aumentou 20 %.

### **Ferro**

A presença de ferro na concentração de 1 a 3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  parece ser a concentração ótima para o crescimento. Apenas pequenas concentrações deste íon são requeridas na função de heme de enzimas. Apesar disso, segundo estes autores, não tem sido reportados efeitos sobre o rendimento em etanol.<sup>105</sup> Bach et al. (1978)<sup>110</sup> utilizaram 0,01g de  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  em 100 mL em meio de cultivo aeróbio de *S. cerevisiae*. Oura (1974)<sup>111</sup> utilizou 0,03 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  em 100 mL em cultivos em batelada alimentada desta mesma levedura, ambos obtiveram resultados em rendimento acima de 0,5.

## **Potássio**

O potássio foi considerado elemento traço baseando-se no seu requerimento pela célula e seu nível adequado a fermentação está em torno de  $390 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .<sup>112</sup> Amorim (1985)<sup>113</sup> considerou nível superior, em torno de  $700$  a  $1200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Na prática, a levedura encontra-se exposta a concentrações de  $\text{K}^+$  que podem atingir  $600 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  nos meios fermentativos a base de melaço. Em tais concentrações, a levedura pode ser considerada tolerante a salinidade, se mantiver o seu metabolismo ativo e boa viabilidade.<sup>114</sup>

A absorção de  $\text{K}^+$  é um dos fatores do qual decorre a acidificação do meio extracelular durante a fermentação.<sup>115</sup> Esse transporte é permitido pela diferença de potencial eletroquímico que é gerada pela extrusão de  $\text{H}^+$  com hidrólise do ATP, mediada pelo  $\text{H}^+$  ATPase da membrana plasmática.<sup>116</sup>

O transporte de  $\text{K}^+$  é possibilitado numa ampla faixa de concentrações do íon, por constituir-se de um sistema duplo: em baixas concentrações de  $\text{K}^+$  funciona com alta afinidade e em altas concentrações de  $\text{K}^+$  com baixa afinidade (RODRIGUES-NAVARRO e RAMOS, 1984).

A célula retém o  $\text{K}^+$  e o acumula, mas com a exaustão da glicose, este passa a ser excretado.<sup>117</sup> Com todas essas oscilações nos seus teores, a levedura finaliza uma fermentação com teor de  $\text{K}^+$  entre  $1,5$  e  $3,0 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ .<sup>114</sup>

## **Enxofre**

A sulfitação ao caldo-de-cana como clarificante resulta em melaços com teores que podem atingir  $700 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , fornecendo mostos com até  $175 \text{ mg SO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ . O mosto sulfitado pode comprometer seriamente o desenvolvimento da fermentação alcoólica, devido a sua ação no metabolismo da levedura. O comprometimento do metabolismo afeta o equipamento enzimático da levedura responsável pela conversão do açúcar em etanol. Este fato é de real importância na produção de etanol onde é visada uma máxima eficiência fermentativa a qualquer distúrbio a esse nível reflete em quedas drásticas de produtividade.<sup>118</sup>

O dióxido de enxofre é muito reativo e seu efeito tóxico é severamente dependente de pH devido a presença de duas constantes de dissociação. Entre os valores de pH de  $5,0$  e

9,0, há uma mistura de formas de bissulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ) e sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) sendo  $\text{P}k_2= 6,91$ . Já em valores mais baixos de pH coexistem as formas de bissulfito e dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ) com  $\text{P}k_1= 1,81$ . O  $\text{SO}_2$  é altamente reativo e combina-se com  $\text{O}_2$  formando sulfato, sem efeito tóxico.<sup>119</sup>

Considerando que na fermentação alcoólica o pH inicial é baixo, na ausência de oxigênio, parte significativa do sulfito encontra-se na sua forma mais tóxica, o  $\text{SO}_2$ . Embora transportado seletivamente para o interior da célula na forma de  $\text{SO}_2$ , os efeitos a nível metabólico são descritos como bissulfito ou sulfito, uma vez que o pH intracelular encontra-se ao redor de 6,0.<sup>119</sup>

A formação de compostos voláteis durante a fermentação é afetada pelo sulfito, alterando a composição característica de vinhos não sulfitados.<sup>118</sup>

O efeito extremado do sulfito sobre a célula é a própria morte celular observada por vários autores, seja pela queda de viabilidade, seja pela perda da capacidade de formar colônias em meio YEPD.<sup>120</sup>

O efeito letal é devido primariamente a ação do dióxido de enxofre, que em valores de pH mais baixos se ligaria a sítios receptores da superfície da membrana, possibilitando o desencadeamento dos distúrbios intracelulares que acarretariam a morte celular.<sup>119</sup>

### 2.2.3- Temperatura

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes, que influencia todas as atividades dos micro-organismos.<sup>121</sup> As leveduras crescem melhor em temperaturas próximas a ambiente, sendo a temperatura ótima para a produção de etanol na faixa de 26-35 °C.<sup>46</sup>

Segundo JONES et al. (1981)<sup>16</sup> a temperatura ótima para a fermentação é de 5 a 10 °C acima do ótimo para crescimento, que segundo Watson (1987)<sup>121</sup> encontra-se na faixa de 25 a 30 °C.

A utilização de temperaturas mais elevadas reduz o tempo de fermentação, porém a taxa de morte celular aumenta. Isto ocorre porque a sensibilidade da levedura ao etanol aumenta como o aumento de temperatura. Como não há acúmulo de etanol na célula, o efeito inibitório torna-se significativo.<sup>122</sup>

O aumento de temperatura induz uma queda nos teores de proteína da célula e dos ácidos nucleicos.<sup>123</sup>

Uma exposição rápida das leveduras a altas temperaturas (choque térmico) sob condições específicas, induz a síntese de substâncias relacionadas à termotolerância, nomeadamente a trealose (HOTTINGER et al., 1987)<sup>41</sup> e as proteínas do choque térmico (WINKLER et al., 1991)<sup>124</sup>, embora a termotolerância não requeira necessariamente dessas substâncias.<sup>121</sup>

De uma maneira geral, o aumento da temperatura aumenta a excreção dos ácidos pirúvicos e succínico sem quase afetar o acético, mesmo quando a temperatura oscila ao redor de 40 °C.<sup>125</sup>

#### 2.2.4- pH

A concentração hidrogeniônica é um fator significativo para as fermentações devido a sua importância no crescimento da levedura, taxa de fermentação e formação de subprodutos. As principais contaminantes são as bactérias formadoras do ácido láctico e seu desenvolvimento é severamente reprimido a valores de pH abaixo de 5. Os valores de pH dos meios fermentativos geralmente encontram na faixa de 4,5 a 5,0 com uma boa capacidade tamponante, mas algumas leveduras mantêm sua homeostase de forma quase independente dos valores de pH do meio, bem como da sua capacidade tamponante.<sup>16</sup>

A acidificação celular é induzida pela presença de glicose, que é revertida pela capacidade que a levedura tem em expulsar os íons hidrogênio para o meio, mediada pela H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática, que gera um potencial eletroquímico (CALACHORRA et al., 1987)<sup>116</sup> permitindo a absorção de K<sup>+</sup> e alcaliniza o meio intracelular.<sup>126</sup>

O pH é mantido pela atuação conjunta das ATPases da membrana plasmática, vacuolar e mitocondrial. A H<sup>+</sup>-ATPase sofre mudanças na sua conformação, desencadeada por H<sup>+</sup>, que permite sua atividade otimizada na faixa de pH externo ao redor de 6,0, muito embora o pH externo abaixo de 4,0 triplique a atividade da ATPase, dobrando sua afinidade pelo ATP, sem contudo alterar seu pH ótimo.<sup>127</sup>

Além da ativação da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática expelindo prótons a levedura possui outros mecanismos de acidificação do meio externo durante a fermentação

iniciada a um pH em torno de 4,5-5,0; são eles, a liberação de gás carbônico, a absorção do  $K^+$  e a excreção de ácidos orgânicos.<sup>115</sup>

A excreção de ácidos orgânicos, bem como a absorção de aminoácidos básicos tem um efeito substancial na acidificação externa. A excreção do piruvato é máxima nos valores de pH entre 4,5-5,0.<sup>125</sup>

Fermentações conduzidas em meios mais ácidos resultam em maiores rendimentos em etanol, pelo fato de restringir o crescimento do fermento, com conseqüente redução da produção de glicerol, ao mesmo tempo em que reduz a contaminação bacteriana. Entretanto, fermentações alcoólicas se desenvolvem bem em faixas de pH mais altos, em substratos de alto poder tampão, como os melaços, em pH 5,8-5,9. Os caldos de cana fermentam sem correção da acidez, em pH natural que varia de 5,2-6,8.<sup>46</sup>

#### 2.2.5 - Inibidores de Fermentação

O processo fermentativo pode ser inibido por seus próprios produtos, como o etanol, ou por diferentes substâncias presentes nos mostos.

A quantidade máxima de etanol que pode ser produzida no decurso de uma fermentação varia de acordo com a levedura utilizada. Isto se deve, em parte, a uma maior ou menor resistência ao etanol pelas leveduras.<sup>128</sup>

A despeito de ser o metabólito excretado em maior quantidade pela levedura durante a fermentação, e passível de se tornar um substrato em aerobiose, o etanol mostra-se tóxico a levedura ocasionando queda na viabilidade.<sup>129</sup>

Sabe-se que o etanol é mais tóxico quando gerado endogenamente do que quando adicionado ao meio, fator importante sobre a inibição/desnaturação das enzimas glicolíticas, caso ele se acumulasse na célula.<sup>130</sup> Entretanto, após muitas controvérsias, parece haver um consenso que o etanol não se acumule intracelularmente.<sup>131</sup>

O sítio de ação do etanol é nas membranas lipoprotéicas, onde se aloja no interior hidrofóbico acarretando um enrijecimento<sup>132</sup> e conseqüentemente afetando vários sistemas de transporte.<sup>133</sup>

O etanol diminui também a seletividade da membrana plasmática, permitindo efluxo de constituintes celulares<sup>134</sup> bem como o influxo passivo de prótons, diminuindo o potencial de membrana e, portanto, afetando todos os sistemas que requeiram força

protomotiva.<sup>98</sup> Isto acaba por induzir deficiências nutricionais que exarcebam a toxidez do etanol, somando-se o fato de que as leveduras em anaerobiose tem a integridade de suas membranas comprometidas por deficiências na síntese de ácidos graxos insaturados e ergosterol.<sup>135</sup>

Outros fatores também contribuem para o aumento da toxidez do etanol, nomeadamente a temperatura e a síntese de subprodutos tóxicos, como, por exemplo, acetaldeído, glicerol, ácidos fórmico, acético e láctico e ácidos graxos.<sup>136</sup>

Basso et al. (1997)<sup>137</sup> pesquisaram o uso de ácido benzóico em unidades industriais produtoras de álcool e observaram que a ação inibidora da fermentação foi exercida não apenas pela acidificação do meio causada pelo ácido orgânico excretado para o meio, mas pelo próprio ânion succinato e seu efeito sinérgico com o etanol. Outra ação antibacteriana demonstrada pelo tratamento pode ser atribuída à rápida utilização dos nutrientes pelas leveduras.

Minerais, como potássio e cálcio em quantidades excessivas podem acarretar efeitos negativos à fermentação. O alumínio foi identificado como elemento estressante à levedura, acarretando queda simultânea da viabilidade e dos teores de trealose da levedura. O sulfito adicionada ao caldo-de-cana para a sua clarificação, pode acarretar efeitos tóxicos à levedura, comprometendo a fermentação, bem como favorecer o processo através controle da contaminação bacteriana.<sup>46</sup>

#### 2.2.6- Concentração de açúcares

O substrato utilizado na fermentação é a sacarose, que após a hidrólise externa é absorvido como glicose e frutose, cujas concentrações são altas o suficiente para induzir repressão catabólica da respiração, favorecendo a fermentação, mesmo que em aerobiose, pelo denominado efeito Crabtree.<sup>138</sup>

A repressão catabólica, que ocorre a partir de 2 g·L<sup>-1</sup> de glicose se expressa em nível de enzimas citoplasmáticas do ciclo do glicoxilato, em nível das enzimas mitocondriais e sobre a estrutura e número de mitocôndrias até o desaparecimento completo da referida organela. Em concentrações elevadas de glicose (5 a 10 %) o efeito repressivo do substrato elimina ou reduz possíveis diferenças entre linhagens selvagens e deficientes respiratórias.<sup>139</sup>

A alta concentração de substrato permite um alto teor alcoólico, que é desejável a nível industrial, pois reduz os custos da destilação, além de propiciar maior assepsia. No entanto, os efeitos danosos são sentidos pela levedura, que reduz a viabilidade, o crescimento e a fermentação, prejuízos que se relacionam com o acúmulo de etanol intracelular no início da fermentação.<sup>140</sup>

A presença do oxigênio não significa necessariamente que o metabolismo é de fato aeróbio. A concentração de glicose no meio tem provado ter uma importante função regulativa no metabolismo.<sup>111</sup>

A concentração de açúcar no caldo de cana-de-açúcar deve ser diferente nas duas etapas distintas do processo fermentativo. A primeira está relacionada com a propagação de *S.cerevisiae* que é feita sob intensa aeração. Normalmente é recomendado que o teor de açúcar não seja superior a 2 - 3 % (m/v), já que concentrações mais altas prejudicam a respiração da célula, que é indispensável para um crescimento eficiente. A segunda etapa está relacionada com a fermentação propriamente dita, ou seja, a conversão de açúcar em etanol e CO<sub>2</sub>. Nesta etapa, o teor médio de açúcar tolerado pela levedura é em torno de 15 % (m/v). Este limite pode ser variável de acordo com a levedura e as demais condições do processo fermentativo.<sup>41</sup>

Em cultura aeróbia, o próprio substrato é reconhecido com agente regulador do metabolismo da glicose. *S.cerevisiae* seria “sensível” à glicose, pois em concentrações de 100 a 200 mg·L<sup>-1</sup> é iniciada a fermentação.<sup>42</sup> Esta repressão ocorre na concentração de 0,2 % m/v, e esta é a razão para se conduzir fermentações em batelada alimentada. O açúcar deve ser alimentado continuamente à uma taxa lenta para que possa ser consumido continuamente e não ultrapasse a concentração crítica.<sup>55</sup>

A concentração de açúcar é mantida baixa no tanque de propagação com o objetivo de favorecer a utilização do açúcar para a produção de células ao invés da produção de etanol. A concentração usual de açúcar no propagador varia entre 0,5 a 1,5 % m/v, dependendo do processo.<sup>143</sup> Desta forma, a concentração de açúcar é o parâmetro principal para efetiva produção de massa celular de levedura.<sup>144</sup>

### 2.2.7- Composição e concentração do inóculo

A recirculação da levedura permite a manutenção da alta concentração celular e a maior eficiência obtida é decorrente de um menor consumo de açúcar utilizado para a formação de células, que de acordo com as condições de fermentação pode desviar de 2 a 10 % do açúcar total.<sup>135</sup> Essa estratégia de controle operacional tem o objetivo de manter a concentração de leveduras a mais alta possível evitando as perdas no processo e aumentando a velocidade de conversão de açúcares a partir de células vivas e adaptadas. Altas concentrações iniciais de células ocasionam menor crescimento e permitem maiores taxas de produção de etanol, enquanto que a remoção de células determina queda na eficiência fermentativa (DE MARTIN, 1988).<sup>145</sup>

A elevada concentração de levedura exige energia de manutenção maior, isto é, maior consumo de açúcar para manter as células vivas. Como consequência, resulta em maior competição pelos nutrientes do meio, minerais e vitaminas, diminuindo a viabilidade do fermento. Daí, existir uma concentração ótima de inóculo na dorna dependendo das condições do processo industrial.<sup>46</sup>

A queda da viabilidade na indústria durante o início da safra, conhecida até então por “fase de adaptação” da levedura, hoje é considerada uma fase de substituição, tendo em vista os recentes trabalhos de identificação de leveduras pela técnica de eletroforese do DNA cromossômico intacto. Assim as leveduras contaminantes podem ser indesejáveis, prejudicando o processo ou desejáveis, apresentando no transcorrer da safra, por vezes, desempenhos superiores ao esperado, sendo tais leveduras consideradas adequadas ao processo industrial, conquanto são selecionadas *in loco*.<sup>146</sup>

Não raro, dependendo das condições do processo, da concentração de nitrogênio amoniacal no mosto e da taxa de recirculação do fermento, são atingidas concentrações excessivas de levedura. A utilização de ácido benzóico mostra-se capaz de reduzir o crescimento excessivo da levedura, ao mesmo tempo em que diminui a formação de glicerol e aumenta o rendimento das fermentações. Entretanto, devido à redução da formação do ácido succínico pela levedura, esta não exerce ação antagônica as bactérias e, no transcorrer dos ciclos fermentativos, inviabiliza a utilização prática do ácido benzóico nas fermentações correntes, devido ao aumento na contaminação bacteriana.<sup>46</sup>

### 2.2.8 - Contaminação bacteriana

A contaminação bacteriana é um sério problema no processo fermentativo para produção de etanol, correlacionando-se negativamente com a eficiência fermentativa, podendo acarretar extremos prejuízos a fermentação. A contaminação na indústria tem origem nas más condições de assepsia bem como na má qualidade da matéria-prima.<sup>147</sup>

As bactérias participam ativamente na deterioração do substrato da fermentação, reduzindo o tempo de estocagem e introduzem no processo produtos indesejáveis do metabolismo que tanto dificultam as etapas anteriores à fermentação, como causam alterações ambientais desfavoráveis às leveduras durante a fermentação. Um rigoroso controle microbiológico do processamento, com a sistemática eliminação de contaminantes, precisa ser mais bem investigado e conhecido.<sup>148</sup>

Os maiores prejuízos causados pela contaminação bacteriana são a degradação da sacarose e a formação dos ácidos lático e acético que ocasionam perda de açúcar e intoxicação das leveduras.<sup>149</sup> Os contaminantes bacterianos presentes nas linhas de caldo, causam perdas de sacarose que variam de 1Kg ton<sup>-1</sup> de cana quando as condições são satisfatórias até 2,5 Kg·ton<sup>-1</sup> de cana quando não são adequadas.<sup>148</sup>

A contaminação caracteriza-se quando o número de micro-organismos, que não seja a levedura selecionada, atinge níveis que são prejudiciais a produção de álcool. A diminuição da produção de álcool pode ser causada por diversos motivos, tais como consumo do açúcar, consumo do álcool produzido, morte ou inibição de células de leveduras por toxinas ou outras substâncias lançadas ao meio pelo micro-organismo contaminante, ou pelo excesso de ácido ou outro produto utilizado para combater a contaminação.<sup>147</sup>

A origem dos contaminantes da fermentação alcoólica é o solo, podendo aumentar sensivelmente o número dos mesmos durante o período que decorre da queima, corte, transporte, armazenamento, até o processo de moagem. A cana é um excelente meio de cultivo e muitos micro-organismos do solo encontram amplas e favoráveis condições de desenvolvimento, levando a obtenção de um caldo misto altamente contaminado e sensivelmente exaurido em açúcares em relação ao teor original.<sup>150</sup>

A terra que acompanha a matéria-prima do campo é fonte de micro-organismos contaminantes e em estágios mais avançados de deterioração, tais micro-organismos podem

estar presentes nas partes internas da cana em quantidades suficientes para promover alterações na sua composição. As águas industriais tais como água de lavagem da cana, água de preparo de pé-de-cuba e água para limpeza dos equipamentos, constituem pontos de entrada de micro-organismos no processo.<sup>151</sup>

Micro-organismos contaminantes podem também ser habitantes naturais da planta, da matéria orgânica em decomposição, além de estarem associados às pragas e moléstias da cultura.<sup>148</sup>

A qualidade microbiológica da cana-de-açúcar é fundamental na obtenção de rendimentos industriais satisfatórios, sendo determinada pela quantidade e características dos micro-organismos presentes, bem como pelos produtos de suas atividades, regulados pela interação variedade-clima-micro-organismos.<sup>152</sup>

As rachaduras provocadas pelo crescimento do colmo da cana constituem em excelentes sítios de multiplicação de micro-organismos. A remoção de cera que envolve o colmo pela ação do calor produzido com a queima, permite que os micro-organismos presentes cresçam livremente, utilizando como meio, o caldo exsudado.<sup>153</sup>

As bactérias contaminantes mais freqüentemente encontradas no processo são: *Bacillus* e *Lactobacillus*, cujas espécies predominantes são: *B. coagulans*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *B. stearothermophilus*, *L. plantarum*, *L. animalis* e *L. buchneri*. Outras espécies relevantes são: *L. vaccinostercus*, *L. coryniformes*, *B. brevis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *Pediococcus* sp, *Leuconostoc* sp e *Sporolactobacillus* sp.

O ácido láctico é um produto freqüente nas fermentações, e embora possa ser produzido pelas leveduras,<sup>63</sup> sua presença pode ser considerado indicador de atividade bacteriana. O ácido succínico, embora produto característico da levedura durante a fermentação é produzido por algumas linhagens de *Lactobacillus*.<sup>154</sup>

A redução no rendimento fermentativo devido a presença de bactérias lácticas ocorre, quando uma molécula de glicose é convertida em duas de ácido láctico, resultando em duas moléculas de etanol que deixaram de ser produzidas pela levedura. Além disso, muitos nutrientes são desviados para a multiplicação bacteriana e deixam de ser aproveitados pela levedura.<sup>155</sup>

Outro problema causado pela presença de bactérias contaminantes em processos de fermentação alcoólica é a floculação, que ocasiona redução na velocidade de fermentação, além de inconvenientes como entupimento de tubulações, aumento de fundo de dorna, dificuldades de operação das centrífugas devido ao entupimento dos bicos.<sup>148,149</sup>

O comportamento das bactérias láticas em cultivo misto com leveduras tem sido pesquisado, mas permanecem dúvidas sobre o mecanismo da estimulação bacteriana. Smith et al. (1975)<sup>156</sup> e Oliva-Neto e Yokoya (1996)<sup>149</sup> atribuíram essa estimulação a aminoácidos liberados pela autólise das leveduras. Ngang et al. (1992)<sup>157</sup> propõem que os monossacarídeos liberados durante a hidrólise da sacarose, seriam os principais responsáveis por este fenômeno. Concentrações abaixo de 2 % estimulam o crescimento bacteriano.<sup>158</sup>

As bactérias láticas exercem um efeito inibidor sobre as leveduras em função da pressão osmótica exercida pela presença de ácido láctico no meio de cultivo. A fermentação exerce ação inibidora ao crescimento bacteriano e reduzem os problemas causados pelo ácido láctico.<sup>157</sup>

Muitas espécies de bactérias são capazes de secretar inibidores, em especial o *Streptomyces* ssp. que produz ciclohexamida, clorafenicol e nistatina, entre outros compostos, e que são utilizados em medicamentos para inibir o crescimento de levedura.<sup>159</sup>

Muitas espécies de bactérias láticas produzem peptídeos com a função de executar a comunicação célula-célula e exercer atividade antimicrobiana. Esta forma de inibição torna evidente que ainda temos muito para conhecer da interação existente entre leveduras e bactérias láticas.<sup>160</sup>

Alguns compostos podem ser originados do metabolismo de alguns tipos de bactérias, como é o caso da dextrana e da levana, que são o resultado da ação de bactérias do gênero *Leuconostoc* e *Bacillus* sobre a sacarose, desdobrando-a e dando formação a polímeros de alta massa molecular, que são constituídos por resíduos de glicose ou frutose. É fácil notar a presença destas bactérias, pois esses polímeros entopem trocadores de calor, canalizações, bombas, causam problemas de cor e são vulgarmente chamados de “canjica” ou “canjiquinha”. Além disso, esses polímeros aumentam a viscosidade do vinho, entupindo as centrífugas ou diminuindo sua capacidade.<sup>147</sup>

A contaminação bacteriana é considerada a maior causa da redução na produção de etanol durante a fermentação de meio amiláceo, de uísque escocês e de mosto de cana, por *S. cerevisiae*. O estímulo no desenvolvimento de *Lactobacillus* sp. quando em cultura mista é devido à excreção de nutrientes, da levedura para o meio, como adenina, guanina, ácido aspártico e nicotínico, triptofano, glicina, alanina e lisina.<sup>155</sup>

Ngang et al. (1992)<sup>157</sup> estudaram a estimulação no desenvolvimento de *L. casei* em cultura mista com *S. cerevisiae* em meio de melação de beterraba e relataram que o estímulo também ocorre principalmente devido a hidrólise da sacarose em hexoses proporcionando maior facilidade de assimilação dos carboidratos pela bactéria.

Serra et al. (1980)<sup>161</sup> avaliaram as condições de controle de fermentação e determinaram que há uma correlação positiva entre a viabilidade da leveduras e o rendimento fermentativo, mostrando a necessidade de controle sobre os fatores que influem na viabilidade celular.

Na tentativa de controle dos contaminantes da fermentação alcoólica, diversas práticas envolvendo a utilização de agentes antimicrobianos são utilizadas, sendo que a aplicação de ácido sulfúrico no preparo de pé-de-cuba é a prática mais utilizada e possibilita reduções de até 44,56 % na população de bactérias contaminantes.<sup>162</sup>

Estudos de contaminação bacteriana durante a fermentação alcoólica têm caracterizado os aminoácidos oriundos da levedura morta como sendo importante para a nutrição e o desenvolvimento de lactobacilos no processo. Os aminoácidos são fatores fundamentais presentes, sem os quais não ocorre o desenvolvimento de *Lactobacillus* na fermentação alcoólica.<sup>149</sup> Dentre esses aminoácidos, leucina, isoleucina e valina quando adicionados ao caldo-de-cana-de-açúcar estimulam o crescimento de *L. fermentum*, mas a tirosina, o ácido aspártico ou a lisina não se mostram essenciais.<sup>163</sup>

De fato, o extrato de levedura pode estimular o crescimento de bactérias lácticas. Smith et al. (1975)<sup>156</sup> utilizaram de extrato de levedura fracionado em Sephadex G-25 em 7 frações, constataram que, a fração mais estimulatória para o crescimento da bactéria láctica *Streptococcus lactis* C10 continha acima de 70 % do nitrogênio presente no extrato de levedura e consistia de uma ampla variedade de aminoácidos livres e uma pequena soma de materiais peptídicos. Um exame mais apurado revelou que os aminoácidos presentes foram

os grandes responsáveis pela estimulação de crescimento do *S. lactis* C10. Bases púricas e pirimídicas também contribuíram para esta estimulação.

As bactérias lácticas podem se multiplicar ao final da fermentação, utilizando o etanol como fonte de energia. No mosto, a presença dessas bactérias é devido à sua resistência a altas temperaturas e baixos valores de pH. Isso faz com que, ao final da fermentação, as bactérias lácticas possam produzir compostos secundários que irão aumentar os níveis de acidez da cachaça.<sup>42</sup> Entretanto, destiladores de uísque utilizam a fermentação láctica tardia visando, principalmente, um possível efeito benéfico no “flavour” da bebida, mas detalhes precisos deste processo são desconhecidos. A formação de ácidos láctico e acético e de outros metabólitos podem interferir no “flavour” do destilado.<sup>164</sup>

Existem poucos estudos sobre a correlação exata da contaminação bacteriana com a perda de álcool produzido, embora seja óbvio que, para cada molécula de açúcar utilizada na produção do ácido láctico pelas bactérias, resulta na perda de duas moléculas de etanol.<sup>155</sup> A elevada acidez da cachaça pode estar relacionada com a presença de um elevado número de bactérias no mosto durante o processo de fermentação.<sup>42</sup> Oliva-Neto e Yokoya (1997)<sup>163</sup> observaram correlação entre o aumento da acidez do meio e a diminuição da viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultivo associado com bactérias durante a fermentação alcoólica de cana-de-açúcar. Segundo estes autores, a acidez do mosto em fermentação é o principal fator que causa a redução da viabilidade celular das leveduras durante a fermentação alcoólica.

#### 2.2.9 - Contaminação por leveduras

Leveduras estranhas ao processo fermentativo, em geral pertencentes à certa espécie, que ocorre em proporções elevadas chegando inclusive a sobre numerar o fermento original e acarretam redução da produtividade e rendimentos, além de problemas operacionais, decantação do fermento, entupimento de equipamentos, maior formação de espuma, entre outros constituem as chamadas leveduras contaminantes. Porém, qualquer levedura presente no processo que não seja a levedura escolhida para a produção de etanol, ainda que tal levedura não acarrete prejuízos operacionais e de rendimento a fermentação, é dita como contaminante. Leveduras contaminantes podem sobre numerar o fermento em poucos dias, devido a alguns fatores como: agressividade na competição por nutrientes,

maior velocidade de multiplicação, pressão de seleção favorável e proporção inicial significativa. Estes fatores ainda são pouco conhecidos para casos específicos.<sup>165</sup>

As pesquisas aplicadas a fermentação etanólica tem-se concentrado, preferencialmente, em problemas relativos a contaminações bacterianas, permanecendo as contaminações por leveduras pouco conhecidas e estudadas.<sup>166</sup>

Leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Torula* e *Pichia*, foram isoladas de canas. A análise morfológica de colônias de leveduras provenientes de amostras de caldo primário e mosto permitiu a caracterização de 9 biotipos diferentes, dos quais um apenas se enquadrou no gênero *Saccharomyces*, após avaliação em meios de cultivo seletivos.<sup>167</sup>

A utilização de meios seletivos permitiu a identificação das espécies *Hansenula anomala*, *Candida formata*, *Saccharomyces kluyveri* e *S. cerevisiae* como leveduras contaminantes em uma unidade industrial a partir de amostras de fermento centrifugado, fermento tratado e mosto em fermentação.<sup>168</sup>

Miniac (1989)<sup>169</sup> cita a espécie *Brettanomyces intermedius* como contaminante em várias destilarias da França, sendo a mesma, responsável pela redução da produção de etanol e pelo aumento de acidez orgânica, levando inevitavelmente, a necessidade de renovação de todo o fermento em processo.

Uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* formada por cadeias multicelulares ramificadas, foi identificada na produção de etanol, tal linhagem apresentou elevado poder competitivo com as leveduras usuais de processo e com as demais leveduras contaminantes encontradas.<sup>170</sup>

A presença de levedura contaminante na produção de álcool, a qual provocou vários problemas ao processo fermentativo. A característica peculiar das células desta levedura era a formação de cachos, pois as células-filhas não se soltavam da célula-mãe. Esta levedura foi encontrada no caldo, na água de refrigeração das dornas e vinhaça. A identificação deste contaminante demonstrou tratar-se da espécie *Candida Krusei*.<sup>171</sup>

### **3- IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

A identificação de leveduras consiste em caracterizá-las de forma inequívoca e distingui-las, mesmo quando suas células estão misturadas. As metodologias aplicadas à

identificação têm a finalidade principal de classificar taxonomicamente às espécies. Contudo, elas têm destacada aplicação na indústria de fermentações, onde tiveram a sua origem.<sup>172</sup>

As leveduras e outros micro-organismos após isolamentos do ambiente, seja natural ou em cultivo artificial, são comumente identificados e classificados empregando-se meios de cultivo especiais. Assim, determinam-se amplo espectro de características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas. Seguindo-se a comparação com organismos padrão e ocasionalmente a avaliação de propriedades tecnológicas, conclui-se a classificação e eventualmente a identificação do micro-organismo.

Diferenças na fermentação e assimilação de compostos de carbono são critérios importantes na taxonomia e identificação de leveduras, pois estes micro-organismos apresentam uma variação na habilidade de fermentação de açúcares. Alguns grupos apresentam fermentação vigorosa da glicose como *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Torulaspota* e *Zygosaccharomyces*, enquanto outros, como *Lipomyces* e *Sterigmatomyces* são estritamente não-fermentativos.<sup>173</sup>

Uma das metodologias mais eficiente na identificação de leveduras foi descrita por Barnett (1960)<sup>174</sup> e baseia-se em uma grande quantidade de testes de assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio em condições de aerobiose e anaerobiose, os quais demandam muito tempo para a identificação e diferenciação das linhagens, o que justifica a busca de metodologia mais eficiente e rápida na identificação de leveduras.

Diversas metodologias têm sido desenvolvidas para a obtenção de sistemas mais simples e rápidos para identificação de leveduras, como a sorologia para complementação ao método descrito por Barnett (1960)<sup>74</sup> feita por Tsuchita et al. (1965)<sup>175</sup>, análise da parede celular de leveduras por ressonância magnética,<sup>177</sup> análise do sistema de coenzima Q,<sup>176</sup> conteúdo de bases nitrogenadas,<sup>178</sup> bioluminescência,<sup>179</sup> conteúdo de trealose<sup>180</sup> propriedades dos ácidos graxos<sup>181</sup>, movimento de prótons e transporte de açúcares,<sup>182</sup> efeito inibitório de diferentes compostos.<sup>183</sup>

Alguns autores utilizaram a presença de corantes no meio para diferenciação das linhagens de leveduras. Hall (1971)<sup>184</sup> utilizou três meios diferenciais WLN-Wallerstein Laboratories' Nutriente Agar, com variação da fonte de nitrogênio para detecção de

contaminantes em cervejarias e concluiu que o método se mostra eficiente somente para algumas linhagens, já que existem grupos de linhagens que apresentam a mesma coloração.

Lin (1975)<sup>185</sup> utilizou cinco meios diferenciais para a detecção de leveduras selvagens na indústria de cerveja. Os meios utilizados foram: meio actidiona, meio lisina, meio cristal violeta, SDM (Schwarz Differential Medium) e meio Lin, desenvolvido por ele mesmo, onde demonstrou que a utilização de apenas um meio ou método não foi suficiente para detecção de leveduras selvagens na fermentação. Com estes meios foi possível a diferenciação de cinco espécies do gênero *Saccharomyces* e quinze outras espécies de leveduras.

Longley et al. (1978)<sup>186</sup> utilizaram todos os meios seletivos citados por Lin (1975)<sup>185</sup> com a adição de ergosterol e tween 80 e condições de aerobiose e anaerobiose para a diferenciação de linhagens de *Saccharomyces* e outras leveduras. Com este método conseguiram diferenciar 12 linhagens pertencentes a sete espécies de *Saccharomyces* e outros seis gêneros diferentes.

Oliveira e Pagnocca (1988)<sup>168</sup> utilizaram meios de cultura diferenciais para a identificação de contaminantes na indústria alcooleira, onde afirmaram que o meio WLN não se mostrou adequado para o monitoramento microbiológico de contaminantes, a não ser quando se trabalha somente com *Saccharomyces cerevisae*.

Degre et al. (1989)<sup>187</sup> utilizaram seis métodos para identificação de leveduras de vinho: fermentação e assimilação de açúcares, eletroforese de proteínas, toxina Killer, análises de ácidos graxos voláteis, separação de cromossomos-FIGE e DNA fingerprinting, mostrando as vantagens e desvantagens de cada método, sugerindo ainda que somente um método não é capaz de diferenciar claramente as linhagens de *Saccharomyces spp.*

Tavares et al. (1992)<sup>192</sup> também fizeram a comparação de três métodos (isoenzimas, eletroforese de proteínas totais e DNA fingerprinting) para a identificação de leveduras da indústria alcooleira pertencentes a espécie *Saccharomyces cerevisae* e concluíram que os três métodos são eficazes para a identificação de linhagens da mesma espécie e com isso permitem distinguir variações do próprio fermento ou aquela devido a contaminações.

Alguns progressos foram alcançados a fim de simplificar os métodos para identificação de leveduras. Diversos testes como “kits” de diagnóstico “easy-to-use” são disponíveis comercialmente<sup>189</sup> porém, estes “kits” cobrem uma margem limitada de testes

de assimilação de carbono e nitrogênio, utilizados para algumas espécies de leveduras de importância médica, não sendo indicadas para a identificação de leveduras de um modo geral.

O sistema API-20, baseado em testes de assimilação de 49 fontes de carbono e testes de fermentação, é muito utilizado embora tenha sido idealizado para identificação de bactérias,<sup>190</sup> sendo portanto necessárias diversas modificações do método, como testes de assimilação de nitrogênio para identificação de leveduras.

Heard e Fleet (1990)<sup>191</sup> descreveram um método em microplacas para identificação de 18 espécies de leveduras, baseados em testes de fermentação com 12 carboidratos diferentes, 33 testes de assimilação de carbono e seis testes de assimilação de nitrogênio, utilizando ainda, crescimento em meio livre de vitaminas, crescimento na presença de ciclohexamida, testes de esporulação e morfologia. As vantagens deste método quando comparado com os descritos anteriormente são a quantidade de meio utilizado para a realização dos testes, que é bem menor, além dos resultados serem obtidos em dois a três dias.

Rom et al. (1991)<sup>192</sup> utilizando uma quantidade maior de fontes de carbono, conseguiram identificar uma diversidade maior de espécies de leveduras (38 espécies). Mas ainda este tipo de metodologia carrega consigo o mesmo problema dos anteriores, ou seja, os resultados dependem de pessoal altamente especializado e condições perfeitamente padronizadas.

Autio e Mattila-Sandholm (1992)<sup>193</sup> desenvolveram um método de detecção de células de leveduras em fatias congeladas de massas destinadas a indústria de panificação, que se baseia na absorção do corante DAPI (4'6- diamino-2-fenilindol) cujas células de leveduras se apresentam amarelas em contraste com a massa que se apresenta vermelha.

Erickson (1992)<sup>194</sup> desenvolveu um método baseado em filtração de membrana hidrofóbica para seleção e diferenciação *Zygosaccharomyces bailii* em alimentos acidificados do tipo pickles e suco de frutas concentrados e pasteurizados. Com este método também foi possível a detecção de outras leveduras como *Pichia* spp. e *Hansenula* spp.

Métodos de separação de cromossomos têm sido bastante utilizados para identificação de linhagens de leveduras. Carle e Olson (1985)<sup>195</sup> utilizaram o método de “orthogonal-field-alternation gel eletrophoresis” (OFAGE) a fim de estabelecerem um

padrão de bandas para *Saccharomyces cerevisiae*. Com este método foram detectadas 12 bandas sendo que nove bandas correspondendo a um cromossomo cada e três bandas contendo dois cromossomos em cada uma, totalizando os 15 cromossomos da espécie.

Carle et al. (1986)<sup>196</sup> utilizaram gel bidimensional de separação de cromossomos visando demonstrar a existência de mais de um cromossomo em algumas bandas. Na primeira dimensão foi utilizado o método OFAGE e o mesmo gel submetido a uma segunda corrida pelo método FIGE “Field inversion gel electrophoresis”. Com isso confirmaram que realmente três bandas contêm dois cromossomos cada.

Jones et al. (1986)<sup>112</sup> utilizando o método OFAGE estabeleceram padrões de bandas de 22 ascomicetos e 4 basidiomicetos. Tal estudo permitiu estabelecer que o padrão apresentado pelas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* é o único que apresenta no mínimo quatro bandas abaixo de 500 kb, em contra partida com as outras 25 linhagens que apresentam a maioria de suas bandas acima de 1000 kb.

O método de separação de cromossomos por eletroforese de campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis – PFGE) tem sido bastante utilizado por diversos autores que estabeleceram cariótipos bastante precisos de *Saccharomyces cerevisiae*, *Ustilago hordei*, *Tilletia caries* e *T. controversa*, utilizando células intactas para a execução do método. Estudos demonstraram a eficiência do método de “contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis” (CHEF), mesmo sem a esferoplastização das células antes da inclusão nos “plugs” (blocos de agarose).<sup>197</sup>

Sheehan e Weiss (1991)<sup>198</sup> utilizaram o método de CHEF para identificar a presença de leveduras poliplóides na indústria cervejeira, pois, a presença das mesmas causa alteração no sabor e aroma da cerveja. Com a utilização do método, foi possível encontrar padrões de 16 bandas para *Saccharomyces cerevisiae*, detectando ploidia da linhagem quando comparada com a original de estoque. Relataram ainda problemas como método, o qual não apresentou uma repetibilidade satisfatória.

Na comparação entre seis métodos utilizados para avaliação da diversidade de leveduras em cervejarias, sendo eles: DNA fingerprinting, contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis (CHEF), Field inversion gel electrophoresis (FIGE), orthogonal field alternation gel electrophoresis (OFAGE), pulsed field gel electrophoresis (PFGE) e tranverse alternating field electrophoresis (TAFE), foi demonstrada a ineficiência

dos cinco métodos baseados na separação de cromossomos em relação à eficiência do método de DNA fingerprinting, salientado ainda que o TAFE não garante a suficiente diversidade existente entre linhagens de cervejarias.<sup>199</sup>

Hawthorne e Philippsen (1994)<sup>200</sup> utilizaram o método OFAGE para explicar a infertilidade dos híbridos obtidos de cruzamentos entre linhagens esporuladas de *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum* e *S. douglasii*, onde detectaram a ausência de alguns cromossomos homólogos.

Pederson (1986a)<sup>201</sup> utilizou o método OFAGE para separação de cromossomos, em seguida, hibridizou os cromossomos separados com duas sondas distintas. Com isso, criou um padrão de diferenciação entre as 14 linhagens mais utilizadas nas cervejarias (*Saccharomyces bayanus*, *S. capensis*, *S. carlsbergensis*, *S. cerevisiae*, *S. chevalieri*, *S. diastaticus*, *S. ellipsoideus*, *S. inusitatus*, *S. italicus*, *S. monacensis*, *S. norbensis*, *S. pastorianua*, *S. uvarum* e *Zigosaccharomyces fermentati*), o que não havia conseguido anteriormente somente com a separação de cromossomos.

Pederson (1986b)<sup>202</sup> utilizando o método de OFAGE e hibridização de DNA-DNA encontrou alta homologia entre o cromossomo III de *Saccharomyces bayanus*, *S. uvarum* e *S. carlsbergensis*.

O método de PFGE foi utilizado para a confirmação da homologia entre *Saccharomyces cerevisiae*, *S. paradoxus* e *S. bayanus* através de cariótipos eletroforéticos.<sup>203</sup>

A eletroforese constitui-se em uma técnica que permite a separação de macromoléculas eletricamente carregadas em uma solução, quando a esta é aplicada uma diferença de potencial. Diversos sistemas foram desenvolvidos para facilitar estudos de caracterização de espécies, estando entre elas a técnica de SDS-PAGE.<sup>204</sup>

Culturas de leveduras da indústria de bebidas alcoólicas são usualmente caracterizadas pela morfologia de célula e colônia, testes fisiológicos e habilidade de flocular ou formar um filme, contudo estes critérios não são mais confiáveis para a identificação correta de linhagens. Padrões eletroforéticos têm sido usados para estudo da variação genética em plantas, animais e micro-organismos.<sup>205</sup>

Van Urren e Van Der Meer (1987)<sup>206</sup> analisaram através de SDS-PAGE 27 linhagens de *Saccharomyces* utilizadas comercialmente para a produção de vinho e duas

linhagens usadas na fermentação de cerveja. O padrão de bandas protéicas foi usado como um “fingerprinting” das linhagens. Diferentes grupos genéticos de *Saccharomyces cerevisiae* foram distinguidos. O padrão de proteína das linhagens dentro de cada grupo apresentou uma alta correlação confirmando que *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces uvarum* e *Saccharomyces carlsbergensis* são sinônimos de *Saccharomyces cerevisiae*.

O método de eletroforese de proteínas apresenta satisfatória diferenciação entre linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo um método rápido e fácil na detecção de contaminantes da fermentação.<sup>165</sup>

A detecção e exploração de sequências de polimorfismos de DNA corridos naturalmente representam um dos mais significantes desenvolvimentos na biologia moléculas. A forma de polimorfismo chamada amplificação ao acaso de DNA polimórfico (RAPD) tem sido bastante utilizada principalmente pela vantagem de ser simples e rápido.

A modificação da base da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) que permite RAPDs é extremamente simples. Ao invés de usar uma cadeia bastante longa e cuidadosamente escolhida para amplificar uma sequência de DNA, um “primer” bastante curto de oligonucleotídeos (10 mer), o qual se liga a muitos diferentes loci, é usado para amplificar sequência ao acaso de DNAs bastante complexos, como o genoma de plantas. Com isso a técnica de RAPD constitui-se em um sistema útil de monitoramento de níveis de diversidade detectáveis entre e dentro de populações.<sup>207</sup>

Williams et al. (1990)<sup>208</sup> foram o primeiro grupo a utilizarem o método RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) com a finalidade de simplificar a construção de mapas genéticos moleculares até então feitos pelo método de RFLP. Neste trabalho mostraram diferenças de amplificação de duas variedades de soja para 11 “primers” e compararam os resultados com os obtidos com o método RFLP, mostrando que o método RAPD é muito eficiente.

A metodologia de PCR, usando “primers” ao acaso nas amplificações a fim de distinguir linhagens através de polimorfismo em “fingerprinting” genômicos foi eficiente na diferenciação de 24 linhagens de cinco espécies de *Staphylococcus*, 11 linhagens de *Streptococcus pyogenes* e três variedades de arroz (*Oryza sativa*). Este tipo de RAPD realizado foi chamado por eles de AP-PCR (PCR com “primer” arbitrário).<sup>209</sup>

Lehmann et al. (1992)<sup>210</sup> utilizaram RAPD para melhor caracterizar diferenças genotípicas entre espécies de *Candida* de importância médica. Foram utilizados “primers” pequenos (com até 10 mers), com seqüências arbitrárias e resultaram em reações capazes de distinguir isolados de *Candida albicans*, *C. lusitane*, *C. tropicalis* e *Torulopsis glabrata*. A análise do RAPD permitiu construir um painel de homologia fisiológica de *Candida parapsilosis*, classificando as linhagens em três grupos distintos e mostrou a diversidade genética dentro de isolados de *C. haemulonii*.

O método RAPD permite distinguir a linhagem de levedura padrão dentre outras que possam, por exemplo contaminar a fermentação na indústria alcooleira.<sup>211</sup>

O etanol parece ser um forte fator mutagênico na mitocôndria da levedura e essa pressão na seleção da levedura pode explicar as diferenças no polimorfismo observadas no genoma nuclear e mitocondrial em leveduras de pão, vinho e bebidas destiladas.<sup>197</sup>

Além de o polimorfismo modificar o tamanho e o número de cromossomos de *Saccharomyces cerevisiae*, esta levedura também apresenta dois cromossomos com a mesma massa molecular, de número 15 e 7 e conseqüentemente, a migração destes cromossomos ocorre ao mesmo tempo, sendo visualizados no gel de eletroforese como se fossem apenas um cromossomo. Baseado no fato de que o tempo de reorientação das moléculas de DNA está relacionado ao tamanho, empregaram a estratégia de desorganizar a orientação de um campo elétrico estabelecido e forçaram as moléculas a processos de reorientação. Para isso, foi desenvolvido um sistema de eletroforese com dois campos elétricos em direções de migração de modo que após certo tempo de corrida (pulso), a direção era alterada, forçando as moléculas a migração em nova direção. As moléculas que migram se reorientam quando da alteração do campo elétrico, até tomarem novamente a conformação esticada que permite a sua passagem pelos poros do gel. O tempo despendido neste processo de reorientação é proporcional ao tamanho da molécula, de modo que as menores se adiantam em relação às maiores, e, portanto, podem ser separados.<sup>212</sup>

Morais et al. (1997)<sup>213</sup> observaram que durante a formação do inóculo e do ciclo de fermentação, que pode variar de 12 a 48 h, ocorre uma sucessão de espécies de leveduras, sendo que *Saccharomyces cerevisiae* é predominante.

A maioria das espécies de leveduras isoladas da fermentação artesanal, incluindo *Saccharomyces cerevisiae* são fisiologicamente adaptadas as condições ambientais

observadas nas dornas de fermentação. São capazes de crescer em meio a 37 °C, contendo 50 % de glicose e 8 % de etanol. A maioria das espécies de leveduras não produz toxinas comumente produzidas pelas linhagens “killer” e possuem altos níveis de atividade invertase.<sup>214</sup>

Linhagens de *Saccharomyces* isoladas em áreas tropicais, como o isolado durante a produção aguardente de cana, podem formar genótipos que diferem das cepas de leveduras conhecidas. Vários estudos têm mostrado que um grande número de estirpes de *S. cerevisiae* poderia estar simultaneamente envolvidos no processo de fermentação do vinho.<sup>215</sup>

#### 4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- PRETORIUS, I.S.; TOIT, M.du; RENSBURG, P.van. Designer yeasts for the fermentation industry of the 21st century. **Food Technol. Biotechnol.** v. 41, n. 1, p. 3-10, 2003.
- 2- JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**, 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- 3- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre: Artemed, 2002. 827 p
- 4- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Biology of microorganisms**. 8 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997.
- 5- VILJOEN, B.C.; KOCK, L.F. The Genus *Candida* Berkhout nom. Conserve – A historical account of its delimitation System. **Appl. Microbiol.**, 12: 183-190, 1989.
- 6- VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. A taxonomic key the genus *Saccharomyces*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 16, p. 113-119, 1993.
- 7- QUEROL, A.; BELLOCH, C. Molecular evolution in yeast of biotechnological interest. **Int. Microbiol.** v. 6, p. 201-205, 2003.
- 8- OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 34-50, 2000.
- 9- PITT, J.I; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. New York: Academic Press, 1985.
- 10- LIMA, U.A. **Contribuição ao estudo da influência do manganês sobre o desenvolvimento e atividade da *Saccharomyces cerevisiae***. Piracicaba, 1954. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- 11- PULZATTO, M.E. **Fatores que influem na obtenção de biomassa de Levedura Seca (*Saccharomyces cerevisiae*) na fermentação alcoólica**. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 2000. 112 p. (Tese, Doutorado em Tecnologia de Alimentos).
- 12- AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G. Fermentação endógena com a levedura JA-1. **Relatório anual de pesquisas em Fermentação Alcoólica**. n. 14, p. 62-70, 1994.
- 13- GAMBIRÁSIO, A. Fermentos auxiliam indústria. **Química e derivados**, v. 2, n. 16, p. 43-46, 1967.

- 14- EDDY, A.A. Aspects of the chemical composition of yeast. In: COOK, A. H. ed. **The Chemistry and Biology of yeasts**. New York: Academic Press, 1958, cap. 5, p. 157-240.
- 15- HARRISON, J.S. Yeast production. **Progress in Industrial Microbiology**, v. 10, p. 129-177, 1971.
- 16- JONES, R.P.; PAMMENTE, N.; GREENFIELD, P.F. Alcohol fermentation by yeast: the effect of environmental and other variables. **Process Biochemistry**, London, 16: 42-49, 1981.
- 17- PORTER, L.J; OUGH, C.S. The effects of ethanol, temperature and dimethyl dicarbonate on viability of *Saccharomyces cerevisiae* Montrachet n 544 in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 33, n. 4, p. 222-228, 1982.
- 18- SUOMALAINEM, H.; PFAFFLI, S. Changes in the carbohydrate reserves of baker's yeast growth and standing. **Journal of institute Brewing**, v.67, p. 249-254, 1961.
- 19- SLAPACK, G.E.; RUSSEL, I.; STEWART, G.C. **Thermophilic microbes in ethanol production**. Boca Raton: CRC Press, 1987, p. 99-107.
- 20- CROWE, J.H.; O'DEIL, S.J.; ARMSTRONG, D.A. Anhydrobiosis in nematodes permeability during rehydration. **Journal of Experimental Zoology**, v. 297, p. 431, 1979.
- 21- WATSON, K.; CAVICCHIOLI, R. Acquisition ethanol tolerance in yeast cells by heat shock. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 793-803, 1984
- 22- COONEY, C.L. Growth of microorganisms In: REHM, REED, I.G. **Biotechnology. Microbial fundaments**. weinheim: verlag Chemie, 1981, v.1, cap. 2, 233-239.
- 23- JANACEK, K. Experimental pH change and constant buffering capacity in algal and yeast suspension. **Dev. plant. Biology**, v. 4, p. 577-578, 1980.
- 24- SIGLER, K.; KOTYK, A.; KNOTKOVA, A.; OPEKAROVA, M. Processes involved in the creation of buffering capacity and in substrate induced proton extrusion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 643, n.3, p. 583-592, 1981.
- 25- ROTHSTEIN, A.; ENNS, L.H. The efflux of potassium from yeast cells, into a potassium free medium. **Journal Cellular Comparative Physiology**, v. 28, P. 231- 252, 1946.
- 26- SCOTT, G.; JACOBSON, M.A.; RICE, M.E. The influence of glycolytic factors on the potassium and sodium content of *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Biochemistry**, v. 30, n. 2, 282-291, 1951.
- 27- CONWAY, E.J.; DOWNEY, M. pH values of the yeast cell. **Biochemical Journal**, v. 47, n. 2, p. 355-360,1950.

- 28- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature**, v. 191, p. 144-448, 1961.
- 29- PENA, A. Studies on the mechanism of K<sup>+</sup> transport in yeast. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 167, p. 397-409, 1975.
- 30- KOTIK, A.; SIGLER, K. Trans-membrane movements of protons in simple eukaryotic cells. **Study Biophysics**, v. 84, n. 1, p. 55-56, 1981.
- 31- RAMOS, S. Coupling of protons and K<sup>+</sup> gradient in yeast. **FEMS Symposium**, v. 23, p. 351-7, 1985.
- 32- NORTHCOTE, D.H.; HORNE, R.W. The chemical composition and structure of the yeast cell wall. **Biochemical journal**, v. 51, p. 232-236, 1952.
- 33- FRENCH, D. Control of glycogen metabolism. **A Ciba Fondation Symposium**, 1964.
- 34- TREVELYAN, W.; HARRISON, J.S. Studies on yeast metabolism. III The intracellular level of piruvato during yeast fermentations. **Biochemical Journal**, v. 57, n. 4, p. 556-561, 1954.
- 35- BERCK, H.L.; ROTHSTEIN, A. The metabolism of storage carbohydrates in yeasts. Studied with glucose-1 and dinitrophenol. **Archives of Biochemistry**, v. 72, n. 2, p.380-395, 1957.
- 36- EATON, N.R. Endogenous respiration of yeast .I. The endogenous substrate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 88, n. 1, p. 17-25, 1961.
- 37- D'AMORE T.; CRUMPLEN, R.; STEWART, G.G. The environmental of trehalose in yeast stress tolerance. **Journal of industrial microbiology**. Amsterdam, 7 (3): 191-195, 1991.
- 38- CHARLAB, R. **Síntese de trealose em *Saccharomyces*: sistemas I e II**. Rio de janeiro, 1983. 70 p. Tese (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- 39- THEVELEIN, J.M. Regulation of trehalose mobilization in fungi. **Microbiological Reviews**, v.48, n.1, p. 42-59, 1984.
- 40- WIENKEN, A. Trehalose in yeast, stress protection rather than reserve carbohydrate. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.58, p. 209-217, 1990.
- 41- HOTTINGER, T.; SCHUTZ, P.; WIENKWN, A. Heat-induced accumulation and futile cycling of threalose in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Bacteriology**, Baltimore, 169 (12): 5518-5522, 1987.
- 42- PATARO, C.; GUERRA, J.B.; GOMES, F.C.O.; NEVES, M.J.; ROSA, C.A. Trehalose acuumulation, invertase activity and physiological characteristics of yeast

isolated from 24 fermentation cycles during the production of artisanal brazilian cachac. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, n.3, p. 202- 208, 2002.

43- RIBEIRO M.J.S. **Estudo do metabolismo de trealose durante o choque térmico a 36 °C em *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação de mestrado, Universidades Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 78 p., 1993.

44- BASSO L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. Estudos dos carboidratos de reserva, glicogênio e trealose, no transcorrer da fermentação e durante o reciclo de fermento. **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, n. 9, p. 39-40, 1989.

45- BASSO L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. Fermentação da trealose: efeito da temperatura. **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, n. 11, p. 57-66, 1994.

46- LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgar Blucher v.3, cap 1,1-43, 2001.

47- GANCEDO, C.; SERRANO, R. Energy-yelding metabolism. In: **The Yeasts**, 2nd Ed. Academic press, London, v. 3, cap. 6, p. 205-259, 1989.

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

49- VOLPE, P.L.O. Estudo da fermentação alcoólica de soluções diluídas de diferentes açúcares utilizando microcalorimetria de fluxo. **Química Nova**, 20(5), 1997.

50- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1995. v.1, 262 p.

51- YOKOYA, F. **Fabricação da aguardente de cana**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologias “André Tosello”, 1995. 92 p.

52- AQUARONE, E. Generalidades sobre bebidas alcoólicas. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A. (Coord.). **Biotechnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

53- CARTWRIGHT, C.P.; ROSE, A.H.; CALDERBANK, J.; KEENAN, M.H.J. Solute transport. In: **The Yeasts**, 2nd ed. Academic press, London, v. 3, cap. 2, p. 5-56, 1989.

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

55- REED, G.; PEPPLER, H.J. **Yeast technology**. Westport, Connecticut: The AVI Publishing Company, Inc., 1973. 378p.

- 56- RODRIGUES, F.; LUDOVICO, P.; LEÃO, C. Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. In: ROSA, C.A.; PETER G.(Eds), Biodiversity and necophysiology of yeasts, **The yeast Handbook**, Springer-Verlag, Heidelberg, 2006,. p. 101-121, 579 p.
- 57- BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. **Processos de produção de álcool Controle e Monitoramento**, 2ªed. FERMENTEC/FEALQ/ESALQ – USP. Piracicaba, 1996.
- 58- PANEK, A. **Storage carbohydrates**. In: ROSE, A.H; HARRISON, J.S. In: The Yeasts, 2nd Ed. Academic Press, London, v. 4, cap. 13, p. 655-678, 1991.
- 59- OURA, E. Reaction products of yeast fermentations. **Process Biochemistry**, v.12, p.644-651, 1977.
- 60- GANCEDO, C.; GANCEDO, J.M.; SOLS, A. Glycerol metabolism in yeast. Pathways of utilization and products. **European Journal of Biochemistry**, London, 5: 165-172, 1968.
- 61- LAGUNAS, R; GANCEDO, J.M. Reduced pyridine balance in glucose-growing *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry**, Berlim, 37, 90-94, 1973.
- 62- RADLER, F.; SCHUTZ, H. Glycerol production of various strains of *Saccharomyces*. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, Barking, 33 (1): 36-40, 1982.
- 63- WHITING, G. C. Organic acid metabolism f yeast during fermentation of alcoholic beverages. A review. **Journal of the Institute of brewing**, London, 82: 84-92, 1976.
- 64- TOKUOKA, K. A Review. Sugar- and salt- tolerance yeasts. *Journal of applied Bacteriology*, London, 74:101-110, 1993.
- 65- FINGUERUT, J.; LUCREDI, H.; FURCO, M.A.; ALTOMARI, R.; ROSSEL, C.E.V. Controle operacional da fermentação. **Boletim Técnico Coopersucar**, Piracicaba, 38: 19, 23, 1987.
- 66- GROSZ, R; STEPHENOPOULOS, G. Physiological, biochemical and mathematical studies of micro-aerobic continuous ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. II intracellular metabolite and Enzyme assays at steady state chemostat culture. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, 36: 1020-1029, 1990.
- 67- NORDSTROM, K. Yeast growth and glycerol formation. **Acta Chemica Sacandinavica**, Copenhagen, 20 (4): 1016-1025, 1966.
- 68- JANZANTTI, N.S. **Compostos voláteis e qualidade de sabor da cachaça**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004, 179 p.

- 69- GUTIERREZ, L.E. **Tópicos de bioquímica de leveduras**. Piracicaba: ESALQ/Depto. De Química, (NAPMA, 1), 103 p., 1994
- 70- MAIA, A.B.R.A.; CAMPELO, E.A.P. **Tecnologia da cachaça de alambique**. Belo Horizonte: SEBRAE/MG; SINDBEBIDAS, 2005. 129 p.
- 71- CHERUBIN, R.A. **Efeitos da adição de benzoato de sódio na fermentação alcoólica para produção de aguardente de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998. 70p.
- 72- LIMA, U.A. **Estudos dos principais fatores que afetam os componentes do coeficiente não-álcool das aguardentes de cana**. Cátedra. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1964. 141p.
- 73- HEERDE, E.; RADLER, F. Metabolism of the anaerobic formation of succinic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Microbiology**, Berlim, 117: 269, 1978.
- 74- PAMPULHA, M.E.F.S. **Efeito do ácido acético na fermentação e nos parâmetros de crescimento em *Saccharomyces cerevisiae***. Tese de doutorado- Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 222 p., 1989.
- 75- CARDOSO, M.G. (Ed). **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. 2.ed. Lavras:UFLA, 2006, 444 p.
- 76- MAIA, A.B. **Componentes secundários da aguardente**. STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos, v.12, p.29-39, jul./ago. 1994.
- 77- NOVAES, F.V. **Tecnologia da aguardente**. Piracicaba: Centro Acadêmico Luiz de Queiroz, 1974. 143p.
- 78- OLIVEIRA, E.S. **Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001. 135p.
- 79- VALSECHI, O. **Aguardente de cana de açúcar**. Livro ceres, São Paulo: 1960. 120 p.
- 80- WINDHOLZ, M.; BUDAVARI S. **The merck index: an encyclopedia of chemicals and drugs**. 9th Ed. Rahway: Merck & Co, 1976. 1835 p.
- 81- CHAVES, J.B.P.; PÓVOA, M.E.B. **A qualidade da aguardente de cana de açúcar**. In: MUTTON, M.J.R.; MUTTON, M.A. **Aguardente de cana: produção e qualidade**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. p. 93-132.

- 82- NAGATO, L.A.F.; NOVAES, F.V.; PENTEADO, M.V.C. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 37, n.1, p. 40-47, jan./jun. 2003.
- 83- LABANCA, R.A.; GLÓRIA, M.B.A.; AFONSO, R.J.C.F. Determinação de carbamato de etila em aguardente de cana por CG-EM. **Química Nova**, v. 31, n.7, p. 1860-1864, 2008.
- 84- BELAND, F.A.; BENSON, R.W.; MELLICK, P.W.; KOVATCH, R.M.; ROBERTS, M.K.; FANG, J.L.; DOERGE, D.R.; **Food Chem. Toxicol.** 43, 1, 2005.
- 85- BRASIL. Leis, decretos, etc. Instrução Normativa n. 13 de 29 de junho de 2005. **Diário Oficial da União. Brasília**, 30 de junho de 2005.
- 86- ORDUNÃ, R.M.; LIU, S.Q.; PATCHETT, M.L.; PILONE, G.J.; **FEMS Microbiol. Lett.** 2000, 183, 31.
- 87- ARESTA, M.; BOSCOLO, M.; FRANCO, D.W.; **J. Agric. Food Chem.**, 49, 2819, 2001.
- 88- LOURENCINI, V.F. **Manual para manutenção de destilarias autônomas de álcool e fermentação alcoólica**. Piracicaba: Dedini Metalúrgica, 90 p., 1990.
- 89- SILVA, R.B.O. de. **Leveduras contaminantes na produção de etanol industrial por processo contínuo: quantificação e identificação**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Bociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 145 p., 1994.
- 90- MAIORELLA, B.L. Ethanol. In: MOO-YOUNG, M. (ed) **Comprehensive biotechnology: the principles, applications e regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine**. Oxford: Pergamon Press, v.3, cap. 43, p. 861-914, 1985.
- 91- LALUCE, C.; PALMIERI, M.C.; CRUZ, R.C.L. Grow and fermentation characteristics of new selected strains of *Saccharomyces* at high temperatures and high cell density. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, p. 528-536, 1991.
- 92- ABRAHAO-NETO, J.; INFANTI, P.; VITOLO, M. Influence of pH, temperature and dissolved oxygen concentration on the production of glucose 6-phosphste dehydrogenase and invertase by *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Journal of Chemical engineering**. v.14, n.1, p. 3-10, 1997
- 93- BROSAN, M.P.; DONNELLY, D.; JAMES, T.C.; BOND, U. Stress response is repressed during fermentation in brewery strains of yeast. **Journal of Applied Microbiology**. v.88, n.5,p. 746-755, 2000.
- 94- D'AMORE, T.; STEWART, G.C. Ethanol tolerance of yeasts. **Enzyme and Microbial Technology Biotechnology Research and Reviews**, v.9, n.6, p.322-330, 1987.

- 95- OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. **Revista de Microbiologia**, v. 28, p. 25-31, 1997.
- 96- THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi continuous alcoholic fermentation of corn mash. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p. 819-828, 2001.
- 97- O'CONNOR-COX, E.S.C.; PIK, J.; INGLEDEW, W.M. Improved ethanol yields through supplementation with excess assimilable nitrogen. **Journal of Industrial Microbiology**, Groningen, 8: 45-52, 1991.
- 98- LEO, C.; van UDEN, N. Effects of ethanol and other alkaloids on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, 774, 43-48, 1984.
- 99- COOPER, T.G. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: STRATHERN, J.N.; JONES, E.W.; BROACH, J.R. the molecular biology of the yeast *Saccharomyces*. **Metabolism and gene expression**. Ed. Cold Spring Harbour, New York, p. 39-99, 1982.
- 100- HENICK-KLING, T. Yeast and Bacterial Control in Winemaking. In: Modern methods of plant analysis, new series vol 6. **Wine analysis**. Edited by LINSKENS, H.F.; JACKSON, J.F. Spring-Verlag Berlen Heidelberg, 1988.
- 101- ALVES, D.M.G. **Fatores que afetam a produção de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica**. (Dissertação- Mestrado em Microbiologia). Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo.1994. 128p.
- 102- PINOTTI, R.F. **Quantificação do nível de nitrogênio nas etapas do processo de produção de álcool**. STAB, Piracicaba, v.10, n.1, p.34-35, 1991.
- 103- JERONIMO, E.M. **O nitrogênio protéico na fermentação alcoólica e sua influência na qualidade da cachaça**. (Tese, Doutorado em Tecnologia de Alimentos).Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 2004. 119 p.
- 104- STEHLIK-TOMAS, V.; ZETIC, V.G.; STANZER, D.; GARBA, S. AND VAHCIC, N. Zn, Cu and Mn Enrichment in *S. cerevisiae*, **Food Technology**. Biotechnology. v.42 (2), p.115–120, 2004.
- 105- JONES, R.P.; GREENFIELD, P.F. A review of yeast ionic nutrition. Part I: Growth and fermentation. **Process Biochemistry**, april: p 48-60, 1984.
- 106- JONES, R.P.; GADD, G.M. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 12: 1-17, 1990.

- 107- REED, G.; NAGODAWITHANA, T.W. **Yeast Technology**. New York: 2 ed. Van Nostrand Reinhold Book. 1991. 378 p.
- 108- AZEVEDO, S.M.; CARDOSO, M.G.; PEREIRA, N.E.; RIBEIRO, C.F.S.; SILVA, V.F.; AGUIAR, F.C.; **Ciênc. Agrotecnol.**, 27, 618, 2003.
- 109- WAGGONER, D.J.; BARTNIKAS, T.B.; GITTLIN, J.D.; **Neurobiol. Dis.** 6, 221, 1999.
- 110- BACH, H.P; WOEHRER, W. and ROEHR, M. Continuous determination of ethanol during aerobic cultivation of Yeasts. **Biotechnology and bioengineering**, vol XX, 799-807, 1978.
- 111- OURA, E. Effect of Aeration on the Biochemical Composition of Baker's Yeast. **Biotechnology and Bioengineering**, vol XVI, pag 1197-1212, 1974.
- 112- JONES, R.P. Effect of the relative concentration of species on yeast growth and ethanol production. **Process Biochemistry**, London, 21 (6): 183-187, 1986.
- 113- AMORIM, H.V. **Nutrição mineral de leveduras. Aspectos teóricos e práticos**. In: Semana da Fermentação alcoólica "Jaime Rocha de Almeida", 4, Piracicaba, Anais, ESALQ/STAB. P. 44-48, 1985.
- 114- GOMES, E. **Efeito da tratamento acido da leveduras *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação alcoólica**. Dissertação de Mestrado, ESALQ/USP, 206 p., 1988.
- 115- KOTYK, A. Proton extrusion in yeast. In: **Methods in Enzymology**, San Diego, 174: 592-603, 1989.
- 116- CALACHORRA, M.; RAMIREZ, J.; CLEMENTE, S.M. PENA, A. Electrochemical potential and ion transport in vesicle of yeasts plasma membrane. **Biochemical et Biophysical Acta**, Amsterdam, 899 (2): 229-238, 1987.
- 117- RODRIGUEZ-NAVARRO, A.; RAMOS, J. Dual system of potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Bacteriology**, Baltimore, 59 (3): 940-945, 1984.
- 118- HERRAIZ, T. Production of volatile compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during the alcoholic fermentation of grape must in presence or absence of SO<sub>2</sub>. **Belgian Journal of Food Chemistry and Biotechnology**, Brussels, 45 (2): 57-62, 1990.
- 119- ANACLETO, J.; van UDEN, N. Kinetics and activation energetic of death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by sulphur dioxide. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, 34, 2477-2486, 1982.
- 120- SCHIMZ, K.L. The effect os sulfite on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Microbiology**, Berlin, 125: 89-95, 1980.

- 121- WATSON, K. **Temperature relations**. In: rose, A. H.; HARRISON, J. S. *The Yeasts*. 2 nd edition. Academic Press, London, vol 2, cap. 3, p. 41-47, 1987.
- 122- GAO, C.; FLEET, G.H. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. **Journal of Applied Bacteriology**, Baltimore, 65: 405- 409, 1988.
- 123- PARADA, G.; ACEVEDO, F. On the reaction of temperature and RNA content to the specific growth rate *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, 25: 2785-2788, 1983
- 124- WINKLER, K.; KIENLE, I.; BURGET, M.; WAGNER, J.C.; HOLZER, N. Metabolic regulation of the trehalose content of vegetative yeast. **FEBS Letters**, Amsterdam, 291: 269, 272, 1991.
- 125- COOTE, N.; KIRSHOP, B.H. Factors responsible for the decrease in pH during beer fermentations. **The Journal the Institute of Brewing**, London, 82: 149-152, 1976.
- 126- VALLE, E.; BERGILLOS, L.; RAMOS, S. External  $K^+$  affects the internal acidification caused by the addiction of glucose to yeast cell. **Journal of General Microbiology**, London, 133 930: 535-538, 1987.
- 127- ERASO, P.; GANCEDO, C. Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. **FEBS Letters**, Amsterdam, 224 (1): 187-192, 1987.
- 128- GRAY, W.D. Studies on the alcohol tolerande of yestas. **Journal of Bacteriology**, 42: 561-574, 1941.
- 129- BROWN, S.W.; OLIVER, S.G.; HARRISON, D.E.F.; RIGHELATO, R.C. Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation. Differences in the magnitude and complexity of the effect. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, 11, 151-155, 1981.
- 130- HOPPE, G.K; HANSFORD, G.S. Ethanol inhibition of continous anaerobic yeast growths. **Biotechnology Letters**, Kew, 4(1), 39-44, 1982.
- 131- LEITE, S.G.F.; FRANCA, F.P. Intracellular ethanol and cellular viability of *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, 21 (2), 163-165, 1990.
- 132- INGRAM, L.O. Adaptation of membrane lipids to alcohols. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, London, 35 (b): 235-238, 1985.
- 133- PERLOT, P. Influence of culture medium, composition on the Kinectics of yeast growth and ethanol production. **International Conference on Alcohols e Chemical from Biomass**. Guadalajara, 2: 1- 12, 1989.

- 134- SALGUEIRO, S.P.; SA-CORREIA, I.; NOVAIS, J.M. Ethanol-induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: Kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, 54, 903-909, 1988.
- 135- CASEY, G.P.; MAGNUS, C.A.; INGLEDEW, W.M. High-gravity brewing: Effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability and alcohol production. **Applied and Environmental Microbiology**, 48 (3): 639-646, 1984.
- 136- D'AMORE T.; PANCHAL, C.J.; STEWART, G.G. The effect of osmotic pressure on the intracellular accumulation of ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation in wort. **The journal of Institute of brewing**, London, 93: 472-476, 1987.
- 137- BASSO L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. The antibacterial action of succinic acid produced by yeast during fermentation. **Revista de Microbiologia**, v. 28, supl.1, p. 77-82, 1997.
- 138- RATLEDGE, C.; EVANS C.T. Lipids and their metabolism. In: **The Yeasts**, 2nd Ed. Academic press, London, vol. 3, cap. 10, p. 367-455, 1989.
- 139- GASPARINI, N.R. **Estudo da fermentação alcoólica por leveduras mutantes deficientes respiratórias de *Saccharomyces cerevisiae* IZ- 1904**. Dissertação de Mestrado ESALQ/USP, Piracicaba, 82 p.,1986.
- 140- D'AMORE T.; PANCHAL, C.J.; STEWART, G.G. Intracellular ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. **Applied and Environmental microbiology**, New York, 54 (1): 110-114, 1988.
- 141- SCHWAN. R.F.; CASTRO, H.A. Fermentação alcoólica. In: CARDOSO, M.G. (Ed.) **Produção de cachaça de cana-de-açúcar**. Lavras: UFLA, 2001. p. 45-57.
- 142- MAIA, A.B.R.A. **Fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae*: desenvolvimento de um novo sistema e novas concepções sobre a formulação de meios**. (Tese de doutorado – Microbiologia). Belo Horizonte: UFMG, 1992, 210 p.
- 143- PRESCOTT, C.; DUNN, C.G. **Industrial Microbiology**. 3 ed. New York: McGraw Hill, 1959. 923 p.
- 144- MISKIEWICZ, T.; KASPERSKI, A. A fuzzy logic controller to control nutrient dosage in a fed-batch baker's yeast process. **Biotechnology letters**, vol 22, pag 1685-1691, 2000.
- 145- DE MARTIN, V.F. **Efeito da remoção de células sobre o rendimento da fermentação alcoólica por leveduras**. Piracicaba, Dissertação de mestrado- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz: - USP, 190 p., 1987.

- 146- BASSO, L.C.; OLIVEIRA, A.J.; ORELLI, V.F.D.M.; CAMPOS, A.A.; GALLO, C.R.; AMORIM, H.V. Dominância das leveduras contaminantes sobre linhagens industriais avaliada pela técnica da cariotipagem. **Stab. Piracicaba.**, 1993.
- 147- AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; ZAGO, E.A. Fermentação descontínua: como evitá-la. **Álcool e açúcar**, São Paulo, 5, 12-18, 1982.
- 148- YOKOYA, F. Problemas com contaminantes na fermentação alcoólica. **STAB. Açúcar, álcool e subprodutos**, v.9, n.65, p.38-39, 1991.
- 149- OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Influência do extrato de levedura na estabilidade da fermentação alcoólica contaminada por *Lactobacillus fermentum*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 16, n.2, p. 170-4, 1996.
- 150- STUPIELLO, J.P.; HORII, J. Condução da Fermentação alcoólica. **Saccharum**, v.4, n.17, p.43-46., 1981.
- 151- BOVI, R.; MARQUES, M.O. O tratamento ácido na fermentação alcoólica. **Álcool e Açúcar**, v.3, n.9, p.10-12, 1983.
- 152- STUPIELLO, J.P. Qualidade da cana-de-açúcar para a fabricação de açúcar e álcool: parte 1. **Álcool e Açúcar**, v. 1, n.1, p. 17-20, 1981.
- 153- BEVAN, D.; BOND, J. **Microrganisms in Field and Mill: a preliminary survey**. In: Quesland Society of Sugar cane Technologists, 38, Cairns, 1971. Proceedings: Brisbane: Watson Ferguson, p. 137-143, 1971.
- 154- KANEUCHI, C.; SEKI, M.; KOMAGATA, J.K. Production of succinic acid from citric acid and related acids by *Lactobacillus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, 54 (12): 3053-3056, 1988.
- 155- NARENDRANATH N.V.; HYNWA, S.H.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Effects of lactobacilli on yeast-catalysed ethanol fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.11, p.4158-4163, 1997.
- 156- SMITH, S.; HILLIER, A.J.; LEES, G.J. The nature of the stimulation of the growth of *Streptococcus lactis* by yeast extract. **Journal of dairy research**, v. 42, p. 123-38, 1975.
- 157- NGANG, J.J.E.; WOLNIEWICZ, E.; LETOURNEAU, F.; VILLSA, P. Stimulation of *lactobacilli* during alcoholic fermentation: action of sucrose hydrolysis by yeast. **Biotechnology Letters**, v.14, n.8, p.741-746, 1992.
- 158- KING, S.W.; BEELMAN, R.B. Metabolic interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a model grape/wine system. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 37, p. 53-60, 1986.

- 159- WALKER, G.M. **Yeast physiology and biotechnology**. New York: John Wiley, 350 p., 1998.
- 160- QUADRI, L.E.N. Regulation of antimicrobial peptide production by autoinducer-mediated quorum sensing in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.82, n.1-4, p. 133-145, 2002.
- 161- SERRA, G.E.; CEREDA, M.P.; PINTO, S.Z.; MENEGUIM, M.A.; MARINO; E.A. FERREIRA, L.J.; BERTHIOL, A.E. Controle microbiológico da fermentação alcoólica em condições industriais. In: **SIMPOSIO DE TECNOLOGIA DO AÇÚCAR E DO ALCOOL**, Águas de São Pedro, 1980. Anais. Águas de São Pedro: STAB, p. 187-295, 1980.
- 162- GALLO, C.R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. Tese (Doutorado) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990.
- 163- OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. **Revista de Microbiologia**, v.28, p.25-31, 1997;
- 164- VAN BEEK, S.; PRIEST, F. Evolution of the lactic bacterial community during malt whisky fermentation: a polyphasic study. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 1, p. 297-305, Jan. 2002.
- 165- TAVARES, F.C.A. processo de controle seletivo de leveduras contaminantes. **STAB. Açúcar, álcool e subprodutos**, v.10, n,5, p.45-49, 1992.
- 166- OLIVEIRA, M.C.F.L.; Leveduras contaminantes da fermentação etanólica. In: Seminário sobre Microbiologia da Fermentação etanólica. **Microbiologia da Fermentação etanólica**, Rio Claro, UNESP:, Instituto de Biociências, p. 92-104, 1987.
- 167- SOUZA, M.A.C; MARQUES, M.O.; MELLO, W.J. **Caracterização de leveduras em caldo primário e mosto**. In: Congresso Nacional da Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil, 5, Água de São Pedro, Anais, Piracicaba: STAB, p. 235- 240, 1994.
- 168- OLIVEIRA, M.C.F.L.; PAGNOCCA, F.C. **Aplicabilidade de meios seletivos empregados na indústria cervejeira para detecção de leveduras selvagens em unidades sucro-alcooleiras**. In: Simpósio Nacional de Fermentação, 8, Anais. São Lourenço: SBM, p. 78-81, 1988
- 169-MINIAC, M. Contamination des fermentations alcooliques industrielles par les levures du genre: Brettanomyces. **Industries Alimentaires et Agricola**, v. 106, n. 7-8, p. 559-563, 1989.

- 170- OLIVEIRA, M.C.F.L.; SILVA, R.B.O. **Biotipo *Saccharomyces cerevisiae* em cadeias multicelulares ramificadas na fermentação contínua**. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 17, Simpósio Nacional de Fermentação, 10, Santos, SBM, 79 p., 1993.
- 171- AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; ZAGO, E.A.; BASSO, L.C.; GALLO, C.R. **Processos de fermentação alcoólica, seu controle e monitoramento**. Piracicaba: ESALQ/ Centro de Biotecnologia Agrícola; FERMENTEC, 145 p., 1989.
- 172- HANSEN, E.C. **Undersøgelser over alkoholgærsvampenes fysiologi og morfologi VII On Alkoholgærsvampenes Forhold til Sukkeret meddelelse fra Carlsberg Laboratoriet**, 2:220-267 In: Rose A.H e Harrison, J.S., ed. *The Yeast*, London Academic Press, 1987, v.1, p. 5-61.
- 173- WALT, J.P. Vander.; YARROW, D. **Methods for isolation maintenance, classification and identification of yeast**. In: KREGER-VAN RIJ, N.S.W. (Ed). *The yeasts: a taxonomy study*. Amsterdam: Elsevier Science, p.45-104, 1984.
- 174- BARNETT, J. A. Comparative studies of yeasts. **Nature**, London, 186:449-51,1960.
- 175- TSUCHIYA, T.; FUKAZAWA, Y.; KAWARITA, S. Significance of serological studies on yeasts. **Mycologia Applicata**, New York, 26: 1-5, 1965.
- 176- YAMADA, Y.; NOJIRI, M.; MATSUYAMA, M.; KONDO, K. Co-enzyme Q system in the classification of the asporogenous yeast Genera *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and *Endomycopsis*. **Journal General Applied Microbiology**, Tokyo, 23: 325-39, 1976.
- 177- GORIN, P.A.J.; SPENCER, J.T.F. Proton Magnetic resonance spectroscopy na AID identification and chemotaxonomy of yeast . **Advances in Applied microbiology**, San Diego, 13: 25-89, 1970.
- 178- KURTZMAN, C.P.; PHAFF, H.J. Molecular Taxonomy. In: ROSE, A. H, e HARRISON, J. S., ed. **The Yeast**. London, Academic Press, 1987, v.1, p. 63-94.
- 179- MILLER, R.; GALSTON,G. rapid methods for the detection of yeast and *Lactobacillus* by ATP bioluminescence. **Journal of the Institute of Brewing**. London, 95: 317-9, 1989.
- 180- GUTIERREZ, L.E. Acúmulo de Trealose em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação alcoólica. Piracicaba, 47: 597-608, 1990.
- 181- BENDOVA, O.; RICHTER, V.; JANDEROVA, B.; HAUSLER, J. Identification of Industrial yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae* by fatty acid profiles. **Applied Microbiology Biotechnology**, New York, 35: 810-2, 1991.
- 182- KILIAN, S.G.; DEEMTER, A.; KOCK, J.F.L.; PREEZ, J.C. Occurrence and taxonomic aspect of proton movements coupled to sugar transport in the yeast genus *Kluyveromyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, 59: 199-206, 1991.

- 183- SIMPSON, W.J.; FERNANDEZ, J.L.; HAMMOND, J.R.M. Differentiation of brewery yeasts using a disc-difusion test. **Journal of the Institute of Brewing**. London, 98: 33-6, 1992.
- 184- HALL, J.F. Detection of wild yeasts in the brewery. **Journal of the Institute of Brewing**, London, 77: 513-36, 1971.
- 185- LIN, Y. Detection of wild yeast in the brewery efficiency of differential media. **Journal of the Institute of Brewing**. London, 81: 410-7, 1975.
- 186- LONGLEY, R.P., DENNIS, R.R.; HIEYER, M.S.; WREN, J.J. Selective *Saccharomyces* media containing ergosterol and tween 80. **Journal of the Institute of Brewing**. London, 84: 341-5, 1978.
- 187- DEGRE, R.; THOMAS, D.Y.; ASH, J.; MAILHIOT, K. MORIN, A.; DUBORD, C. Wine yeasts strain identification. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, 40 (4):309-15, 1989.
- 188- TAVARES, F.C.A.; ECHEVERRIGARAY, S.; GOMES, L.H.; SOUBIHE, M. Identificação molecular de leveduras da fermentação alcoólica. **STAB, Piracicaba**, 10 (4): 34-9, 1992.
- 189- DEAK, T.; BEUCHAT, L.R. Identification of food-borne yeasts. **Journal of Food Protection**, Ames, 50: 243-64, 1987.
- 190- FUCHS, D.C.; DOLAN, T. Performance of yeast identification systems. **American Journal of Clinical pathology**, Philadelphia, 8:664-7, 1982.
- 191- HEARD, G.M.; FLEET, G.H. A convenient microtitre tray procedure for yeast identification. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, 68: 447-51, 1990.
- 192- ROM, H.; LECHNER, F.; BRAUER, M. Diversity of yeasts in selected dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, 72:370-6,1991.
- 193- AUTIO, K.; MATTILA-SANDHOLM, T. Detection of active yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) in frozen dough sections. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 58 (7): 2153-7,1992.
- 194- ERICKSON, J. P. Hydrophobic membrane filtration method for the selective recovery and differentiation of *Zygosaccharomyces bailli* in acidified ingredients. **Journal of Food Protection**, Ames, 56(3):234-8, 1993.
- 195- CARLE, G.F.; OLSON, M.V. An electrophoretic karyotype for yeast. **Proceedings of the National Academy of Science United States of American**, Washington, 82: 3756-60, 1985.

- 196- CARLE, G.F.; FRANK, M.; OLSON, M.V. Electrophoretic separation of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. **Science**, Oxford, 232:65-8, 1986.
- 197- IBEAS, J.I.; JIMENEZ, J. Electrophoretics karyotype of budding yeast with intact cell wall. **Nucleic Acids Research**, oxford, 21 (16): 3902, 1993.
- 198- SHEEHAN, C.A.; WEISS, A. Brewing yeast identification and chromosome analysis using high resolution CHEF gel electrophoresis. **Journal of the Institute of Brewing**. London, 97: 163-7, 1991.
- 199- CASEY, G.P.; XIAO, W.; RANK, G.H. Application of pulsed field chromosome electrophoresis in the study os chromosome XIII and the electrophoretic karyotype of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. **Journal of the Institute of Brewing**, London, 94, 239-43, 1988.
- 200- HAWTHORNE, D.; PHILIPPSEN P. Genetic and molecular analysis of hybrids in the genus *Saccharomyces cerevisiae* involving *S. cerevisiae*, *S. uvarum* and a new species, *S. douglasi*. **Yeast**, London, 10: 1285-96,1994.
- 201- PEDERSON, M.B. DNA sequence polymorphism in the genus *Saccharomyces* III. Restriction endonuclease fragment patterns of chromosomal region in brewing and other yeast strains. **Carslberg Research Communications**, New York, 51: 163-183, 1986 a.
- 202- PEDERSON, M.B. DNA sequence polymorphism in the genus *Saccharomyces* IV. Homeologous chromosomes III of *Saccharomyces bayanus*, *S. carslbergensis* and *S. uvarum*. **Carslberg Research Communications**, New York, 51: 185-202, 1986 b.
- 203- NAUMOV, G.I.; NAUMOVA, E.S.; LANTTO, R.A.; LOUIS, E.J.; KORKHOLA, M. Genetic homology between *Saccharomyces cerevisiae* and its sibling species *S. paradoxos* and *S. bayanus*: eletrophoretic karyotypes. **Yeast**, London, 8: 599-612, 1992.
- 204- MATSUOKA, M.; ASOU, S.; OHASHI, Y. Regulation mechanisms of the synthesis of pathogenesis – regulated protein in tobacco leaves. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, 29: 1185-92, 1988.
- 205- KERSTERS, K; DE LEY, J. Classification and Identification of bacteria by electrophoresis of their proteins. In: GOODFELLOW, M e BOARD, R.G. ed. **Microbial classification and identification**, London, Academic Press, 1980, p. 273, 94.
- 206- VAN VUUREN, H.J.J.; VAN DER MERR, L. Characterization of brewing yeast strain by numerical analysis of total soluble cell proteins patterns. **Journal of the Institute Brewing**. London, 94: 245-8, 1988.
- 207- WAUGH, R.; POWELL,W. Using markers for crop improvement, **Trends in Biotechnology**, Oxford, 10: 186-92, 1992.

- 208- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, 18: 6531-5, 1990.
- 209- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, 18 (24): 7213-8, 1990.
- 210- LEEHMANN, P.F.; LIN, D.; LASKER, B.A. genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, 30 (12): 3249-54, 1992.
- 211- GOMES, L.H.; ARGUESO, J.L.; DUARTE, K.M.R.; TAVARES, F.C.A. RAPD para a identificação de leveduras industriais. In: **REUNIAO ANUAL DE GENETICA DE MICRO-ORGANISMOS**, 20, Piracicaba, 1995, Anais, p.154.
- 212- PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; MUHLEN, G. J. Aplicacoes da técnica de eletroforese de campo pulsado para separação de cromossomos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna-SP, Embrapa, 1998.p. 228-51.
- 213- MORAIS, P.B.; ROSA, C.A.; LINARDI, V.R.; PATARO, C.; MAIA, A.B.R.A. Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of the Brazilian sugar-cane aguardente. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 13, 241-243, 1997.
- 214- PATARO, C., SANTOS, A., CORREA, S.R., MORAIS, P.B., LINARDI, V.R.; ROSA, C.A. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in an aguardente distillery. **Revista de Microbiologia** 29, 104-108, 1998.
- 215- POLSINELLI, M.; ROMANO, P.; SUZZI, G.; MORTIMER, R. Multiple strains of *Saccharomyces cerevisiae* on a single grape vine. **Letters in Applied Microbiology** 23, 110-114, 1996.

## **PARTE 2 – CACHAÇA DE ALAMBIQUE, AMINAS BIOATIVAS E CARBAMATO DE ETILA**

### **1- CACHAÇA DE ALAMBIQUE**

Aguardente de cana é a bebida com graduação alcoólica de 38 a 54 % vol. a 20 °C, obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g·L<sup>-1</sup> (BRASIL, 2003).

Cachaça é a denominação típica e exclusiva da Aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 a 48 % vol a 20 °C, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g·L<sup>-1</sup> (BRASIL, 2005).

Na fabricação de cachaça, depois de moída a cana-de-açúcar e separado o bagaço, o caldo é submetido a uma filtração, por passagem em peneiras ou decantador para separação do bagacilho. O caldo pronto para fermentar é denominado mosto, ao qual se adiciona o fermento ou “pé-de-cuba”. Depois de terminada a fermentação do mosto, o caldo é chamado de vinho, que após sedimentação é destilado (LIMA, 2001). A duração de um processo fermentativo pode variar de 18 a 30 horas (PEREIRA et al., 2006). Durante a destilação, são separadas as frações: cabeça, coração e cauda, onde a cachaça é a fração chamada de coração. A bebida recém-destilada, por melhor que tenha sido a fermentação e mais apurada a destilação, apresenta sempre um sabor ardente e seco, inadequado ao consumo, devendo ser mantida por um tempo mínimo de 2 meses em barris de madeira para aprimorar a qualidade sensorial da bebida (CARDOSO, 2006).

O fluxograma da produção da cachaça está mostrado na Figura 4.

A composição química da cana-de-açúcar é de: 65 a 75 % de água, 11 a 18 % de sacarose, 0,2 a 1,0 % de glicose, 0,0 a 0,6 % de frutose, 8 a 14 % de cinzas e o restante constituído por compostos nitrogenados, gorduras, ceras e compostos pécticos (SANTANA, 1995; PEREIRA et al., 2006).

O caldo obtido pela moagem da cana-de-açúcar é constituído de água entre 78 e 86 %, sacarose entre 10 e 20 %, açúcares redutores entre 0,1 e 2,0 %, cinzas entre 0,3 e 0,5 % e compostos nitrogenados entre 0,5 e 1,0 % (LIMA, 2001).

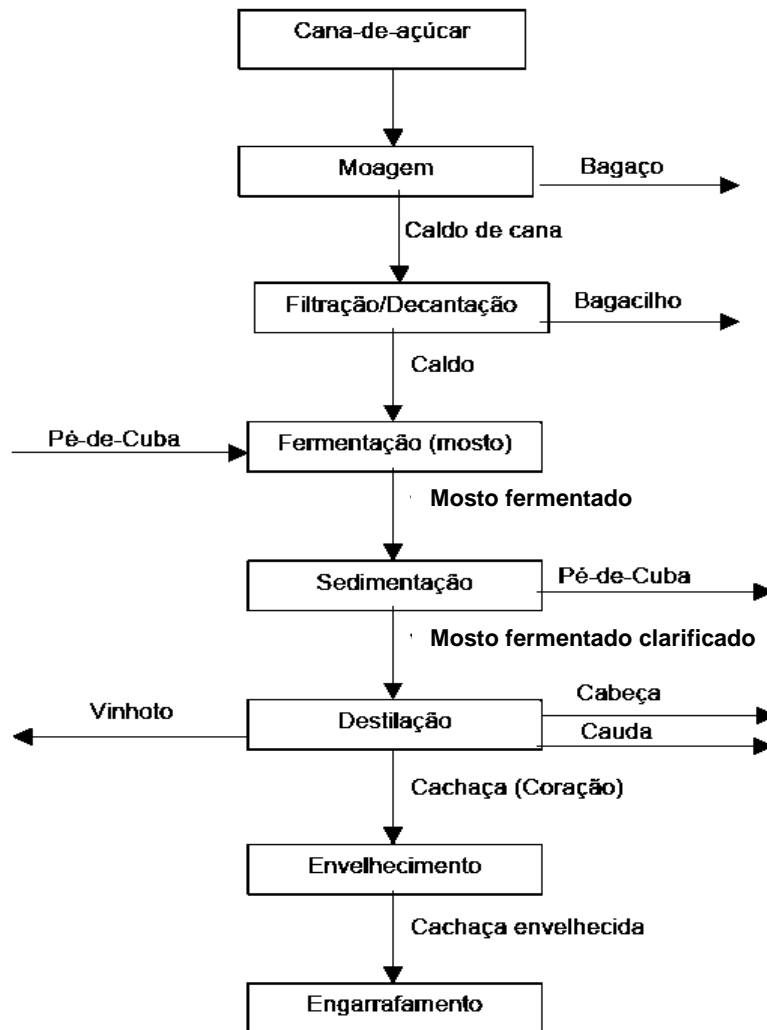


Figura 4- Fluxograma de Produção da Cachaça.

O caldo-de-cana-de-açúcar a ser fermentado apresenta normalmente valores de pH entre 5,2 e 5,8. Os compostos orgânicos não açúcares são constituídos de substâncias nitrogenadas (proteínas, aminoácidos, etc.), gorduras, ceras, pectinas, ácidos (málico, succínico, etc.) e de matérias corantes (clorofila, sacaretina e antocianinas). Os principais elementos inorgânicos são: sílica, potássio, fósforo, cálcio, sódio, magnésio, enxofre, ferro, alumínio, cloro e outros (LIMA, 2001).

A destilação influencia nas características sensoriais de uma bebida alcoólica pela alteração nas quantidades de compostos voláteis resultantes, e pelas reações químicas que

ocorrem devido ao aquecimento. A composição dos destilados é influenciada por inúmeros fatores, como tipo de destilador, construção e operação do aparelho, o sistema de aquecimento do vinho e resfriamento do destilado, o grau de purificação da mistura hidroalcoólica e a separação das frações (cabeça, coração e cauda) (OLIVEIRA, 2001).

### **1.1- Fatores que Interferem na Qualidade da Cachaça**

As bebidas alcoólicas contêm características próprias de aroma e sabor conferidas pela presença de diversos constituintes oriundos do processo fermentativo. Além do etanol, compostos orgânicos, como álcoois superiores, ácidos orgânicos e ésteres, podem estar presentes e interferir em tais características (MENDONÇA, 1999).

O desenvolvimento da fermentação alcoólica compreende o desdobramento dos açúcares do caldo-de-cana com formação de dois produtos principais: álcool etílico e dióxido de carbono. Além desses, há normalmente a formação de pequenas quantidades de outros componentes, os quais recebem a denominação de produtos secundários da fermentação alcoólica (CARDOSO, 2006).

O gás carbônico, presente em pequenas quantidades é o principal composto gasoso, enquanto células de leveduras, bactérias, sais minerais e outras impurezas em suspensão representam a fração sólida (PEREIRA et al., 2006).

O baixo grau alcoólico presente em várias aguardentes pode ser ocasionado pela estocagem da cana-de-açúcar por muito tempo, acarretando deteriorações fisiológicas e bacteriológicas, assim como perdas de álcool no decorrer da fermentação alcoólica e da destilação, ocasionando redução do rendimento (CARDOSO, 2006).

Os Padrões de Identidade e Qualidade para Cachaça de acordo com a legislação brasileira encontram-se apresentados na Tabela 3.

## **2- AMINAS BIOATIVAS**

As aminas bioativas são bases orgânicas nitrogenadas alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina e espermidina), aromáticas (tiramina e feniletilamina) ou heterocíclicas (histamina e triptamina), de baixa massa molecular, formadas e convertidas pelo metabolismo de homens, animais, plantas e micro-organismos (Figura 5) (BARDÓCZ, 1995).

Tabela 3- Padrões de Identidade e Qualidade para cachaça

Componente	Unidade	Limite	
		Mínimo	Máximo
Gradação alcoólica de cachaça	% em volume de álcool etílico a 20°C	38	48
Sacarose, em açúcar refinado, cristal, invertido ou glicose	g·L <sup>-1</sup>	6,0	30,0
Acidez volátil, em ácido acético	mg·100mL <sup>-1</sup> de álcool anidro	-	150
Ésteres totais, em acetato de etila	mg·100mL <sup>-1</sup> de álcool anidro	-	200
Aldeídos totais, em acetaldeído	mg·100mL <sup>-1</sup> de álcool anidro	-	30
Furfural e hidroximetilfurfural	mg·100mL <sup>-1</sup> de álcool anidro	-	5
Alcoóis superiores: isoamílico, isobutílico e 1-propanol	mg·100mL <sup>-1</sup> de álcool anidro	-	360
Congêneres	mg·100mL <sup>-1</sup> de álcool anidro	200	650
Álcool metílico	mg·100mL <sup>-1</sup> de álcool anidro	-	20
Cobre	mg·L <sup>-1</sup>	-	5,0
Extrato seco	g·L <sup>-1</sup>	-	6,0
Carbamato de etila	µg·L <sup>-1</sup>	-	150
Partículas em suspensão	-	ausente	ausente

Fonte: BRASIL, 2005.

As aminas bioativas podem ser classificadas em função do número de grupamentos amina na molécula, da estrutura química e da via biossintética. Quanto ao número de grupamentos aminas, classificam-se em monoaminas (tiramina e 2-feniletilamina), diaminas (histamina, triptamina, serotonina, putrescina e cadaverina) e poliaminas (espermina, espermidina e agmatina). Quanto à estrutura química, se classificam em alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina, espermidina e agmatina), aromáticas (tiramina e 2-feniletilamina) e heterocíclicas (histamina e triptamina). Quanto à via biossintética, as aminas se classificam em poliaminas naturais que são formadas durante a biossíntese “*in situ*”, ou seja, a partir de uma molécula mais simples, na medida em que são requeridas (cadaverina, putrescina, agmatina, espermina e espermidina) ou quando são armazenadas nos mastócitos e basófilos (histamina) e em aminas biogênicas quando são formadas por reações não específicas de descarboxilação conduzidas por descarboxilases bacterianas, sendo esta a principal via de formação de aminas em alimentos (histamina, serotonina, tiramina, 2-feniletilamina, triptamina, putrescina, cadaverina e agmatina) (RICE et al., 1976; MAGA, 1978; BARDOCZ, 1995; LIMA e GLÓRIA, 1999).

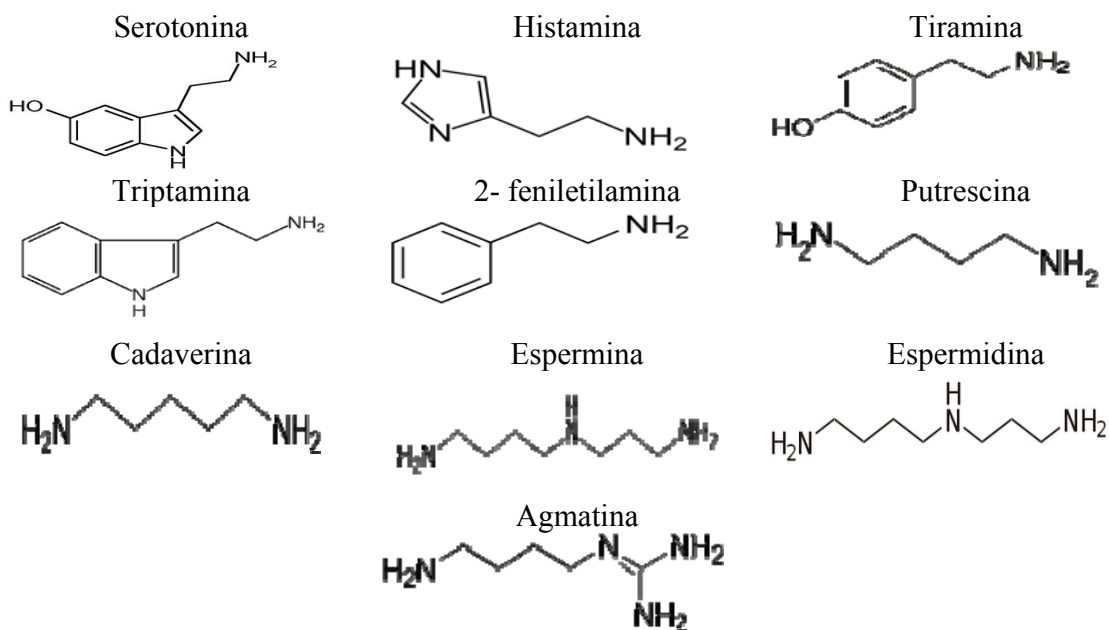


Figura 5 - Estrutura química de algumas aminas bioativas.

As aminas são formadas predominantemente por descarboxilação de aminoácidos e por aminação ou transaminação de aldeídos e cetonas, mas também através da hidrólise de compostos nitrogenados e decomposição térmica (BARDÓCZ, 1995).

Algumas aminas são formadas pela descarboxilação microbiana de aminoácidos. Histamina é formada a partir da histidina, tiramina a partir da tirosina, cadaverina a partir da lisina e putrescina a partir da ornitina (Figura 6). A produção de aminas biogênicas requer a presença de micro-organismos capazes de produzir descarboxilase e um cofator conveniente. Quando estão presentes aminoácidos em concentrações adequadas e fatores que favoreçam o crescimento, as bactérias se desenvolvem e sintetizam descarboxilase. Os principais aminoácidos que sofrem descarboxilação são: tirosina, histidina, triptofano lisina, arginina e glutamina. As aminas são geralmente, psicoativas ou vasoativas, envolvidas com as funções vitais em homens e animais (BUCKENHUSKEN, 1993; SILLA SANTOS, 1996; PAULSEN et al., 1997).

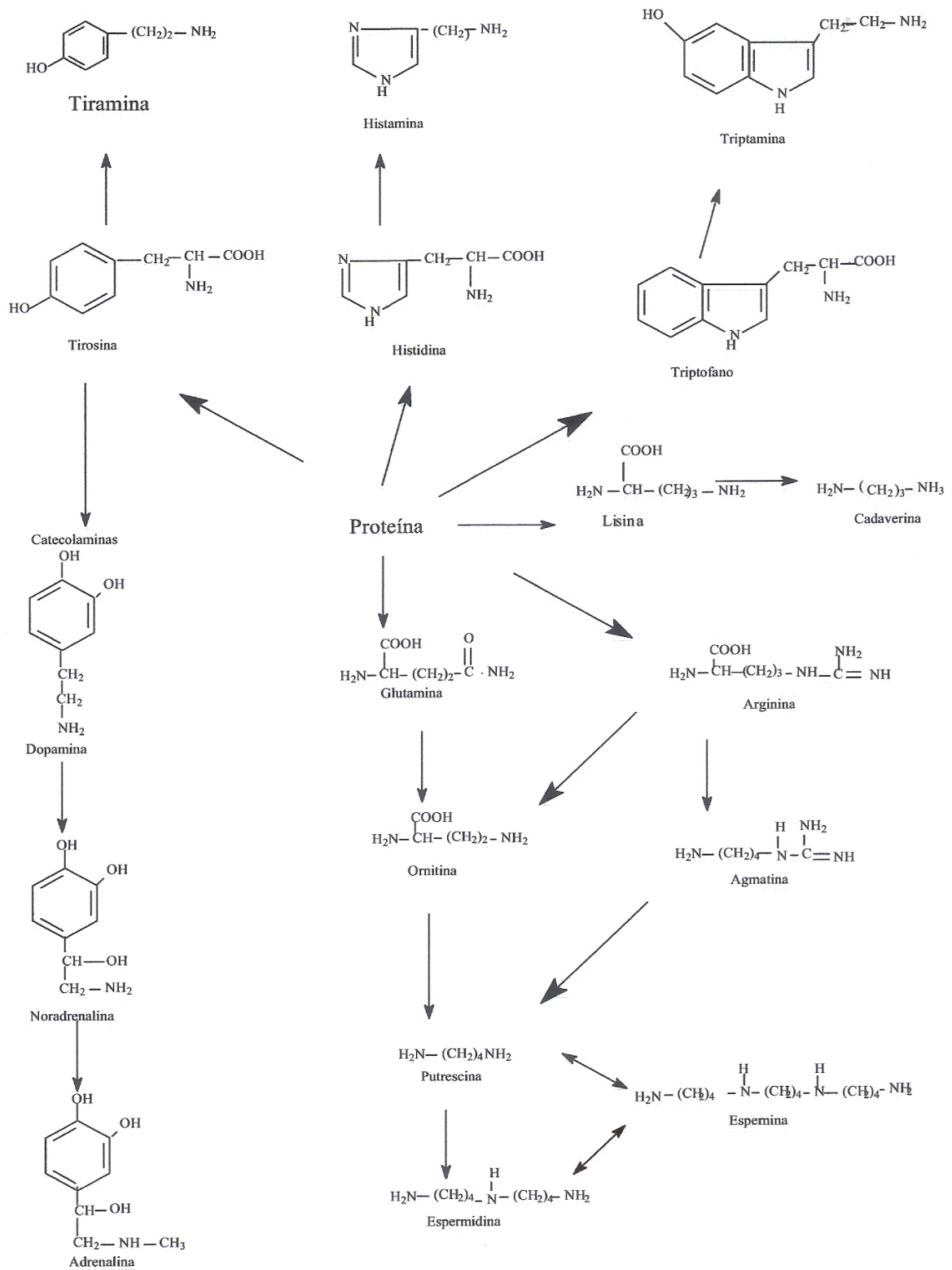


Figura 6- Rota metabólica para a formação de aminas biogênicas (HALÁSZ et al., 1994).

Aminas biogênicas são fontes de nitrogênio e de precursores para a síntese de hormônios, alcalóides, ácidos nucléicos e proteínas. Estes compostos também podem influenciar processos orgânicos, como a regulação da temperatura corporal, ingestão de alimentos, aumento ou diminuição da pressão sanguínea (HÁLASZ et al., 1994).

Poliaminas desempenham papel importante em diversas funções fisiológicas de humanos e animais (BRINK et al., 1990). São importantes para o crescimento, renovação, e metabolismo de cada órgão do corpo e essenciais para manter a alta atividade metabólica do funcionamento normal do sistema imunológico do intestino (BARDOCZ, 1995; SILLA SANTOS, 1996).

Nas plantas, putrescina, espermina e espermidina estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, como a divisão celular (síntese de proteínas, DNA e RNA), desenvolvimento do fruto de floração, resposta ao estresse e senescência, sendo essenciais no crescimento e duplicação da célula. Por outro lado, aminas biogênicas são usualmente produzidas durante o processo final de desnaturação das proteínas, por meio da descarboxilação enzimática, de origem bacteriana, de aminoácidos livres (BARDÓCZ et al., 1993).

O trato intestinal dos mamíferos possui um eficiente sistema de desintoxicação, no qual enzimas monoaminas oxidase (MAO) e diaminas oxidase (DAO) têm papel importante. Por isso, o consumo de alimentos contendo pequenas concentrações de aminas biogênicas não é arriscado, a não ser que o sistema de desintoxicação seja inativo ou geneticamente deficiente. Em grandes concentrações, porém, há efeitos toxicológicos. Os principais sintomas são: náuseas, distúrbios respiratórios, ondas de rubor, transpiração, palpitação, dor de cabeça, erupções na pele, feridas na boca, hiper/hipotensão (RICE et al., 1976).

As aminas biogênicas aromáticas (histamina, tiramina, serotonina, B-feniletamina, triptamina) foram reportadas como vasoativas ou psicoativas e foram associadas à intoxicação, indução alimentar de enxaquecas e severas crises hipertensivas devido à interação com inibidores de monoamina oxidase (MARINÉ-FONT et al., 1995). Além disto, diaminas, como putrescina e cadaverina podem gerar nitrosaminas carcinogênicas na presença de nitritos (SCANLAN, 1983; BRINK et al., 1990). Estes compostos podem, ainda, apresentar odor desagradável e, também, agmatina, espermina e espermidina,

putrescina e cadaverina podem inibir a atividade de aminopeptidases musculares (VIDAL-CAROU et al., 1990; FLORES; ARISTOY; TOLDRA, 1996).

As drogas inibidoras das monoaminooxidasas (IMAO) devem ser monitoradas visto que bloqueiam a desaminação de algumas amins primárias. O uso destas drogas tem sido relatado nos tratamentos de tuberculose, pacientes em crises depressivas, hipertensos, portadores de malária. As IMAO facilitam a absorção intestinal de tiramina e histamina, e potencializam as suas reações (RICE et al., 1976).

A presença de amins biogênicas ocorre, especialmente, em produtos obtidos por fermentação espontânea, sem definição da biota microbiana. Recomenda-se, portanto, selecionar micro-organismos que não apresentem capacidade de produzir amins biogênicas (BRINK et al., 1990; BUCKENHUSKEN, 1993).

A formação de amins biogênicas é um processo extremamente complexo e depende de diversos fatores, como a disponibilidade de aminoácidos livres, que podem ocorrer naturalmente no alimento; mas, na maioria das vezes, são liberados das proteínas como resultados de atividade proteolítica; a microbiota inicial e a sua capacidade produtora de amins biogênicas (presença de micro-organismo descarboxilase positiva), do efeito da cultura starter e de condições ambientais que permitam o crescimento bacteriano, a síntese de descarboxilases e sua atividade (HUIS, 1990; HU et al. 2007).

Diversos autores defendem que a utilização de micro-organismos incapazes de produzir amins biogênicas e a condução de um processo de fermentação controlado constitui um mecanismo de prevenir a formação de altas concentrações destas amins (BOVER-CID et al., 2001; HU et al. 2007).

Amins biogênicas podem ser encontradas em diferentes tipos de alimentos, como queijos, derivados de peixes, cerveja e vinho. Estas amins são indesejáveis em todos os alimentos e bebidas em altas concentrações, pois podem induzir dores de cabeça, disfunções respiratórias, hiper-hipotensão e diversos distúrbios alérgicos (SILLA-SANTOS, 1996). Constituem um risco potencial a saúde, especialmente em conjunto com fatores de risco adicionais, tais como inibidores de monoamina oxidase, álcool e distúrbios gastrintestinais (STRATTON, 1991).

As amins consideradas mais tóxicas são histamina e tiramina, tendo sido observado diversos surtos de intoxicação por histamina em vários países (CHEN et al., 2008).

De acordo com Becker et al. (2001) a intoxicação por histamina tem um curto período de incubação, variando de minutos a algumas horas após a ingestão. Os sintomas incluem dor de cabeça, rubor facial e transpiração, erupção cutânea e prurido, palpitações, náuseas, vômitos e diarreia.

Aminas biogênicas são conhecidas precursores em potencial de nitrosaminas carcinogênicas e têm sido considerados bons indicadores da deterioração em alimentos fermentados ou não (ROSEIRO et al., 2006; SUZZI e GARDINI, 2003; OZOGUL e KULEY, 2008).

A dose tóxica de aminas é muito difícil de ser estabelecida, pois isto depende das características individuais, da presença de outras aminas e da eficiência do mecanismo de detoxificação de diferentes indivíduos (HALÁSZ, et al., 1994; GLÓRIA et al., 1998). Geralmente, doses de 0,05 a 0,5 mg intravenosa e 3 a 6 mg subcutânea de aminas são consideradas tóxicas para uma pessoa adulta (SOUFLEROS et al., 1998).

Alguns governos nacionais têm implementado regulamentos legais, ou, no mínimo, recomendam um conteúdo máximo de histamina em certos alimentos e bebidas. Um limite legal de 100 mg de histamina/kg de alimento e 2 mg de histamina por litro de bebidas alcoólicas tem sido sugerido. Valores de 100-800 mg/kg para tiramina e 30 mg·Kg<sup>-1</sup> para feniletilamina tem sido reportado como doses tóxicas em alimentos (BRINK et al., 1990; HALÁSZ et al., 1994). Ienistea (1973), reportou que níveis de histamina entre 5 e 10 mg em 100 g de alimento podem causar sintomas em indivíduos mais sensíveis; níveis entre 10 e 100 mg são potencialmente tóxicos e acima de 100 mg apresentam toxicidade elevada. Segundo Bataglia e Frölich (1978), uma concentração de 5 mg·L<sup>-1</sup> de histamina pode provocar dores de cabeça após o consumo de 0,5 L de vinho.

A concentração de 8 mg·L<sup>-1</sup> de histamina, segundo Glória et al. (1998), já pode provocar dores de cabeça quando grandes quantidades de vinho são ingeridas. Soufleros et al. (1998) colocam como 20 mg·L<sup>-1</sup> uma concentração de histamina capaz de causar riscos fisiológicos.

Sugere-se uma dose tóxica para a histamina de 100 mg·100g de alimento e 2 mg de histamina por litro de bebidas alcoólicas (HALÁSZ et al., 1994).

## 2.1- Aminas biogênicas em bebidas alcoólicas

Bebidas alcoólicas constituem uma categoria de produtos fermentados, que podem apresentar quantidades substanciais de aminas biogênicas, como mostrado em cervejas (DUMONT; DE GEETER; HYUGHEBAERT, 1992; FERNANDES et al. 2001; IZQUIERDO-PULIDO et al. 1996; KALAC; HLAVATA; KRIZECK, 1997), vinhos (CARUSO et al., 2002; CSOMOS; HEBERGER; SIMON-SARKADI, 2002; HAJOS et al. 2000; KALAC e KRIZECK, 2003; KANNY et al., 2001; LEITÃO et al. 2000; TORREA e ANCIN, 2002), espumantes (DEL-CAMPO et al., 2000) e mosto de uva e vinho (LANDETE; FERRER; PARDO, 2005; LEHTONEN, 1996; SOUFLEROS et al., 1998).

A produção de histamina, tiramina e putrescina pelas bactérias lácticas isoladas do vinho foram estudadas por diferentes autores (LANDETE; FERRER; PARDO, 2005; MORENO-ARRIBAS et al., 2003; LE JEUNE et al., 1995). Outros micro-organismos (leveduras e bactérias lácticas) e outras aminas (feniletilamina e cadaverina) receberam pouca ou nenhuma atenção.

Boza é uma bebida fermentada feita de milho, trigo ou arroz, comum na Turquia e em estudo avaliando a presença de aminas biogênicas foram detectadas nesta bebida putrescina, espermidina e tiramina em todas as amostras. Os teores totais de aminas biogênicas nas amostras variaram entre 25 e 69 mg·Kg<sup>-1</sup>, sendo que tiramina, a amina predominante, foi encontrada em concentrações de 13 a 65 mg·Kg<sup>-1</sup>. Consequentemente, o consumo de boza pode representar um risco a saúde, principalmente para pacientes que estão sendo tratados com medicamentos contendo inibidores da monoamina oxidase (IMAO) (YEGIN E ÜREN, 2008).

Segundo Lasekan e Lasekan (2000) as aminas biogênicas, tiramina, putrescina, cadaverina, 2-feniletilamina, histamina e triptamina foram determinadas em sete tradicionais bebidas alcoólicas produzidas na Nigéria. Os valores encontrados são indesejáveis, pois nas concentrações encontradas, as aminas podem causar danos à saúde.

Existem poucos estudos sobre a produção de aminas não-voláteis por leveduras durante a fermentação alcoólica de mosto de uva e vinho (BUTEAU; DUTSCHAEVER; ASHTON, 1984). Torrea e Ancin (2002) observaram a produção de isoamilamina e etilamina em vinho e Caruso et al. (2002) estudaram a produção de etanolamina e agmatina por leveduras em vinho Chadornnay.

As técnicas de separação de aminas empregadas para a determinação de histamina em vinho incluem, principalmente, a cromatografia gasosa (FERNANDES e FERREIRA, 2000) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (VIDAL-CAROU et al., 2003) sendo que as duas técnicas são seletivas e sensíveis, permitindo a detecção de pequenas quantidades de aminas. A análise de aminas bioativas em alimentos por CLAE tem aumentado, já que oferece a vantagem de separação e quantificação simultânea de aminas (BAZUZA et al., 1995). No entanto, a maioria das aminas não apresenta absorção ultravioleta natural ou fluorescência. Por esta razão, a derivatização química é necessária para detectá-las CLAE (GLÓRIA et al., 1998).

### 3- CARBAMATO DE ETILA

O carbamato de etila ( $\text{H}_2\text{NCOOC}_2\text{H}_5$  ou  $\text{EtOCONH}_2$ ), uretana ou etiluretana é o éster etílico do ácido carbâmico e se apresenta na forma de cristal incolor, inodoro, de sabor salino refrescante e levemente amargo (Figura 7) (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001). É um composto potencialmente carcinogênico e forma-se naturalmente em alimentos fermentados tais como pão, iogurte, vinho, cerveja, saquê e, principalmente, em bebidas fermento-destiladas tais como uísque, rum, vodca, grapa, cachaça e tiquira e em alguns casos pode atingir níveis elevados (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002; ARESTA et al., 2001; BRAGA, 2006).

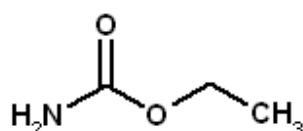


Figura 7 - Fórmula estrutural do Carbamato de etila

Apresenta ponto de fusão entre 48 e 50 °C, ponto de ebulição entre 182 e 184 °C (NAGATO; NOVAES; PENTEADO, 2003; NOVAES, 1996) e massa molar  $89,09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . É muito solúvel em água, álcoois, éter, cetonas, ésteres, benzeno, clorofórmio, glicerol, azeite de oliva e solventes clorados. A solução aquosa é neutra. O modo industrial de obtenção do carbamato de etila é por meio do aquecimento de uréia com álcool etílico sob

pressão (NAGATO; NOVAES; PENTEADO, 2003; BATTAGLIA; CONACHER; PAGE, 1990).

As principais rotas de exposição humana são inalação, ingestão e contato da pele. Exposição aguda a altos níveis de carbamato de etila pode prejudicar o fígado, rins, sistema nervoso central e sistema hematopoiético. Os sintomas incluem tonturas, vômito, perda da consciência, coma e hemorragias. Estudos comprovaram a toxicidade do carbamato em fetos e sua correlação com um aumento da ocorrência de câncer em animais de laboratório (BRAGA, 2006).

De acordo com Nettleship et al. (1993) no início do século 20, o carbamato de etila era freqüentemente administrado em humanos como um anestésico em cirurgias. A alta incidência de câncer de pulmão em pacientes cirúrgicos foi a primeira evidência para comprovação da toxicidade do etil carbamato. A elucidação da rota de bioativação e estudos complementares sobre a sua carcinogenicidade mostraram sua prevalência e mecanismo de ação (ASHBY, 1991; GUENGERICH e KIM, 1991; LEITHAUSER et al., 1990).

Estudos mostram que epóxidos carbamato de vinil são altamente reativos e podem interagir com os nucleotídeos livres, bem como RNA e DNA e induzir mutações (DAHL et al., 1978; LEITHAUSER et al., 1990; PARK et al., 1993; SCHLATTER e LUTZ, 1990; ZIMMERLO et al., 1991). Outras evidências de que o carbamato de etila seja potencialmente carcinogênico é que sua presença aumenta a ocorrência de câncer no fígado e pulmão de camundongos machos e fêmeas. Além disso, a incidência de câncer de mama e ovário, bem como de pele e intestino foi substancialmente aumentada em ratos fêmeas e machas, respectivamente (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH PROGRAMA NACIONAL DE TOXICOLOGIA, 2004).

Há um consenso que o teor de carbamato de etila em alimentos deva ser o menor possível (BOSCOLO, 2001). Novaes (1996) sugeriu que a quantidade máxima de carbamato de etila supostamente tolerável na ingestão diária de seres humanos seria de  $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de peso corpóreo.

O Canadá, em 1985, por meio do “Health and Welfare Department”, estabeleceu os seguintes teores máximos de carbamato de etila para bebidas alcoólicas: vinhos  $30,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; vinhos fortificados  $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; bebidas destiladas  $150,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; destilados de frutas e

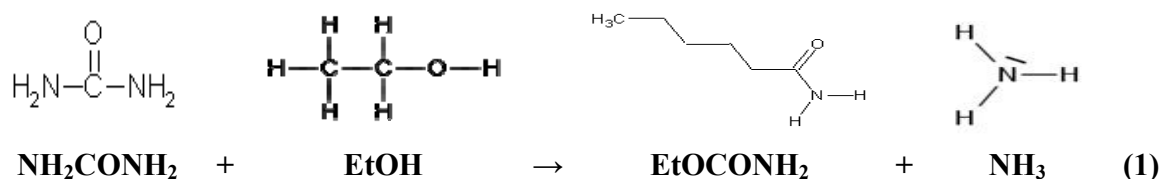
licores  $400,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . A comparação entre os teores de carbamato de etila em bebidas alcoólicas brasileiras com os limites estabelecidos pelo Canadá é inevitável, em função de este ser, até o momento, o único país a possuir legislação específica sobre o assunto, sendo um referencial para os EUA e para a Comunidade Européia (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002; ARESTA et al., 2001). Em março de 1990, o FDA (“U.S. Food and Drug Administration”) publicou nota na qual os produtores de uísques americanos se comprometeram, a partir daquela data, a limitar o teor de carbamato de etila em  $125 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

O Ministério da Agricultura, por meio da Instrução Normativa N° 13 de 29 de junho de 2005, promoveu mudanças nas exigências desta bebida, como a inclusão do limite de  $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  do contaminante carbamato de etila (BRASIL, 2005).

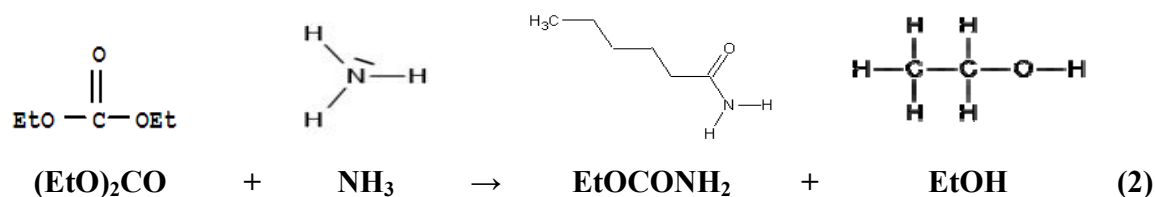
Para o Brasil, um dos maiores produtores de bebidas destiladas do mundo, é de extrema importância a análise e quantificação do carbamato de etila em tais produtos, pois além dos aspectos ligados à saúde pública, a sua presença em concentrações superiores a  $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  constitui uma barreira para exportações para a Europa e América do Norte (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002).

### 3.1- Formação do carbamato de etila em bebidas alcoólicas

Carbamato de etila é obtido industrialmente pela reação direta da uréia e etanol (equação 1) (BATTAGLIA; CONACHER; PAGE, 1990).



Ough (1976) estudou a formação deste composto a partir do dietilcarbamato, um aditivo utilizado para controlar a atividade microbiana, por reação com a amônia no vinho (equação 2).



O carbamato de etila é encontrado naturalmente, em baixas concentrações em diferentes bebidas alcoólicas e em alguns alimentos fermentados (NAGATO; NOVAES; PENTEADO, 2003; BERTRAND; BERTSCH; SEGUR, 1990; AYLOTT; MCNEISH; WALKER, 1987).

Diferentes rotas metabólicas têm sido observadas na formação de carbamato de etila em bebidas destiladas, de acordo com a natureza do alimento ou bebida considerado e dos precursores disponíveis na matéria-prima. De forma geral, sua formação envolve a reação entre etanol e precursores nitrogenados: uréia, fosfato de carbamila e cianeto, sendo este último importante precursor durante e após o processo de destilação (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002; ARESTA et al., 2001).

Em aguardentes de frutas são encontrados os valores mais elevados de carbamato de etila. Por exemplo, em aguardentes de cereja, damasco ou ameixa tem-se encontrado valores entre 100 e 12000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Quando se observa uísques, o do tipo “Bourbon” normalmente contém teores de carbamato de etila que chegam a 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . São detectados teores de carbamato de etila bem baixos em cerveja, até 6,6  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Os valores de carbamato de etila normalmente encontrados em vinhos de mesa variam desde não detectados a 30  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (OUGH, 1988).

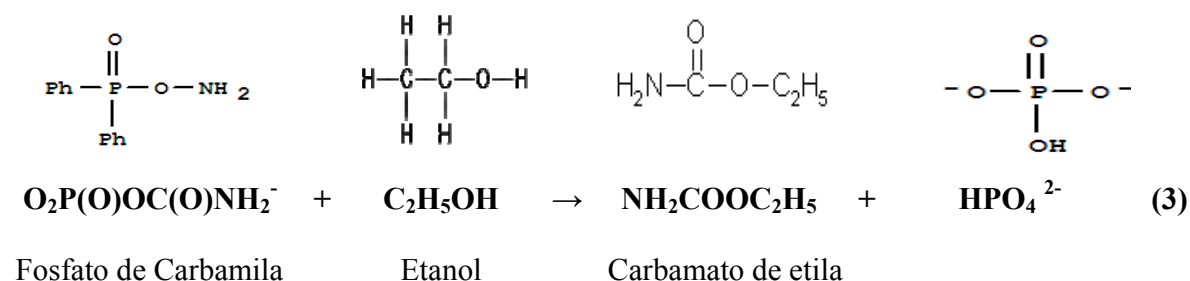
Foram detectados valores de carbamato de etila de até 60  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  em vinhos com maior concentração de álcool etílico (fortificados). Em saquês foram detectados teores de carbamato de etila de 5 a 60  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Alimentos fermentados apresentam teores bem baixos de carbamato de etila, geralmente até 5  $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ . Porém, pães e molhos de soja podem conter quantidades maiores, até 60  $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ . Nas aguardentes de cana brasileiras são encontrados altos níveis de carbamato de etila, variando desde 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a 1500  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (NAGATO; NOVAES; PENTEADO, 2003).

Vários fatores são importantes para a formação de carbamato de etila em bebidas destiladas, porém ainda não existe uma explicação satisfatória sobre a sua influência nas cachaças (ANDRADE-SOBRINHO, 2002), apesar de ser considerado um dos seus principais defeitos (ANDRADE-SOBRINHO, 2009).

Em bebidas destiladas, a formação do carbamato de etila pode ocorrer antes, durante e após a etapa de destilação pela reação do etanol com alguns compostos nitrogenados (MACKENZIE et al., 1990). O produto fermentado aquecido, como em bebidas destiladas,

tem o seu nível de carbamato de etila aumentado ainda mais. Esta formação é dependente da concentração dos reagentes, temperatura, pH, luz e tempo de armazenamento (NAGATO; NOVAES; PENTEADO, 2003). O problema não está somente na fermentação ou durante a destilação, mas no próprio destilado (AYLOTT et al., 1990; MacKENZIE et al., 1990; RIFFIKIN et al., 1989).

Fosfato de carbamila produzido pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode reagir com etanol e formar carbamato de etila no vinho (equação 3). O fosfato de carbamila é proveniente da síntese de arginina catalizada pela “carbamila sintase” envolvendo ATP, CO<sub>2</sub> e amônia (INGLEDEW, 1987).

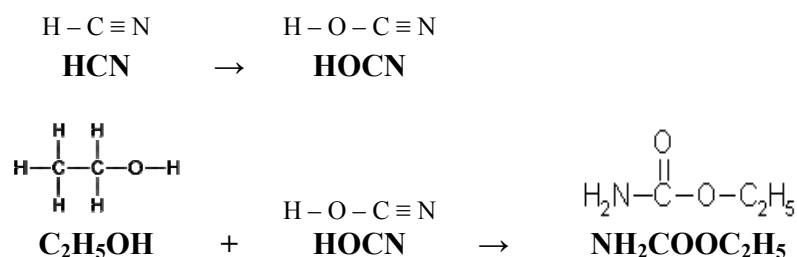


A formação antes da destilação provavelmente segue a mesma rota descrita pela equação 3, mas sua contribuição para o valor total é insignificante, pois o carbamato de etila tem ponto de ebulição entre 182 e 184 °C, sendo quase todo removido na destilação (COOK et al., 1990).

### - Participação do íon cianeto

O íon cianeto tem sido indicado como o mais importante precursor de carbamato de etila em aguardentes (Esquema 1) (MACKENZIE et al., 1990). É formado por ação enzimática e clivagem térmica de glicosídeos cianogênicos (COOK et al., 1990; BATTAGLIA; CONACHER; PAGE, 1990).

Esquema 1

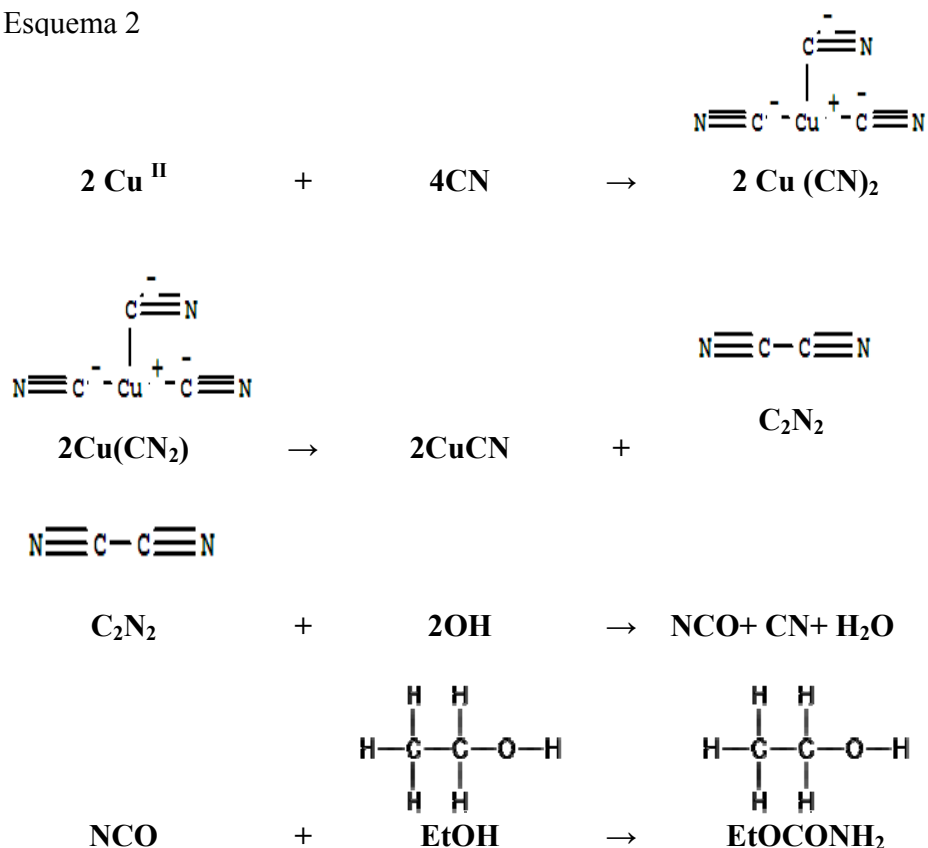


A cana-de-açúcar, matéria-prima da cachaça brasileira é classificada como cultura cianogênica, mas a origem de cianeto é ainda desconhecida (JONES, 1998).

Duas rotas têm sido propostas como mais prováveis para a formação do carbamato de etila a partir do cianeto. A primeira é baseada na complexação de cianeto e  $\text{Cu}^{\text{II}}$  seguido da oxidação a cianogênio, com posterior desproporcionamento a cianato e cianeto (BEATTIE e POLYBANK, 1995). Cianato pode reagir com etanol para formar carbamato de etila (Esquema 2). O cobre é mais comumente liberado do equipamento de destilação, alambique, coluna ou parte deles, pela corrosão (BOSCOLO, 2001).

Com objetivo de melhorar as características sensoriais das bebidas destiladas em colunas feitas exclusivamente em aço inoxidável, empregou-se partes em cobre no aparelho destilador, assim as propriedades sensoriais negativas são notadamente diminuídas. Por outro lado pode favorecer consideravelmente a formação de carbamato de etila (FARIA, 1993).

Esquema 2



Riffikin et al. (1989) estudaram a formação de carbamato de etila durante a destilação de uísques. As destilações foram realizadas em alambique feito totalmente de cobre e em destilador feito totalmente de vidro, e verificaram que a formação de carbamato de etila ocorreu somente quando a destilação foi realizada em presença de cobre. O aumento dos níveis naturais de carbamato de etila após a destilação, ocorreu apenas quando o cobre esteve presente durante e após a destilação, e esta foi dependente do tempo; quanto maior o tempo de armazenamento, maior a formação de carbamato de etila. No fermentado destilado em equipamento de vidro, nenhuma formação significativa de carbamato de etila ocorreu, ficando abaixo de  $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

O mecanismo de formação de carbamato de etila é dependente do contato do cobre com alguns compostos protéicos presentes no mosto, durante a destilação nas fases líquidas e vapor (RIFFKIN et al., 1989).

Andrade-Sobrinho et al. (2002) analisaram 126 amostras de aguardentes de cana de diferentes regiões produtoras no país e verificaram que o teor médio de carbamato de etila foi de  $770 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , variando de 13 a  $5700 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e que apenas 21 % das amostras analisadas apresentaram teores menores que  $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , valor considerado internacionalmente aceitável, tendo como um dos fatores responsáveis por essa variação do teor médio de carbamato o sistema de destilação empregado.

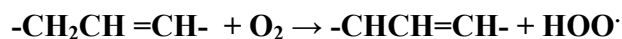
Quando o cobre é empregado na parte ascendente do fluxo, como ocorre nos alambiques, é esperado que ocorra uma fixação de cianeto (MacKENZIE et al., 1990), com a formação de compostos como:  $\text{CuCN}$ ,  $\text{Cu}(\text{CN})_2$ ,  $\text{Cu}_2(\text{CN})_3$ ,  $\text{Cu}_3(\text{CN})_4$ , diminuindo a concentração de cianeto no destilado (BOSCOLO, 2001) e conseqüentemente, reduzindo o teor de carbamato de etila (ANDRADE-SOBRINHO, 2002).

A segunda rota é baseada na auto-oxidação com luz ultravioleta de compostos insaturados presentes em bebidas alcoólicas, que produzem os radicais livres (orgânicos ou hidroperóxidos), que catalisam a oxidação de cianeto a cianato (Esquema 3) (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001).

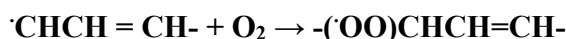
Os fatores que influenciam a formação de carbamato de etila a partir de cianeto são pH, luz, teor de etanol, temperatura, proximidade de grupos carbonila em moléculas orgânicas, e concentração de íons  $\text{Cu}^{\text{II}}$  na bebida (BATTAGLIA; CONACHER; PAGE, 1990; RIFFIKING et al., 1989).

Esquema 3

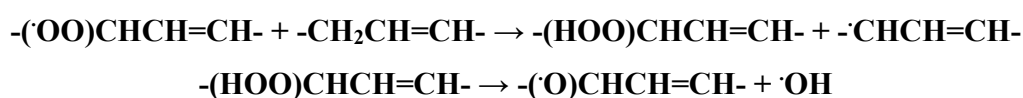
Período de iniciação



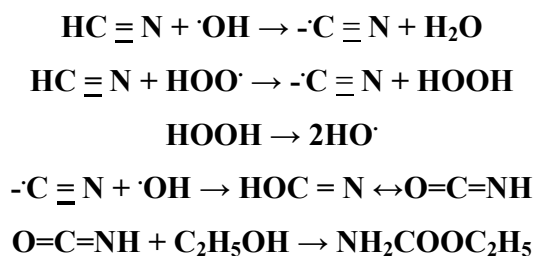
Período de propagação



Período de oxidação própria



Hipótese de formação do carbamato de etila



Cianato e sua forma de isocianato tautomérica têm sido apontados como intermediários da formação do carbamato de etila na reação de etanol com uréia e cianeto (TAKY et al., 1992). No entanto, uma cinética de primeira ordem foi relatado para a decomposição de isocianato e cinética de ordem zero para a formação do carbamato de etila, indicando uma reação intermediária para a conversão em cianato de carbamato de etila (BOURTON, 1992).

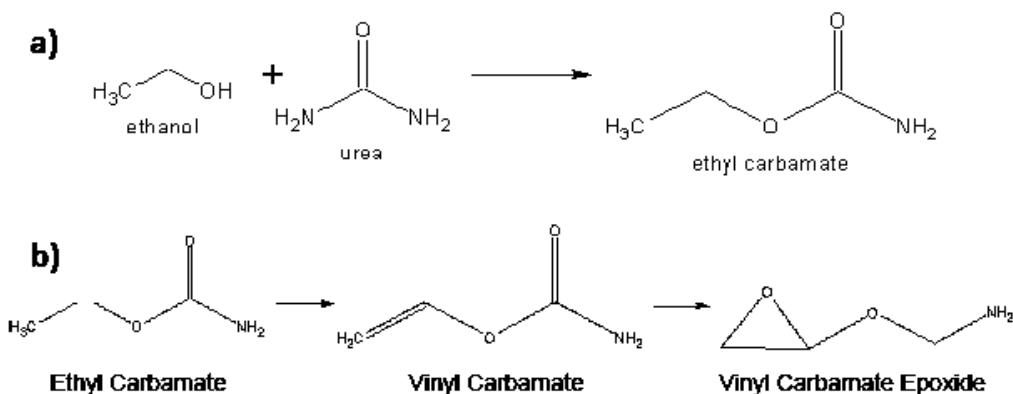
Vários fatores ainda devem ser estudados para elucidar a reação que gera carbamato de etila a partir de precursores nitrogenados em aguardentes e o papel dos íons metálicos (Cu e outros) (ARESTA, 2001).

#### **- Participação da uréia**

A uréia era comumente adicionada à dorna de fermentação, como fonte de nitrogênio para as leveduras, porém, atualmente, sabe-se que não é aconselhável, pois este

composto pode reagir com o etanol produzindo o carbamato de etila, o qual é considerado carcinogênico, não sendo mais utilizado (LABANCA, 2004).

Em pesquisas realizadas no Canadá, percebeu-se que a uréia poderia contribuir para a formação do carbamato de etila, mas que também, quando não adicionada, esta formação também ocorria (POLASTRO, et al., 2001; BATTAGLIA; CONACHER; PAGE, 1990).



**Figura 8-** Reação de síntese e via de bioativação do carbamato de etila. a) A síntese do CE nos resultados a partir da reação espontânea de etanol e uréia. b) A degradação epóxido produto da CE se liga ao DNA, causando danos e resultando em aumento das taxas de câncer em animais de laboratório.

A uréia é um metabólito natural formado no metabolismo dos aminoácidos (ex.: arginina) e do ácido nucléico, podendo estar sempre presente nos processos de fermentação alcóolica, embora em pequenas quantidades, possibilitando a formação de carbamato de etila (NAGATO; NOVAES; PENTEADO, 2003; BATTAGLIA; CONACHER; PAGE, 1990).

Derivados naturais da uréia ou precursores como alantoína, ácido  $\beta$ -ureidopropiônico, citrulina (BATTAGLIA; CONACHER; PAGE, 1990; MACKENZIE et al., 1990) e vários N-carbamil  $\alpha$ -aminoácidos têm sido mostrados como precursores do carbamato de etila, mas somente em modelos experimentais (AYLOTT et al., 1990; BATTAGLIA; CONACHER; PAGE, 1990).

Sob condições ambientais de armazenagem o etanol reage com compostos carbamil presentes em bebidas fermentadas para formar carbamato de etila (INGLEDEW; MAGNUS; PATTERSON, 1987; KODAMA et al., 1994; OUGH et al., 1988) de maneira

dependente do tempo e temperatura. Compostos carbamil potencialmente reativos incluem citrulina e fosfato de citrulina, resultante do metabolismo da arginina e nucleotídeos, bem como a uréia (OUGH et al, 1988; ANDRADE-SOBRINHO, 2009).

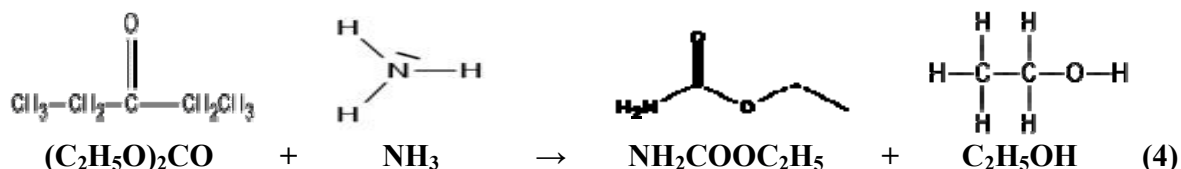
A elevação da temperatura nas etapas do processamento do produto acelera a formação de carbamato de etila (ARESTA et al., 2001; AYLOTT et al., 1990; BATTAGLIA; CONACHER; PAGE, 1990).

Polastro et al. (2001) e Battaglia; Conacher; Page (1990) associaram positivamente a presença de uréia e a formação de carbamato de etila, porém observaram que mesmo na ausência da uréia ocorreu sua formação.

Segundo Battaglia; Conacher; Page (1990), a uréia, obtida da degradação da arginina, é responsável por 40 a 50 % do carbamato de etila formado durante a fermentação do suco de uva “Chardonnay”.

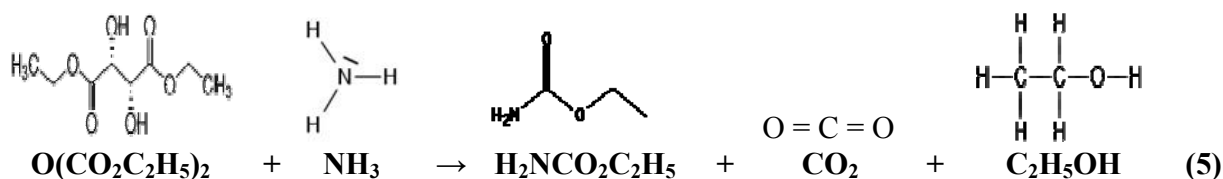
#### - Participação do carbonato de dietila e amônia

Segundo Aresta et al. (2001) o carbonato de dietila, um aditivo alimentar utilizado para controlar a atividade microbiana, tem sido investigado como um possível precursor na formação do carbamato de etila, pela possibilidade de reagir com amônia em vinhos (Equação 4).



#### - Participação do dietil piracarbonato (DEPC) e amônia

Estudos demonstraram que a decomposição do (DEPC) na presença de amônia ocasiona a formação de carbamato de etila (Equação 5), em função disso, foram impostas diversas restrições à utilização deste antimicrobiano em alimentos (BATTAGLIA; CONACHER; PAGE, 1990).



#### 4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE-SOBRINHO, L.G. de; BOSCOLO, M.; LIMA-NETO, B.S.; FRANCO, D.W. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa). **Quím. Nova**, Vol. 25, No. 6B, p.1074-1077, 2002.

ANDRADE-SOBRINHO, L.G. de; CAPPELINI, L.T.D.; SILVA, A.A.; GALINARO, C.A.; BUCHVISER, S.F.; CARDOSO, D.R.; FRANCO, D.W. Teores de carbamato de etila em aguardentes de cana e mandioca. Parte II. **Quím. Nova**, Vol. 32, No. 1, 116-119, 2009.

ARESTA, M.; BOSCOLO, M.; FRANCO, D.W. Cooper (II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions. **J. Agric.Food Chem.**, Washington, v. 49, n. 6, p. 2819-2824, 2001.

ASHBY, J. Genotoxicity data supporting the proposed metabolic activation of ethyl carbamate (urethane) to a carcinogen: the problem now posed by methyl carbamate. **Mutat. Res.** 260, 307-308, 1991.

AYLOTT, R.I.; MCNEISH, A.S.; WALKER, D.A. Determination of ethyl carbamate in distilled spirits using nitrogen specific and mass spectrometric detection. **J. Inst. Brew.**, London, vol. 93, n. 5, p. 382-386, 1987.

AYLOTT, R.I.; COCHRANE, G.C.; LEONARD, M.J.; MACDONALD, L.S.; MACKENZIE, W.M.; MCNEISH, A.S.; WALKER, D.A. Ethyl carbamate formation in grain based spirits. Part I: Post-distillation ethyl carbamate formation in maturing grain whisky. **J. Inst. Brew.**, London, v. 96, n. 4, p. 213-221, 1990.

BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends Food Sci. Technol.** v.6, p.341-346, 1995.

BATTAGLIA, R.; CONACHER, R.B.S.; PAGE, B.D. Ethyl carbamate (urethana) in alcoholic beverages and foods: a review. **Food Addit. Contam.**, London, v. 7, n. 4, p. 477-496, 1990.

BEATTIE, J.K.; POLYBLANK, G.A. Copper-catalysed oxidation of cyanide by peroxide in alkaline aqueous solution. **Aust. J. Chem.** 48, 861-868, 1995.

BECKER, K.; SOUTHWICK, K.; REARDON, J.; BERG, R.; MACCORMACK, J.N. Histamine poisoning associated with eating tuna burgers. **Jama**, 285(10), 1327-1330, 2001.

BERTRAND, A.; BERTSCH, K.; SEGUR, M.C. **Elimination du précurseur du carbamate d'éthyle dans les eaux-de-vie de vin.** In: 1<sup>o</sup> Symposium International sur les eaux-de-vie traditionnelles d'origine viticole, Lavoisier – TECE DOC, Paris, p. 189 – 194, 1990.

BOSCOLO, M. **Caramelo e carbamato de etila em aguardente de cana. Ocorrência e quantificação.** São Paulo. Tese (Doutorado em Ciências em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 100 f., 2001.

BOURTON, R. **The formation of ethyl carbamate from isocyanate and ethanol at elevated temperatures.** In *Elaboration et Connaissance des Spiriteux*; Cantagrel, R., Ed.; Tec e Doc: Paris, France, pp 339–343, 1992.

BOVER-CID, S.; HUGAS, M.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VIDAL-CAROU, M.C. Aminoacid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. **Int. J. of Food Microb.**, 66 (3), 185–189, 2001.

BRAGA, S.V. **A Influência da temperatura na condução de dois processos fermentativos para produção de cachaça.** Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. (Dissertação de Mestrado) Piracicaba, 90 p., 2006.

BRASIL. Decreto nº 4.851 – 02 de outubro de 2003. Altera dispositivos do Regulamento aprovado pelo Decreto nº 2.314, de 04 de setembro de 1997, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa Nº 13 de 29 de junho de 2005. **Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça.** Diário Oficial (da República Federativa da Brasil), Brasília, n. 124, quinta-feira, 30 de junho de 2005. Seção 1.

BRINK, B.; DAMINK, C.; JOOSTEN, H.M.; HUIS IN’T VELD, J.H.J. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. **Int. J. Food Microbiol.** v.11, p. 73 – 84, 1990.

BUCKENNHUSES, H.J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. **FEMS Microbiol. Reviews.** v. 12, p. 253 – 272, 1993.

BUTEAU, C., DUISCHAEVER, C.L.; ASHTON, G.C. High-performance liquid chromatographic detection and quantization of amines in must and wine. **J. Chromat.**, 284, 201–210, 1984.

CARDOSO, M.G. **Produção de aguardente de cana.** 2 ed. Lavras. Editora UFLA, 445 p., 2006.

CARUSO, M.; FIORE, C.; CONTURSI, M., SALZANO, G.; PAPARELLA, A.; ROMANO, P. Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. **J. Microbiol. and Biotechnol.**, 18, 159–163, 2002.

CHEN, H.C., KUNG, H.F., CHEN, W.C., LIN, W.F., HWANG, D.F., LEE, Y.C. Determination of histamine and histamine-forming bacteria in tuna dumpling implicated in a food-borne poisoning. **Food Chem.**, 106(2), 612–618, 2008.

COOK, R.; MACCAIG, N.; MACMILLIAN, J.M.B.; LUMSDEN, W.B. Ethyl carbamate formation in grain-based spirits. Part III. The primary source. **J. Inst. Brew**, 96, 233–244, 1990.

CSOMOS, E.; HEBERGER, K.; SIMON-SARKADI, L. Principal component analysis of biogenic amines and polyphenols in Hungarian wines. **J. of Agricult. and Food Chem.**, 50, 3768–3774, 2002.

DEL-CAMPO, G.; LAVADO, I.; DUENAS, M.; IRASTORZA, A. Histamine production by some lactic acid bacteria isolated from ciders. **Food Sci. and Technol. Int.**, 6, 117–121, 2000.

DUMONT, E.; DE GEETER, H.; HYUGHEBAERT, A. Presence and formation of biogenic amines in local Belgian beers. **Mededelingen Faculteit Landbouwwetens Chappen Universite Gent**, 57, 1911–1913, 1992.

FERNANDES, J.O.; JUDAS, I.C.; OLIVEIRA, M.B.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; FERREIRA, M.A. A GC-MS method for quantitation of histamine and other biogenic amines in beer. **Chromat.**, 53, 327–331, 2001.

FLORES, M.; ARISTOY, M.C.; TOLDRA, F. Biogenesis polyamines affect activity of aminopeptidase B and alanyl aminopeptidase from porcine skeletal muscle. **J. Food Sci.** v.61, p. 13-27, 1996.

GLÓRIA, M.B.A.; DAESCHEL, M.A.; WATSON, B.; SIMON-SARKADI, L. **Am. J. Enol. Vitic.**, 49, 280, 1998.

GLÓRIA. M.B.A. Metabólitos microbianos- Aminas Biogênicas. Microbiologia de Alimentos: **Qualidade e Segurança na produção e Consumo**, UFV, Viçosa, p.91-114, 2003

GUENGERICH, F.P.; KIM, D.H. Enzymatic oxidation of ethyl carbamate to vinyl carbamate and its role as an intermediate in the formation of 1,6 N-ethenoadenosine. **Chem. Res. Toxicol.** 4, 413 - 421, 1991.

HAJOS, G.; SASS-KISS, A.; SZERDAHELYI, E.; BARDOCZ, S. Changes in biogenic amine content of Tokai grapes, wines, and aszu-wines. **J. of Food Sci.**, 65, 1142–1144, 2000.

HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends Food Sci. Technol.** 5:42-49, 1994.

HU, Y.; XIA, W.; LIU, X. Changes in biogenic amines in fermented silver carp sausages inoculated with mixed starter cultures. **Food Chem.**, 104(1), 188–195, 2007.

HUIS IN'T VELD, J.H.J.; HOSE, H.; SCHAAISMA, G.J.; SILLA, H.; SMITH, J.E. Health aspects of food biotechnology. **Processing and Quality of Foods**. v.2, 1990.

IZQUIERDO-PULIDO, M.; ALBALA-HURTADO, S.; MARINE-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.C. Biogenic amines in Spanish beers: Differences among breweries. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, 203, 57–511, 1996.

JONES, D.A. Why are so many food plants cyanogenic? **Phytochem.**, 47(2), 155–162, 1998.

KALAC, P.; HLAVATA, V.; KRIZECK, M. Concentrations of five biogenic amines in Czech beers and factors affecting their formation. **Food Chem.**, 58, 209–214, 1997.

KALAC, P.; KRIZECK, M. A review of biogenic amines and polyamines in beer. **J. Inst. Brew.**, 109, 123–128, 2003.

KANNY, G.; GERBAUX, V.; OLSZEWSKI, A.; FREMONT, S.; EMPEREUR, F.; NABET, F.; CABANIS, J.C.; MONERET-VAUTRIN, D.A. No correlation between wine intolerance and histamine content of wine. **J. Allergy and Clin.Immun.**, 107, 375–378, 2001.

KODAMA, S.; SUZUKI, T.; FUJINAWA, S.; DE LA TEJA, P.; YOTSUZUKA, F. Urea Contribution to Ethyl Carbamate Formation in Commercial Wines During Storage. **Am. J. Enol. Vitic.** 45, 17-24, 1994.

LABANCA, R.A.; GLÓRIA, M.B.A.; AFONSO, R.J.C.F. Determinação de carbamato de etila em aguardentes de cana por GC-EM. **Quím. Nova**, 31(7), 1860–1864, 2008.

LANDETE, J.M.; FERRER, S.; PARDO, I. Which are the lactic acid bacteria responsible of histamine production in wine? **J. Appl. Microbiol.**, 99, 580–586, 2005.

LE JEUNE, C.; LONVAUD-FUNEL, A.; TEN BRINK, HOFSTRA, H.; VAN DER VOSSEN, J.M.B.M. Development of a detection system for histidine decarboxylating lactic acid bacteria on DNA probes, PCR and activity test. **J. Appl. Bacteriol.**, 78, 316–326, 1995.

LEHTONEN, P. Determination of amines and amino acids in wine – A review. **American J. Enol.and Viticult.**, 47, 127–133, 1996.

LEITAO, M.C.; TEIXEIRA, H.C.; CRESPO, M.T.B.; SAN ROMAO, M.V. Biogenic amines occurrence in wine amino acid decarboxylase and proteolytic activities expression by *Oenococcus oeni*. **J. Agricult.l and Food Chem.**, 48, 2780–2784, 2000.

LEITHAUSER, M.T.; LIEM, A.; STEWART, B.C.; MILLER, E.C.; MILLER, J.A. 1,6 N-ethenoadenosine formation, mutagenicity and murine tumor induction as indicators of the generation of an electrophilic epoxide metabolite of the closely related carcinogens ethyl carbamate (urethane) and vinyl carbamate. **Carcinog.** 11, 463-473, 1990.

LIMA, A.S.; GLÓRIA, M.B.A. Aminas bioativas em alimentos. **Bol. SBCTA** 33(1):70-79, 1999.

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

LASEKAN, O.O; LASEKAN, W.O. Biogenic amines in traditional alcoholic beverages produced in Nigeria. **Food Chem.** v. 69 ,p. 267-271, 2000.

MacKENZIE, W.M.; CLYNE, A.H.; McDONALD, L.S. Ethyl carbamate formation in grain based spirits. Part II. The Identification and determination of cyanide related species involved in ethyl carbamate formation in Scotch whisky. **J. inst. Brew**, 96, 223-232, 1990.

MAGA. J.A. Contaminant Amines in food. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** v. 10, p. 373 – 403, 1978.

MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, C.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VECIANA-NOGUÉS, T.; HERNÁNDEZ-JOVER, T. Lês amines biogenes dans lês aliments, leur signification, leur analyse. **Fals. Exp. Chim.** v. 931, p. 119 – 140, 1995.

MENDONÇA, A.T. **Identificação e estudo das características fisiológicas de *Saccharomyces cerevisiae* presentes em fermentações espontâneas de cana-de-açúcar**. 69 p. (Dissertação Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 1999.

MENDONÇA, R.C.S. **Aislamiento, selección y caracterización de levaduras de embutidos con vistas a su utilización como coadyuvante en el proceso de curado**. Tese de Doutorado- Valencia, 2000.

MORENO-ARRIBAS, M.V.; POLO, M.C.; JORGANES, F.; MUÑOZ, R. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. **Int. J. Food Microbiol.**, 84, 117–123, 2003.

NAGATO, L.A.F.; SILVA, O.A.; YONAMINE, M.; PENTEADO, M.V.C. Quantification of ethyl carbamate (EC) by gas chromatography and mass spectrometric detection in distilled spirits. **Alimentaria**, Madrid, n. 311, p. 31-36, 2000.

NAGATO, L.A.F.; NOVAES, F.V.; PENTEADO, M.V.C. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas. **Bol. SBCTA**, Campinas, 37(1): 40-47, 2003.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH PROGRAMA NACIONAL DE TOXICOLOGIA, 2004.

NETTLESHIP, A.; HENSHAW, PS.; MEYER, HL. Induction of pulmonary tumors in mice with ethyl carbamate (urethane). **J. Natl. Cancer Inst.** 4, 309-319, 1943.

NOVAES, F.V. **Carbamato de etila em aguardente de cana**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, 11 p. Publ. Interna, 1996.

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

OUGH, C.S.; CROWELL, E.A.; MOONEY, L.A. Formation of ethyl carbamate precursors during grape juice fermentation. I. Addition of amino acids, urea and ammonia: Effects of fortification on intracellular and extra cellular precursors. **Am. J. Enol. Vitic.** 39 (3), 243-249, 1988.

OUGH, C.S. Ethylcarbamate in Fermented Beverages and Foods. **J. Agric. Food Chem.** v.24, n.2, 323-328, 1976.

OZOGUL, F.; OZOGUL, Y.; KULEY, E. Nucleotide degradation and biogenic amine formation of wild white grouper (*Epinephelus aeneus*) stored in ice and at chill temperature (4 degree C). **Food Chem.**, 108(3), 933-941, 2008.

PARK, K.; LIEM, A.; STEWART, B.C.; MILLER, J.A. Vinyl carbamate epoxide, a major strong electrophilic, mutagenic and carcinogenic metabolite of vinyl carbamate and ethyl carbamate (urethane). **Carcinog.** 14, 441-450, 1993.

PAULSEN P.; BAUER F.; VALI, S. Biogenic amines in fermented sausages. **Fleischwirtschaft Int.** v. 2, p. 27 – 31, 1997.

PEREIRA J. A.M.; ROSA, C.A; FARIA, J.B. **Cachaça de alambique**. Brasília (DF): LK Editora e Comunicação, 180 p., 2006.

POLASTRO, L.R.; BOSO, L.M.; ANDRADE-SOBRINHO, L.G.; LIMA-NETO, B.S.; FRANCO, D.W. Compostos nitrogenados em bebidas destiladas: cachaça e tiquira. **Ciênc. Technol. Aliment.**, Campinas, 21(1): 78-81, 2001.

RICE, S.I.; EITENMILLER, R.R.; KOEHLER, P.E. Biologically active amines in food: A review. **J. Milk Food Technol.** v. 39, p. 353 – 358, 1976.

RIFFIKIN, H.L.; WILSON, R.; HOWIE, D.; MÜLLER, S. Ethyl carbamate formation in the production of pot still whisky. **J. Inst. Brew.** 95, 115-119, 1989.

ROSEIRO, C.; SANTOS, C.; SOL, M.; SILVA, L.; FERNANDES, I. Prevalence of biogenic amines during ripening of a traditional dry fermented pork sausage and its relation to the amount of sodium chloride added. **Meat Sci.**, 74(3), 557-563, 2006.

SANTANA, D.M.N. **Controle de qualidade de produtos agropecuários**. Seropédica: UFRRJ - Imprensa Universitária, 157 p. Apostila, 1995.

SCANLAN, R.A. Formation and occurrence of nitrosamines in foods. **Cancer Res.** v.43, p.2435 – 2440, 1983.

SCHLATTER, J.; LUTZ, W.K. The carcinogenic potential of ethyl carbamate (urethane): risk assessment at human dietary exposure levels. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, Vol.28, No. 3, p. 205-211. 1990.

SILLA SANTOS, M.H. Biogenic amines: their importance in foods. **Int. J. Food Microb.** v.29:p.213-231, 1996.

SOUSA, M.V.F., **Interação de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus fermentum* na produção de cachaça artesanal**, 69 p. Dissertação (MS), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

SOUFLEROS, E.; MARIE-LYSE, B.; BERTRAND, A. Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. **Am. J. Enol. and Viticult.**, 49, 266–277, 1998.

STRATTON, J.E.; HUTKINS, R.W.; TAYLOR, S.L. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. **J. Food Protect.** 54(6):460-470, 1991.

SUZZI, G.; GARDINI, F. Biogenic amines in dry fermented sausages: A review. **International J. Food Microbiol.** 88(1), 41–54, 2003.

TAKY, N.; IMAMURA, L.; TAKEBE, S.; KOBASHI, K. Cyanate as a precursor of ethyl carbamate in alcoholic beverages. **Jpn. J. Toxicol. Environ. Health.** 38 (6), 498–505, 1992.

TORREA, D.; ANCIN, C. Content of biogenic amines in a Chardonnay wine obtained through spontaneous and inoculated fermentations. **J. Agricult. and Food Chemistry**, 50, 4895–4899, 2002.

VIDAL-CAROU, M.C.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; MARTIN-MORRO, M.C. MARINE-FONT, A. Histamine and tyramine in meta products: relationship with meta spoilage. **Food Chem.** v.37, p. 239 – 249, 1990.

VIDAL-CAROU, M.C.; LAHOZ-PORTOLÉS, F.; BOVER-CID, S.; MARINÉ-FONT, A.; **J. Chromatogr.** 998, 235, 2003.

YEGIN, S; ÜREN, A. Biogenic amine content of boza: A traditional cereal-based, fermented Turkish beverage. **Food Chem.** V.111, p. 983–987, 2008.

ZIMMERLO, B.; SCHLATTER, J. Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. **Mutation res.Genetic toxicol.** 259, 325-350, 1991.

## **CAPÍTULO 1**

### **INFLUÊNCIA DE NITROGÊNIO E MINERAIS EM DIFERENTES MOSTOS SOBRE A PRESENÇA/FORMAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS NO DESTILADO E NO MOSTO FERMENTADO**

#### **RESUMO**

Estudou-se a influência dos diferentes teores de nitrogênio e minerais na formação de aminos bioativas durante a produção de destilado alcoólico a partir de mostos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana. As fermentações foram analisadas quanto ao valor de pH, teor de sólidos solúveis e a formação de aminos bioativas. Todos os mostos fermentaram até atingir 5° Brix, quando foi considerado o ponto final da fermentação. Observaram-se variações nos valores de pH, que ao final da fermentação alcançaram valores entre 3,7 e 4,0. A concentração de putrescina e espermidina, únicas aminos encontradas, diminuíram no decorrer da fermentação, não sendo detectadas ao final do processo. No destilado alcoólico produzido foram avaliados a acidez total, o teor alcoólico e o teor de aminos bioativas. As amostras apresentaram valores de acidez abaixo do estabelecido pela legislação, com exceção das amostras da cauda do destilado elaborado com mosto de açúcar mascavo. Os teores alcoólicos variaram em função da fração analisada e da composição do mosto fermentado. Não foi detectada a presença de aminos bioativas nas diferentes frações dos destilados produzidos.

#### **1- INTRODUÇÃO**

A cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 a 48 % vol a 20 °C, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g·L<sup>-1</sup>.<sup>1</sup>

Na fabricação de cachaça, a cana-de-açúcar é moída, há separação do bagaço e do caldo que é submetido a filtração, por passagem em peneiras ou decantador para separação do bagacilho. O caldo pronto para fermentar é denominado mosto, ao qual se adiciona o inóculo ou “pé-de-cuba”. Depois de terminada a fermentação do mosto e sedimentação das células de levedura, que pode variar de 18 a 24 horas, tem-se o vinho, que é destilado.

Durante a destilação são separadas as frações: cabeça, coração e cauda, em que a cachaça propriamente dita é a fração denominada coração.<sup>2</sup>

A destilação influencia as características sensoriais da bebida alcoólica pela alteração nas quantidades de compostos voláteis absolutos e relativos resultantes, e pelas reações químicas que ocorrem devido ao aquecimento. A composição dos destilados é influenciada por inúmeros fatores, tais como tipo de destilador, construção e operação do mesmo, sistema de aquecimento do vinho e resfriamento do destilado, grau de purificação da mistura hidro-alcoólica e separação das frações (cabeça, coração e cauda).<sup>3</sup>

As bebidas alcoólicas contêm características próprias de aroma e sabor conferidas pela presença de diversos constituintes oriundos do processo fermentativo. Além do etanol, compostos orgânicos, como álcoois superiores, ácidos orgânicos e ésteres, podem estar presentes e interferir em tais características.<sup>4</sup>

A elevada acidez presente em aguardentes pode ser atribuída à contaminação da cana-de-açúcar ou do próprio mosto fermentativo por bactérias acéticas e outras, oriundas da estocagem da cana ou do próprio caldo-de-cana, fazendo com que parte do substrato sofra fermentação acética, elevando, assim, a acidez e diminuindo o rendimento da produção de etanol.<sup>5</sup>

Bebidas alcoólicas constituem uma categoria de produtos fermentados que podem apresentar quantidades substanciais de amins biogênicas, como relatado para cervejas,<sup>6</sup> para vinhos,<sup>7</sup> para espumantes,<sup>8</sup> e para mosto de uva e vinho.<sup>9</sup>

Amins bioativas são bases orgânicas nitrogenadas alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina e espermidina), aromáticas (tiramina e feniletilamina) ou heterocíclicas (histamina e triptamina), de baixa massa molecular, formadas e convertidas pelo metabolismo de humanos, animais, plantas e micro-organismos. São formadas predominantemente por descarboxilação de aminoácidos e por aminação ou transaminação de aldeídos e cetonas, mas também através da hidrólise de compostos nitrogenados e decomposição térmica.<sup>10</sup>

A formação de amins biogênicas é um processo extremamente complexo e depende de diversos fatores, como a disponibilidade de aminoácidos livres, que podem ocorrer naturalmente no alimento; mas, na maioria das vezes, são liberados das proteínas como resultados de atividade proteolítica; a microbiota inicial e a sua capacidade produtora

de aminas biogênicas (presença de micro-organismo descarboxilase positiva), do efeito do inóculo e de condições ambientais que permitam o crescimento bacteriano, a síntese de descarboxilases e sua atividade.<sup>11</sup>

Estas aminas são indesejáveis em todos os alimentos e bebidas em altas concentrações, pois podem induzir dores de cabeça, disfunções respiratórias, hiper-hipotensão e diversos distúrbios alérgicos.<sup>12</sup>

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência dos diferentes teores de nitrogênio e minerais na formação de aminas bioativas durante a produção de destilado alcoólico a partir de mostos elaborados com diferentes matérias-primas derivadas da cana-de-açúcar.

## **2- MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 - Preparo dos diferentes mostos e Produção do destilado alcoólico**

Os mostos foram formulados à base de açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo de cana-de-açúcar, sem qualquer suplementação de nutrientes, devidamente diluídos para conferir uma concentração final de sólidos solúveis de 15 °Brix. As fermentações foram conduzidas em dornas de aço inox de 100 L de capacidade contendo 40 L dos respectivos mostos. Os diferentes mostos foram inoculados com 10 L (20 % do volume final da dorna) de pé-de-cuba que continha células de leveduras ativadas na proporção de  $10^9$  UFC·mL<sup>-1</sup>.

Foi utilizado pé-de-cuba fornecido por produtor de cachaça da região, recolhido de forma asséptica, diretamente da dorna da fábrica de cachaça após passados 2 meses do início da safra em 2009. Deste modo o pé-de-cuba foi obtido a partir de leveduras autóctones isoladas e propagadas naturalmente na fábrica.

As fermentações dos diferentes mostos foram consideradas completas (terminadas) quando se observou o fim da fase tumultuosa, ou seja, redução da produção de bolhas e da temperatura até próxima à temperatura ambiente, sedimentação do fermento e redução do teor de sólidos solúveis a 5 °Brix.

Durante a fase de fermentação, monitorou-se a temperatura do mosto e foram coletadas amostras de 100 mL em intervalos de 4 horas para análises. Estas amostras foram caracterizadas quanto ao pH e teor de sólidos solúveis. Após o término da fermentação o vinho foi submetido à destilação em alambique de coluna, modelo capelo, em cobre

(Alambiques Santa Efigênia) com capacidade para 40 L de mosto fermentado, com aquecimento a fogo direto, usando fogareiro e gás liquefeito de petróleo (GLP).

Durante a etapa de destilação foram coletadas amostras a cada 200 mL da fração cabeça e a cada litro da fração coração e fração cauda. As amostras foram caracterizadas quanto ao teor alcoólico e acidez total.

Para verificar a presença de amins bioativas as amostras foram coletadas no início (0 h), meio (12/24 h) e final (24/48 h) da fermentação e posteriormente nas frações (cabeça, coração e cauda) do destilado alcoólico durante a destilação.

O experimento foi realizado em 3 repetições e as análises foram conduzidas em triplicata.

## **2.2- Análises realizadas no mosto**

### **2.2.1- Análise de nitrogênio e compostos nitrogenados**

Foi realizada a análise de nitrogênio no caldo-de-cana, açúcar cristal e açúcar mascavo, pelo método de Kjeldahl modificado.<sup>13</sup>

A amostra foi digerida usando-se uma mistura de ácido sulfúrico e mistura catalítica, sob aquecimento até a solução se tornar azul-esverdeada e livre de material não-digerido. Aqueceu-se por mais uma hora. Em seguida a amostra foi destilada e recolhida em um erlenmeyer contendo solução de ácido bórico 4 % (m/v), que foi titulada com ácido sulfúrico  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , usando fenolftaleína como indicador. Os resultados foram expressos em % de Nitrogênio.

### **2.2.2- Análise de minerais**

Os teores de cálcio, magnésio, ferro, cobre, zinco, manganês, cádmio, cromo, níquel e chumbo foram determinados por meio de espectrometria de absorção atômica.<sup>14</sup>

As amostras foram preparadas por meio de oxidação da matéria orgânica por via úmida.<sup>14</sup> Trabalhou-se com o peso exato de 1,0 g de açúcar cristal, 1,0 g de açúcar mascavo e 10 mL de caldo-de-cana, em erlenmeyer de 125 mL para cada análise. Em cada erlenmeyer foi adicionado 20 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado e posteriormente 4 mL de  $\text{HClO}_4$ . Os erlenmeyers foram levados a chapa de aquecimento, observando-se inicialmente eliminação de fumaça marrom, devido à degradação da matéria orgânica e na fase final,

eliminação de fumaça branca, devido à evaporação dos ácidos utilizados, confirmando toda a eliminação da matéria orgânica. As amostras foram diluídas para 20 mL com água deionizada.

Todas as vidrarias utilizadas foram lavadas com detergente, enxaguadas e deixadas de molho em solução de HCl  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  durante 14 horas e novamente enxaguadas com água deionizada.

Para a determinação das concentrações dos minerais foi utilizado espectrofotômetro de absorção atômica VARIAN, modelo Spectro AA-200 equipado com corretor de absorção de fundo. Os extratos foram aspirados diretamente em chama ar-acetileno.

As soluções de uso foram preparadas, a partir de soluções padrão dos minerais, água deionizada e ácido nítrico grau analítico, em concentrações de  $1000 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . As soluções de trabalho dos metais foram preparadas em diferentes concentrações dependendo do metal a ser determinado em solução de ácido nítrico 20 % (v/v), por diluição das soluções de uso, para construção das curvas analíticas para determinação dos minerais. Um branco foi preparado com solução de ácido nítrico 20 % (v/v) em água deionizada.

As concentrações utilizadas para construção das curvas analíticas para cada mineral analisado, os limites de detecção e comprimento de onda utilizado na leitura de absorbância são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4- Parâmetros utilizados na análise de minerais por absorção atômica

MINERAIS	CURVA PADRÃO ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	COMPRIMENTO DE ONDA (nm)	LIMITE DE DETECÇÃO ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
Ca	0 - 10	422,7	0,01
Mg	0 - 2	285,2	0,03
Fe	0 - 15	248,3	0,06
Cu	0 - 2	324,7	0,03
Zn	0 - 2	213,9	0,01
Mn	0 - 10	279,5	0,02
Cd	0 - 2	228,8	0,02
Cr	0 - 10	357,9	0,06
Ni	0 - 10	232,0	0,10
Pb	0 - 10	217,0	0,10

### **2.2.3- Determinação do teor de sólidos solúveis totais**

O teor de sólidos solúveis totais (SST) foi determinado por refratometria, utilizando-se refratômetro (INSTRUTHERM RT-30 ATC) e os resultados expressos em °Brix. As amostras foram condicionadas em temperatura de 20 °C para análise.

### **2.2.4- Determinação do valor pH**

O pH foi determinado utilizando-se potenciômetro digital TECNAL TEC-5, (eletrodo A501-01), segundo técnica estabelecida pelo INSTITUTO ADOLF LUTZ.<sup>13</sup>

## **2.3- Análises realizada nos destilados alcoólicos**

### **2.3.1- Determinação do grau alcoólico**

O grau alcoólico foi determinado pelo método de densimetria em picnômetro de vidro, com capacidade para 20 mL, segundo metodologia da AOAC número 945.06. Os picnômetros foram calibrados com água destilada e os dados coletados em triplicata. As análises foram feitas a 20 °C. A partir da densidade determinou-se o grau alcoólico expresso em % v/v, por meio de tabela de conversão.<sup>13</sup>

### **2.3.2- Determinação da acidez total**

Transferiu-se 50 mL da amostra para um frasco erlenmeyer de 500 mL, nos quais foram adicionados 0,5 mL de indicador fenolftaleína e titulado com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol·L<sup>-1</sup> padronizada, até o aparecimento de uma coloração rósea.<sup>13</sup>

## **2.4- Determinação do teor de aminos bioativas**

Dez aminos bioativas foram pesquisadas: espermidina, espermina, putrescina, agmatina, cadaverina, serotonina, histamina, tiramina, triptamina e feniletilamina (SIGMA).

As soluções estoque das aminos foram preparadas por diluição do padrão de cada amina separadamente em ácido clorídrico 0,1 mol·L<sup>-1</sup>. Considerou-se a massa da base livre para resultar numa concentração de 1 mg·mL<sup>-1</sup> de cada amina. A partir de alíquotas de 1 mL de cada uma das soluções individuais, obteve-se 10 mL de solução padrão contendo as dez aminos, numa concentração final de 100 µg·mL<sup>-1</sup>. Todas as soluções foram

acondicionadas em tubos hermeticamente fechados, identificadas e armazenadas sob refrigeração para a realização das análises.

A metodologia utilizada para a separação, detecção e quantificação das aminas foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) por pareamento de íons em coluna de fase reversa.<sup>15</sup>

O cromatógrafo utilizado (Shimadzu, Kyoto, Japão) era composto por três bombas com conjunto de lavagem automática do pistão, duas do modelo LC-10 AD e outra da LC-10 ADvp acoplada a uma câmara de mistura; injetor automático modelo SIL-10 ADvp; detector espectrofluorimétrico modelo RF-10AXL, com comprimento de onda de 350 e 450 nm de excitação e emissão, respectivamente; unidade de controle CBM-20 A conectada a um microcomputador; coluna Nova-pak® C18 de fase reversa (3,9 x 300 mm, 10 µm) e pré-coluna µBondapak (Waters, Milford, MA, EUA).

As amostras foram filtradas imediatamente antes da injeção, utilizando-se membrana HAWP de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore, Corp., Milford, MA, EUA). Para a separação das aminas foram empregadas duas fases móveis: fase móvel A, solução tampão contendo acetato de sódio 0,2 mol·L<sup>-1</sup> e octanossulfonato de sódio 15 mmol·L<sup>-1</sup>, com pH ajustado para 4,9 com ácido acético glacial; e fase móvel B – acetonitrila. Estas soluções foram filtradas previamente em membranas com poro de 0,45 µm, do tipo HAWP para a fase A e HVLP para a B.<sup>16</sup>

A quantificação foi feita por fluorimetria utilizando 340 e 445 nm de excitação e emissão, respectivamente, após derivação com *o*-ftalaldeído.<sup>16</sup> A derivação pós-coluna foi realizada por meio de uma câmara de mistura instalada após a saída da coluna em um tubo de teflon de 2 m de comprimento conectando a câmara de mistura ao detector de fluorescência. A solução derivante, preparada diariamente e mantida sob abrigo da luz, consistiu de 0,2 g de *o*-ftalaldeído dissolvido em 3 mL de metanol, diluídos em solução de 25 g de ácido bórico e 22 g de hidróxido de potássio para 500 mL de água (pH 10,5 a 11,0). Foram adicionados a esta solução 1,5 mL de Brij-35 e 1,5 mL de mercaptoetanol.

A identificação das aminas foi feita por comparação entre os tempos de retenção dos picos encontrados nas amostras com os das aminas da solução padrão. As soluções padrão foram analisadas intercaladas às amostras.

A quantificação de aminas foi feita por interpolação em curva padrão externa e estes valores foram multiplicados pelo fator de correção correspondente a cada amina.<sup>16</sup>

## **2.5- Delineamento Experimental e Análise Estatística**

Para avaliação do efeito de diferentes mostos quanto ao teor de nitrogênio e minerais, formação de aminas bioativas, valores de pH, teor de sólidos solúveis, acidez e teor alcoólico, os ensaios experimentais da fermentação foram conduzidos segundo o delineamento inteiramente casualizado, sendo 3 tipos de mostos (açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana) em 3 repetições. Os ensaios experimentais da destilação foram conduzidos segundo esquema fatorial (3x3), disposto em delineamento inteiramente casualizado, composto por 3 tipos de mostos de fermentação (açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana) e 3 frações do destilado (cabeça, coração e cauda) em 3 repetições.

Os dados de pH e teor de sólidos solúveis foram interpretados por meio de análise de variância e regressão utilizando o testes F ao nível de 5% de probabilidade. Os demais dados foram avaliados por meio de análise de variância, e caso ocorresse significância era realizado o teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

As análises estatísticas foram realizadas valendo-se do pacote estatístico Sistema Para Análises Estatísticas – SAEG (2007).

## **3- RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1- Produção do destilado alcoólico**

Para determinar o final da fermentação dos diferentes mostos observou-se: interrupção da produção de bolhas, redução da temperatura, até próxima à temperatura ambiente, sedimentação do inóculo e concentração de sólidos solúveis em 5 °Brix. O tempo de fermentação dos mostos de açúcar cristal e açúcar mascavo foi de 48 horas, enquanto para o mosto de caldo-de-cana este tempo foi de 24 horas (Figura 9).

Os valores médios do teor de sólidos solúveis estão representados na Tabela 5. Estes valores mostram que no mosto de caldo-de-cana a fermentação atingiu o ponto final mais rapidamente que nos demais mostos.

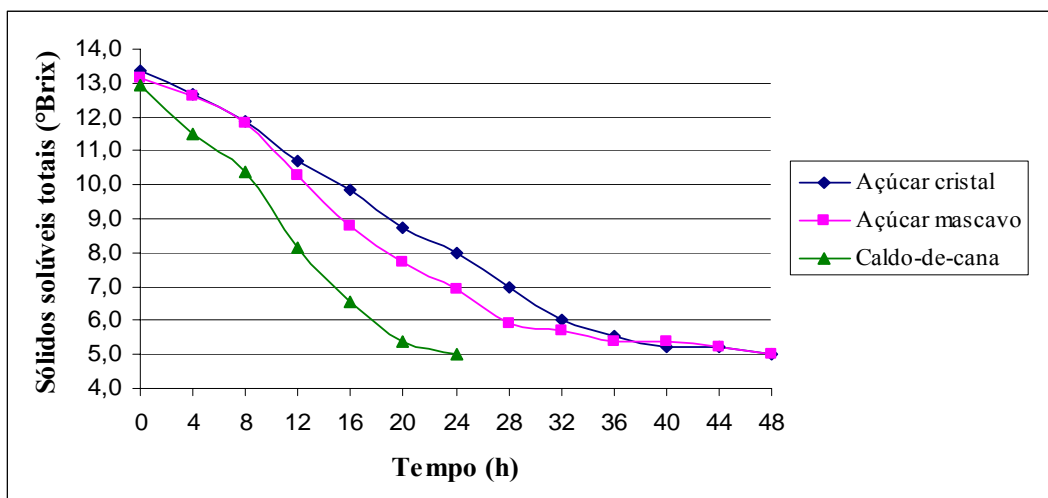


Figura 9- Variação do teor de sólidos solúveis totais durante a fermentação de diferentes mostos.

Tabela 5- Médias dos teores de sólidos solúveis totais durante a fermentação de diferentes mostos.

TEMPO (HORAS)	TEOR DE SÓLIDOS SOLÚVEIS (°Brix)		
	Açúcar cristal	Açúcar Mascavo	Caldo-de-cana
0	13,40	13,17	12,93
4	12,67	12,60	11,50
8	11,87	11,83	10,40
12	10,70	10,27	8,17
16	9,87	8,80	6,57
20	8,73	7,67	5,37
24	8,00	7,33	5,00 <sup>ns</sup>
28	7,03	6,93	-
32	6,00	5,80	-
36	5,53	5,40	-
40	5,20	5,17	-
44	5,20	5,17	-
48	5,00 <sup>ns</sup>	5,00 <sup>ns</sup>	-

Coefficiente de variação = 31,736

ns= não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.

Pode-se observar que não houve diferença significativa no teor de sólidos solúveis durante a fermentação dos mostos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana segundo análise de regressão realizada.

Nos mostos elaborados com açúcar cristal e açúcar mascavo a temperatura medida durante a fermentação oscilou entre 23 e 28 °C, enquanto na fermentação do mosto elaborado com caldo-de-cana a temperatura permaneceu mais alta durante todo o processo estando entre 26 e 34 °C. A temperatura mais baixa nos mostos elaborados com açúcar cristal e açúcar mascavo pode ser uma possível justificativa para a maior duração da fermentação, considerando-se que a faixa ideal para a fermentação alcoólica é de 26 a 32 °C e que em valores abaixo de 26 °C há um retardamento do processo fermentativo, em razão da menor taxa metabólica da levedura.<sup>17</sup>

### 3.2- Análises realizadas no mosto

#### 3.2.1- Análise de nitrogênio e compostos nitrogenados

Os teores de nitrogênio encontrados nos diferentes mostos são mostrados na Tabela 6. Pode-se observar que houve diferença significativa do teor de nitrogênio considerando os mostos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e o mosto elaborado com caldo-de-cana.

Tabela 6 – Teores médios de nitrogênio nos mostos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana.

MOSTOS	TEOR DE NITROGÊNIO (%)
Açúcar cristal	0,00 a
Açúcar Mascavo	0,20 a
Caldo-de-cana	1,00 b

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

O menor teor de nitrogênio nos mostos elaborados com açúcares cristal e mascavo pode ser um fator que contribui para estender o período de fermentação quando comparado ao mosto elaborado com caldo-de-cana, pois o nitrogênio é um elemento essencial não apenas para o crescimento da levedura, como para uma fermentação adequada, e em quantidade insuficiente pode aumentar o tempo de fermentação e reduzir o rendimento.<sup>18</sup>

### 3.2.2- Análise de Minerais

A concentração dos diferentes minerais pesquisados nos mostos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana encontram-se na Tabela 7. Pode-se observar que há diferença significativa no teor de minerais nos mostos analisados.

Tabela 7- Médias da concentração de minerais nos mostos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana e faixa ótima de crescimento para leveduras.

MOSTOS	MINERAIS (mg·L <sup>-1</sup> mosto)									
	Ca <sup>19</sup>	Mg <sup>21</sup>	Fe <sup>20</sup>	Mn <sup>21</sup>	Cu <sup>21</sup>	Zn <sup>22</sup>	Cr	Cd	Ni	Pb
Açúcar cristal	61,27 c	3,6 c	3,51 c	0,02 c	0,15 b	0,04 b	4,95 a	nd	nd	nd
Açúcar mascavo	144,74 a	36,50 b	5,08 b	0,93 b	0,52 a	0,73 a	3,84 b	nd	nd	nd
Caldo-de-cana	86,51 b	98,30 a	7,13 a	2,45 a	0,24 b	0,73 a	3,83 b	nd	nd	nd
Concent. ótima*	Mín	100,25	41,31	0,06	0,11	0,06	0,33	-	-	-
	Máx	401,00	364,5	0,17	0,55	0,64	0,98	-	-	-

Em cada coluna, médias seguidas por pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

\*Concentrações mínima e máxima para o crescimento ótimo de levedura segundo diferentes autores.<sup>(19,20,21 e 22)</sup>

Os diferentes teores de minerais encontrados nos mostos elaborados podem favorecer ou reprimir o metabolismo das leveduras fermentadoras, em função da quantidade mínima requerida de cada um deles e da quantidade em que se encontram presentes, pois além de uma fonte de carbono, vitaminas, tais como tiamina e ácido pantotênico, o meio deve, igualmente, fornecer nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto, iodo e outros elementos em quantidades diminutas.<sup>(2, 19, 20, 21,22)</sup>

O teor de cálcio está abaixo do requerimento mínimo da levedura nos mostos elaborados com açúcar cristal e caldo-de-cana e dentro de intervalo ideal (100,5 a 401,0 mg·L<sup>-1</sup>)<sup>19</sup> no mosto de açúcar mascavo, podendo favorecer a fermentação neste mosto por proporcionar aumento da estabilidade da membrana celular e conseqüente aumento da tolerância ao etanol.<sup>20</sup>

O teor de magnésio está no intervalo ideal apenas para o mosto elaborado com caldo-de-cana (41,1 – 364,5 mg·L<sup>-1</sup>),<sup>21</sup> estando abaixo deste valor nos demais mostos. Esta deficiência de magnésio nos mostos elaborados com açúcar mascavo e açúcar cristal pode explicar, em parte a maior duração da fermentação nestes mostos, pois o magnésio é requerido por diversas enzimas, e está implicado como um regulador no metabolismo do

piruvato e na estabilização da membrana de ácidos nucléicos, ribossomos, polissacarídeos e lipídeos, além de desempenhar um papel central no controle do crescimento, divisão e tamanho da célula.<sup>21</sup>

Os teores de ferro e manganês estão acima da faixa ótima para as leveduras.<sup>20,21</sup> A presença destes minerais é essencial pois manganês é um mineral requerido como co-fator enzimático<sup>21</sup> e o ferro é requerido em pequenas concentrações para função heme de enzimas,<sup>20</sup> porém em concentrações acima da faixa ótima podem inibir a atividades metabólica das leveduras, não favorecendo a fermentação.

O teor de cobre em todos os mostos está dentro da faixa de requerimento da levedura,<sup>21</sup> é um mineral vital para a células, atuando como um importante co-fator de enzimas e nas concentrações encontradas favorece a fermentação.

O teor de zinco dentro da faixa ótima<sup>22</sup>, nos mostos de açúcar mascavo e caldo-de-cana favoreceram a fermentação, pois nesta concentração otimizam o fator de crescimento de células de levedura, assim como a produção de etanol, de forma oposta, sua deficiência paralisa o crescimento celular e atividade fermentativa<sup>22</sup> desfavorecendo a fermentação no mosto elaborado com açúcar cristal.

O cromo não apresenta significância para metabolismo da levedura, e portanto não desempenha papel relevante na fermentação.

Cádmio, níquel e chumbo não foram detectados em nenhum dos mostos analisados, fator importante quanto à segurança do destilado produzido, pois os metais pesados são bioacumulativos e estão relacionados a intoxicações alimentares e diversas doenças em seres humanos.

Considerando o balanço mineral e o teor de nitrogênio presente nos 3 substratos usados para avaliação do processo de fermentação observa-se que a presença de um micronutriente em menor proporção em um substrato que em outro é contrabalançada na composição global. Todavia, a concentração é bastante discrepante podendo este elemento estar respondendo por um maior tempo de fermentação uma vez que o metabolismo da levedura é bastante dependente de sua concentração.

### 3.2.3- Determinação do valor pH

Os valores médios de pH nos mostos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana, durante a fermentação, estão mostrados na Tabela 8.

Tabela 8- Médias dos valores de pH nos mostos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana, durante a fermentação.

TEMPO DE FERMENTAÇÃO (HORAS)	VALORES MÉDIOS DE pH		
	Açúcar cristal	Açúcar Mascavo	Caldo-de-cana
0	3,69	4,66	4,19
4	4,67	4,44	4,14
8	4,57	4,30	3,97
12	4,47	4,15	3,79
16	4,37	4,03	3,76
20	4,32	3,95	3,72
24	4,25	3,91	3,69 <sup>ns</sup>
28	4,17	3,82	-
32	4,10	3,79	-
36	4,10	3,77	-
40	4,08	3,76	-
44	4,05	3,76	-
48	4,03 <sup>s</sup>	3,75 <sup>ns</sup>	-

Coeficiente de variância = 6,424

ns= não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade e s=significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.

Pode-se observar que não houve diferença significativa nos valores de pH entre os diferentes mostos de açúcar mascavo e caldo-de-cana, durante a fermentação, pelo teste F ao nível de 5 % de probabilidade. No mosto elaborado com açúcar cristal observa-se valor final de pH superior aos demais.

Esta diferença indica uma acidez diferenciada em cada mosto durante a fermentação, possivelmente como consequência da variação do metabolismo das leveduras em função do mosto a fermentar e possivelmente do teor de nitrogênio e minerais. No mosto de caldo-de-cana o decréscimo de pH ocorreu mais rapidamente que nos demais mostos, mostrando que a atividade fermentativa da levedura foi favorecida pela composição do caldo-de-cana em relação aos demais mostos.

Após contato dos mostos com o pé-de-cuba, observou-se em todos eles um decréscimo dos valores de pH, que passou a ser de 3,69 no mosto de açúcar cristal, 4,66 no mosto de açúcar mascavo e 4,19 no mosto de caldo-de-cana, estando dentro do intervalo

adequado para favorecer a atividade das leveduras e conseqüente produção de etanol que é entre 4,0 e 5,0.<sup>23</sup>

Em todos os mostos, foi observado decréscimo acentuado nos valores de pH no início da fermentação e uma tendência de estabilização destes valores no final da fermentação. O pH final nos diferentes mostos variou de 3,69 a 4,03, um intervalo esperado na fermentação para produção do destilado alcoólico.

### 3.3- Análises realizadas nos destilados alcoólicos

#### 3.3.1- Determinação do grau alcoólico

A partir do volume de 40 L de mostos que foram destilados, padronizou-se que o rendimento em destilado total seria de 8,6 L (21,5 % do volume total do mosto destilado) que foram separados em frações sendo 600 mL cabeça, 6 L coração e 2 L cauda, correspondendo cada fração a 7, 70 e 23 % do volume total destilado, respectivamente.

O teor alcoólico médio nas frações cabeça, coração e cauda dos destilados produzidos a partir da fermentação de diferentes mostos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9- Médias do teor alcoólico dos destilados produzidos a partir da fermentação de diferentes mostos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana.

FRAÇÃO	VOLUME ACUMULADO (L)	TEOR ALCOÓLICO DOS DESTILADOS (% v/v)		
		Açúcar cristal	Açúcar mascavo	Caldo-de-cana
Cabeça	(0,2)	34,13 a	38,80 b	39,13 b
Cabeça	(0,4)	51,23 a	52,63 a	52,60 a
Cabeça	(0,6)	52,07 a	52,30 a	52,93 a
Coração	(1,6)	53,80 a	50,03 b	54,77 a
Coração	(2,6)	49,57 a	46,77 b	51,23 a
Coração	(3,6)	43,67 a	42,50 a	46,60 b
Coração	(4,6)	40,20 a	37,70 a	42,60 b
Coração	(5,6)	35,13 a	33,27 a	38,80 b
Coração	(6,6)	28,01 a	25,43 a	31,43 b
Cauda	(7,6)	22,74 a	21,70 a	26,37 b
Cauda	(8,6)	19,40 a	16,17 a	23,17 b

Em cada linha, médias seguidas por pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Pode-se observar que houve diferença significativa no teor alcoólico nas diferentes frações dos destilados produzidos, e o destilado produzido de caldo-de-cana, que apresentou teor alcoólico superior aos demais. Este resultado indica que a levedura apresenta diferente capacidade de fermentar os mostos analisados, apresentando o mesmo perfil de produção de álcool, apesar de requerer maior tempo de fermentação nos mostos elaborados com açúcar cristal e açúcar mascavo.

O maior teor alcoólico médio encontrado no destilado produzido a partir do mosto elaborado com caldo-de-cana indica que nesta fermentação houve maior produção de álcool pela levedura, reforçando a argumentação de que no caldo-de-cana o metabolismo do inóculo é favorecido em função da sua composição em nitrogênio e minerais, o que favorece o processo de fermentação e destilação como um todo.

### 3.3.1- Determinação da acidez total

Os valores médios da acidez total nas frações: cabeça, coração e cauda, dos diferentes destilados alcoólicos produzidos a partir da fermentação de diferentes mostos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana são mostrados na Tabela 10. Pode-se observar que há diferença significativa no teor de acidez nas diferentes frações dos destilados produzidos.

Tabela 10 - Médias do valor de acidez das frações dos destilados alcoólicos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana.

FRAÇÃO ANALISADA	ACIDEZ TOTAL (mg·100 mL <sup>-1</sup> de álcool anidro)		
	Açúcar cristal	Açúcar mascavo	Caldo-de-cana
Cabeça	71,12 a	53,76 b	54,42 b
	25,73 b	43,08 a	28,07 b
	28,33 b	45,28 a	31,21 b
Coração	24,44 b	44,25 a	30,94 b
	26,44 b	47,34 a	28,86 b
	31,39 b	60,70 a	36,79 b
	36,71 b	74,13 a	40,41 b
	38,94 b	88,81 a	46,05 b
	57,06 b	135,97 a	63,98 b
Cauda	66,26 b	163,32 a	75,99 b
	84,26 b	224,47 a	97,27 b

Em cada linha, médias seguidas por pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Considerando a fração cabeça dos diferentes destilados alcoólicos, pode-se observar maior acidez na primeira amostra retirada, que pode ser justificada pela saída de ácidos e demais substâncias retidas no alambique na destilação anterior.

A baixa acidez da fração cabeça se justifica, pois nesta etapa da destilação saem apenas os compostos mais voláteis que o etanol e com maior solubilidade em etanol do que em água, o que não inclui o ácido acético, principal ácido formado.

Na fração coração dos diferentes destilados produzidos, observa-se uma tendência de aumento da acidez, que pode ser justificada pelas condições de temperatura e teor de água-álcool, que favorecem o arraste dos ácidos orgânicos formados durante a fermentação.

As amostras da fração cauda são as que apresentam os maiores teores de acidez, justificando a importância de separar adequadamente as frações durante a destilação para a produção de uma bebida alcoólica de qualidade.

Nos diferentes destilados alcoólicos os teores de acidez na fração coração, que é a cachaça propriamente dita, apresentam-se abaixo do valor máximo permitido pela legislação para acidez volátil que é de 150 mg em 100 mL de álcool anidro, expressos em ácido acético. A formação de ácidos durante a fermentação é dependente da composição do meio, do metabolismo das leveduras e também da contaminação do mosto por bactérias, estando fortemente relacionada com a qualidade sensorial da bebida.<sup>24</sup> Estes resultados sugerem pouca ou quase nenhuma presença de bactérias lácticas no inóculo e que os ácidos encontrados são resultado, em sua quase totalidade do metabolismo característico das leveduras constituintes do fermento, que se mostraram adequadas ao processo fermentativo pela sua baixa capacidade de acidificação do meio.

### **3.4- Determinação do teor de aminos bioativas**

Dentre as nove aminos pesquisadas foram encontradas durante as fermentações apenas putrescina e espermidina. Os valores médios do teor de aminos bioativas em função do tempo estão representados na Tabela 11. Pode-se observar que houve detecção de espermidina e putrescina nos mostos analisados, porém o teor destas aminos diminuiu no decorrer da fermentação, não sendo detectadas ao final deste processo, com exceção para espermidina no mosto elaborado com açúcar cristal.

Tabela 11- Teor de aminos bioativas nos diferentes mostos, durante a fermentação.

Mostos	Aminas bioativas ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )		
	0 h	24 h* ou 12h**	48 h* ou 24h**
PUTRESCINA			
Açúcar cristal*	0,17	0	0
Açúcar mascavo*	0	0	0
Caldo-de-cana**	0,14	0,04	0
ESPERMIDINA			
Açúcar cristal*	1,72	0,67	0,10
Açúcar mascavo*	0,06	0	0
Caldo-de-cana**	0,48	0,11	0

A presença de espermidina e putrescina está muito relacionada entre si, pois espermidina pode ser produzida pela descarboxilação da putrescina e ambas tem como aminoácido precursor a arginina.<sup>10</sup>

Não foram encontradas aminos bioativas nos destilados alcoólicos produzidos. Este resultado está de acordo com a análise de aminos realizada nos mostos, que mostra que durante a fermentação há degradação ou conversão destas aminos em outros compostos, não estando presentes ao final da fermentação.

A putrescina e espermidina encontradas nos mostos parecem ser provenientes da cana-de-açúcar, pois os teores diminuíram no decorrer da fermentação, indicando que o inóculo utilizado para a produção de destilado alcoólico não apresentam capacidade de formação destas aminos, característica desejada em micro-organismos envolvidos na produção de alimentos, dado que a presença de aminos é indesejada pelo potencial de ocasionar efeitos adversos à saúde do ser humano. Os resultados encontrados estão de acordo com outras pesquisas,<sup>10,27</sup> as quais mostram que estas aminos estão normalmente presentes em vegetais, onde exercem papel importante na síntese de DNA, RNA e proteína, sendo essenciais para multiplicação e crescimento celular<sup>10</sup> e aos desafios ambientais.<sup>27</sup>

#### 4 - CONCLUSÕES

O inóculo utilizado para a produção dos diferentes destilados alcoólicos se mostrou capaz de fermentar os diferentes mostos elaborados, porém a maior duração da fermentação

nos mostos elaborados com açúcar mascavo e açúcar cristal evidenciou que a composição do caldo-de-cana favorece o processo metabólico da levedura.

Os teores de nitrogênio e minerais presentes no mosto têm estreita relação com a capacidade da levedura em converter açúcar em álcool; a existência destes em quantidades compreendidas na faixa ótima para a levedura favorecem o processo de fermentação. Neste trabalho não foram identificados os metais chumbo, cádmio e níquel; fator positivo, dado que estes são metais pesados, bioacumulativos no organismo humano e associados a efeitos adversos à saúde.

Os destilados alcoólicos elaborados apresentaram acidez abaixo de 150 mg de ácido acético em 100 mL de álcool anidro, evidenciando que o inóculo utilizado foi capaz de suplantar o crescimento de bactérias contaminantes produtoras de ácido acético; fator positivo, pois a elevada acidez altera de forma negativa as propriedades sensoriais da bebida.

As aminas bioativas encontradas são provenientes da matéria-prima utilizada na elaboração dos mostos, indicando que o inóculo utilizado não tem capacidade de formar tais aminas e que não houve crescimento de bactérias descarboxilase positiva, evidenciando a habilidade do inóculo em se desenvolver de forma adequada e suprimir o desenvolvimento de bactérias contaminantes durante a fermentação, tais como sua importância na segurança da bebida produzida, pois a presença de aminas é indesejável em alimentos por seu efeito negativo no organismo humano.

É importante ressaltar que o teor de nitrogênio e minerais encontrados naturalmente no caldo-de-cana favorecem o processo de fermentação, estando, portanto em níveis adequados, não requerendo suplementação do meio para produção de bebida alcoólica. A suplementação do meio com diferentes fontes de nitrogênio poderia favorecer ainda a formação de aminas bioativas e conseqüentemente alterar a boa qualidade da bebida produzida sem esta suplementação, tornando-a inadequada ao consumo.

## 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa N° 13 de 29 de junho de 2005. **Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça.** Diário Oficial (da República Federativa do Brasil), Brasília, n. 124, quinta-feira, 30 de junho de 2005. Seção 1 (b).
- 2- LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos.** São Paulo: Edgar Blucher v.3, cap 1,1-43, 2001.
- 3- OLIVEIRA, E.S. **Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais.** (Tese de Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 135 p., 2001.
- 4- MENDONÇA, A.T. **Identificação e estudo das características fisiológicas de *Saccharomyces cerevisiae* presentes em fermentações espontâneas de cana-de-açúcar.** (Dissertação Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 69 p. 1999.
- 5- CARDOSO, M.G. **Produção de aguardente de cana.** 2 ed. Lavras. Editora UFLA, 2006, 445 p.
- 6- FERNANDES, J.O.; JUDAS, I.C.; OLIVEIRA, M.B.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; FERREIRA, M.A. A GC-MS method for quantitation of histamine and other biogenic amines in beer. **Chromatog.**, 53, 327–331, 2001.
- 7- KALAC, P.; KRIZECK, M. A review of biogenic amines and polyamines in beer. **J. Inst. Brew.**, 109, 123–128, 2003.
- 8- DEL-CAMPO, G.; LAVADO, I.; DUENAS, M.; IRASTORZA, A. Histamine production by some lactic acid bacteria isolated from ciders. **Food Science and Technol. Intern.**, 6, 117–121, 2000.
- 9- LANDETE, J.M.; FERRER, S.; PARDO, I. Which are the lactic acid bacteria responsible of histamine production in wine? **J. Applied Microbiology**, 99, 580–586, 2005.
- 10- BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends Food Sci. Technol.** v.6, p.341-346, 1995.
- 11- HU, Y., XIA, W.; LIU, X. Changes in biogenic amines in fermented silver carp sausages inoculated with mixed starter cultures. **Food Chem.**, 104(1), 188–195, 2007.
- 12- SILLA SANTOS, M.H. Biogenic amines: their importance in foods. **Int. J. Food Microb.** v.29:p.213-231, 1996.

- 13- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. Brasília, 2005. 1018 p.
- 14- CUNNIFF, P. **Official methods of analysis of AOAC international**. 4 ed. Maryland: AOAC International, 1998. Volume I, p. 1-8, 9, 31-34.
- 15- SABAINI, P.S. **Métodos de análise e determinação de amins livres e conjugadas em uvas e vinhos**. Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos, Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia- UFMG. 2009. 103 p.
- 16- VALE, S.R.; GLÓRIA, M.B.A. Determination of biogenic amines in cheese. **J. of AOAC International**, v. 80, p. 1006-1012, 1997.
- 17- MARQUES, T. A. **influência de dois níveis de temperatura e reciclo de células na fermentação alcoólica**. Dissertação de Mestrado, Piracicaba: ESALQ/USP, 1991.164 p.
- 18- STUPIELLO, J. P.; HORII, J. Condução da Fermentação alcoólica. **Saccharum**, v.4, n.17, p.43-46, 1981.
- 19- MOSLEY, G.A.; CARD, G.L.; KOOSTRA, W.L. Effect of calcium and anaerobiosis on the thermostability of *Bacillus stearothermophilus*. **Can. J. Microbiol.** 22:468-474, 1976.
- 20- van UDEN, N. Ethanol toxicity and ethanol tolerance in yeasts. **Ann. Rep. Ferm. Process.** 8:11-58, 1985.
- 21- JONES, R.P.; GREENFIELD, P.F. A review of yeast ionic nutrition. Part I: Growth and fermentation. **Process Biochemistry**, april: p 48-60, 1984.
- 22- JONES, R.P.; GADD, G.M. Ionic nutrition of yeast-physiological mechanisms involved and implications for biotechnology. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 12: 1-17; 1990.
- 23- PEREIRA, A.F. **Suplementação de nitrogênio sobre a fermentação alcoólica para produção de cachaça, cerveja e vinho**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, 2007, 99f.
- 24- GUTIERREZ, L.E. **Tópicos de bioquímica de leveduras**. Piracicaba: ESALQ/Depto. De Química, (NAPMA, 1), 103 p., 1994.
- 25- MAIA, A.B.R.A.; CAMPELO, E.A.P. **Tecnologia da cachaça de alambique**. Belo Horizonte: SEBRAE/MG; SINDBEBIDAS, 2005. 129 p.
- 26- BOZA, Y.; HORII, J. Influência da destilação sobre a composição e a qualidade sensorial da aguardente de cana de açúcar. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas. v. 18, n. 4, p. 391-396, 1998.
- 27- PANG, X.M. Polyamines, all-purpose players in response to environment stresses in plants. **Plant Stress**, v. 1, n. 2, p. 173-188, 2007.

## **CAPÍTULO 2**

### **PERFIL DE CARBAMATO DE ETILA DURANTE A PRODUÇÃO DE DESTILADO ALCOÓLICO A PARTIR DE DIFERENTES MOSTOS.**

#### **RESUMO**

Carbamato de etila é um composto formado em alimentos e bebidas destiladas e, por ser carcinógeno em concentrações acima de  $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$  para animais em testes laboratoriais, é considerado como um potencial carcinogênico para o homem. Com base nisto, este trabalho teve por objetivo determinar a concentração do carbamato de etila em destilados alcoólicos produzidos a partir de diferentes mostos. Analisaram-se os teores de cobre inicial do mosto e nas frações dos destilados produzidos, por espectrometria de absorção atômica. Os teores iniciais de cobre foram diferentes nos mostos e em todos os destilados elaborados os teores de cobre foram mais elevados nas frações denominadas cabeça e cauda, em comparação à fração coração, que constitui a bebida propriamente dita. O teor de nitrogênio foi determinado no início e final da fermentação, sendo diferentes nos mostos avaliados e em todos eles não foi detectado nitrogênio ao final da fermentação. Para a identificação de carbamato de etila, as amostras de cabeça, coração e cauda dos diferentes destilados produzidos foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). O teor médio de carbamato de etila encontrado nas amostras da fração coração encontram-se abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira e da União Européia para bebidas fermento-destiladas ( $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Nas frações denominadas cabeça e cauda dos diferentes destilados o teor de carbamato de etila está acima de  $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Os resultados indicam a necessidade de separar de forma eficiente as frações do destilado, para produção de uma bebida com qualidade e segurança e que atenda aos padrões internacionais.

## ABSTRACT

Ethyl carbamate is a compound formed in food and distilled beverages, and as it is carcinogen in concentrations above  $0.3 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$  for animals in laboratory tests, it is considered to be potentially carcinogenic to humans. Based on that, this research is intended to determine the concentration of ethyl carbamate in alcoholic distillate produced from different must. The initial levels of copper in the wort and in the fractions of the produced distillates were analyzed by using atomic absorption spectrometry. The initial levels of copper were different in the worts, and in all the distillates produced the levels of copper were higher in the fractions denominated head and tail than in the fraction denominated heart, which constitutes the drink itself. The level of nitrogen was determined at the beginning and at the end of the fermentation, being different in each analyzed must, and in all of them nitrogen was not detected at the end of the fermentation. In order to identify ethyl carbamate, the samples of head, heart and tail of the different distillates produced were analyzed by using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The average level of ethyl carbamate in the samples of heart fractions is below the established limit by the Brazilian and European legislations for ferment-distilled beverages ( $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). In the fractions denominated head and tail of the different distillates the ethyl carbamate is above  $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . The results show the need to efficiently separate the fractions of the distillate, in order to produce a drink with quality and security and which meets international standards.

## 1-INTRODUÇÃO

Entre os vários compostos passíveis de serem encontrados na cachaça, nos últimos anos, o carbamato de etila tem recebido maior atenção dos órgãos de vigilância sanitária e instituições de pesquisa em decorrência de sua toxicidade. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, por meio da Instrução Normativa nº. 13, de 29 de Junho de 2005, aprovou o regulamento técnico para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para a Aguardente de cana e para Cachaça. Foi estabelecido neste regulamento o limite máximo de carbamato de etila em  $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Este limite é o mesmo adotado pelos países importadores de cachaça que tem seus regulamentos para bebidas destiladas baseados na legislação canadense.

Várias pesquisas têm sido conduzidas no intuito de estabelecer as principais causas da formação do carbamato de etila em bebidas, principalmente no uísque e no vinho, com o objetivo de elucidar o mecanismo de sua formação durante o processo de fabricação. No Brasil, a grande preocupação é com a cachaça e a aguardente de cana onde diferentes estudos têm mostrado a presença de teores de carbamato de etila muito acima do limite estabelecido pela legislação vigente. Este fato pode representar uma barreira para as exportações do produto para vários países, principalmente EUA, Japão e os pertencentes à União Européia.

Carbamato de etila (CE) ou uretana é um composto potencialmente carcinogênico e tem sido detectado em alimentos e bebidas fermentados tais como pão, iogurte, vinho, cerveja, saquê e, principalmente, em bebidas fermento-destiladas tais como uísque, rum, vodca, grapa, cachaça e tiquira (aguardente de mandioca) (NAGATO; NOVAES; PENTEADO, 2003).

Apresenta ponto de fusão entre 48 e 50 °C, ponto de ebulição entre 182 e 184 °C e massa molar  $89,09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . É solúvel em água, álcoois, éter, cetonas, ésteres, benzeno, clorofórmio, glicerol, azeite de oliva e solventes clorados. A solução aquosa é neutra. O modo industrial de obtenção do carbamato de etila é por meio do aquecimento de uréia com álcool etílico sob pressão (BATTAGLIA; CONACHER; PAGE, 1990).

As principais rotas de exposição humana são inalação, ingestão e contato da pele. Exposição aguda a altos níveis de carbamato de etila pode prejudicar o fígado, rins, sistema nervoso central e sistema hematopoiético. Os sintomas incluem tonturas, vômito, perda da

consciência, coma e hemorragias. Estudos comprovaram a toxicidade do carbamato em fetos e sua correlação com um aumento da ocorrência de câncer em animais de laboratório.

Diferentes rotas metabólicas têm sido observadas na formação de carbamato de etila em bebidas destiladas, de acordo com a natureza do alimento ou bebida considerado e dos precursores disponíveis na matéria-prima. De forma geral, sua formação envolve a reação entre etanol e precursores nitrogenados: uréia, fosfato de carbamila e cianeto, sendo este último importante precursor durante e após o processo de destilação.

Vários fatores são importantes para a formação de carbamato de etila em bebidas destiladas, porém ainda não existe uma explicação satisfatória sobre a sua influência nas cachaças, apesar de ser considerado um dos contaminantes químicos que mais deprecia a qualidade da cachaça.

O mecanismo de formação de carbamato de etila é dependente do contato do cobre com alguns compostos protéicos presentes no mosto, durante a destilação nas fases líquidas e vapor. O cobre é mais comumente liberado do equipamento de destilação, alambique, coluna ou parte deles.

A uréia é um metabólito natural formado no metabolismo de alguns aminoácidos (ex.: arginina) e dos ácidos nucléicos, podendo estar sempre presente nos processos de fermentação alcoólica, embora em pequenas quantidades, possibilitando a formação de carbamato de etila ao reagir com etanol.

Existe, portanto a necessidade de mais estudos que permitam elucidar as possíveis rotas de formação do carbamato de etila em cachaça com o objetivo de garantir a qualidade da bebida produzida e sua exportação e também a segurança do consumidor.

O objetivo deste trabalho foi quantificar carbamato de etila durante a fermentação e destilação de bebida alcoólica elaborada a partir de diferentes mostos.

## **2 - MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 – Preparo dos diferentes mostos e Produção do destilado alcoólico**

Os mostos foram formulados a base de açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo de cana-de-açúcar, sem qualquer suplementação de nutrientes, devidamente diluídos para conferir uma concentração final de sólidos solúveis de 15 °Brix. As fermentações foram conduzidas em dornas de aço inox de 100 L de capacidade contendo 40 L dos respectivos mostos. Os diferentes mostos foram inoculados com 10 L (20 % do volume útil da dorna) de pé-de-cuba que continham células de leveduras ativadas na proporção de  $10^9$  UFC·mL<sup>-1</sup>.

Foi utilizado pé-de-cuba fornecido por produtor de cachaça tradicional, obtido através da propagação da microbiota autóctone da cana-de-açúcar em condições controladas durante o período de uma safra (2009).

As fermentações dos diferentes mostos foram consideradas completas (terminadas) quando se observou o fim da fase tumultuosa, ou seja, redução da produção de bolhas e da temperatura até próxima a temperatura ambiente, sedimentação do fermento e teor de sólidos solúveis de 5 °Brix.

Para a determinação do teor de carbamato de etila, durante a fase de fermentação foram coletadas amostras em intervalos de 4 horas. Após o término da fermentação o vinho foi submetido a destilação em alambique de coluna, modelo capelo, em cobre (Alambiques Santa Efigênia) com capacidade para 40 L de mosto fermentado, com aquecimento a fogo direto, usando fogareiro e gás liquefeito de petróleo (GLP). Durante a etapa de destilação foram coletadas amostras a cada 200 mL da fração cabeça e a cada litro da fração coração e fração cauda.

O experimento foi realizado em 3 repetições e as análises feitas em triplicata. O resultado está expresso como médias das análises e repetições.

### **2.2- Análise de nitrogênio e compostos nitrogenados nos mostos**

Foi realizada a análise de nitrogênio no caldo-de-cana, açúcar cristal e açúcar mascavo, usados para elaboração dos mostos, pelo método de Kjeldahl modificado (BRASIL, 2005).

A amostra foi digerida em uma mistura de ácido sulfúrico e mistura catalítica, sob aquecimento até a solução se tornar azul-esverdeada e livre de material não-digerido. Aqueceu-se por mais uma hora. A amostra foi destilada e recolhida em um erlenmeyer contendo solução de ácido bórico 4 % (m/v). A amostra foi titulada com ácido sulfúrico  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  e fenolftaleína como indicador. O resultado está expresso em % de nitrogênio.

### **2.3- Análise de cobre nos mostos e nas frações do destilado**

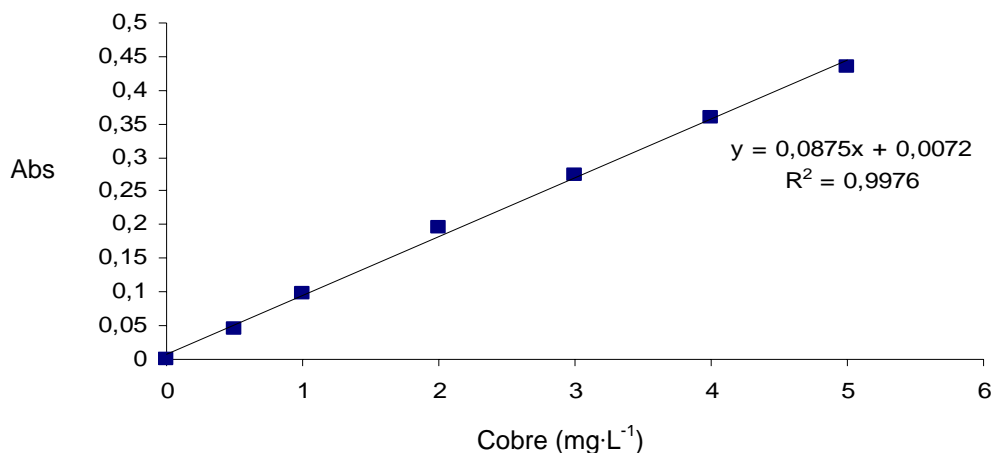
Os teores de cobre foram determinados por meio de espectrometria de absorção atômica (CUNNIFF, 1998).

As amostras foram preparadas por meio de oxidação da matéria orgânica por via úmida (CUNNIFF, 1998). Trabalhou-se com o peso exato de 1,0 g de açúcar cristal, 1,0 g de açúcar mascavo e 10 mL de caldo-de-cana, em erlenmeyer de 125 mL para cada análise. Em cada erlenmeyer foi adicionado 20 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado e posteriormente 4 mL de  $\text{HClO}_4$ . Os erlenmeyers foram levados a chapa de aquecimento, observando-se inicialmente eliminação de fumaça marrom, devido à degradação da matéria orgânica e na fase final, eliminação de fumaça branca, devido à evaporação dos ácidos utilizados, confirmando toda a eliminação da matéria orgânica. As amostras foram diluídas para 20 mL com água deionizada.

Todas as vidrarias utilizadas foram lavadas com detergente, enxaguadas e deixadas de molho em solução de  $\text{HCl}$   $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  durante 14 horas e novamente enxaguadas com água deionizada.

A determinação das concentrações do cobre foi feita utilizando espectrômetro de absorção atômica VARIAN, modelo Spectro AA-200 equipado com corretor de absorção de fundo. Os extratos foram aspirados diretamente em chama ar-acetileno.

A solução de uso de cobre foi preparada, a partir da solução padrão de cobre, água deionizada e ácido nítrico grau analítico, em concentração de  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . A solução de trabalho de cobre foi preparada em solução de ácido nítrico 20 % (v/v), por diluição da solução de uso, para construção da curva analítica (Figura 10). Um branco foi preparado com solução de ácido nítrico 20 % (v/v) em água deionizada. O limite de detecção do cobre é  $0,03 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  e o comprimento de onda utilizado foi 324,7 nm.



**Figura 10- Curva analítica para quantificação de cobre.**

#### **2.4- Determinação e Quantificação de Carbamato de Etila**

As amostras de mosto e destilado alcoólico foram analisadas por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) segundo metodologia descrita por Baffa Júnior et al. (2007).

As análises foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu GC 17-A, com detector de massas Shimadzu QP-5050A tendo como fonte de ionização o impacto eletrônico com 70 eV. Foi utilizada uma coluna capilar de fase polar (polietilenoglicol), DB-WAX (60 m x 0,25 mm x 0,50 µm). As temperaturas do injetor e da interface do detector foram mantidas a 220 °C, e empregou-se a seguinte programação de temperatura para o forno: 90 °C (2 min), elevada a 150 °C a uma taxa de 10 °C·min<sup>-1</sup> e a 230 °C a uma taxa de 40 °C·min<sup>-1</sup> mantendo-se assim por 10 min. O volume de amostra injetado em duplicata foi de 2,0 µL em modo “splitless”. Usou-se hélio como gás de arraste com fluxo de 1,5 mL·min<sup>-1</sup>. Modo de aquisição SIM, monitorando os íons de m/z 62, 74 e 89.

A quantificação de carbamato de etila foi realizada pela comparação dos resultados cromatográficos das amostras com uma curva analítica (Figura 11) obtida a partir de uma solução estoque de carbamato de etila (New Química - 99 %) 1 mg·mL<sup>-1</sup> em etanol: água (40:60 v/v). As diluições foram realizadas abrangendo uma faixa de concentração de 0,005 a 50,0 mg·L<sup>-1</sup>.

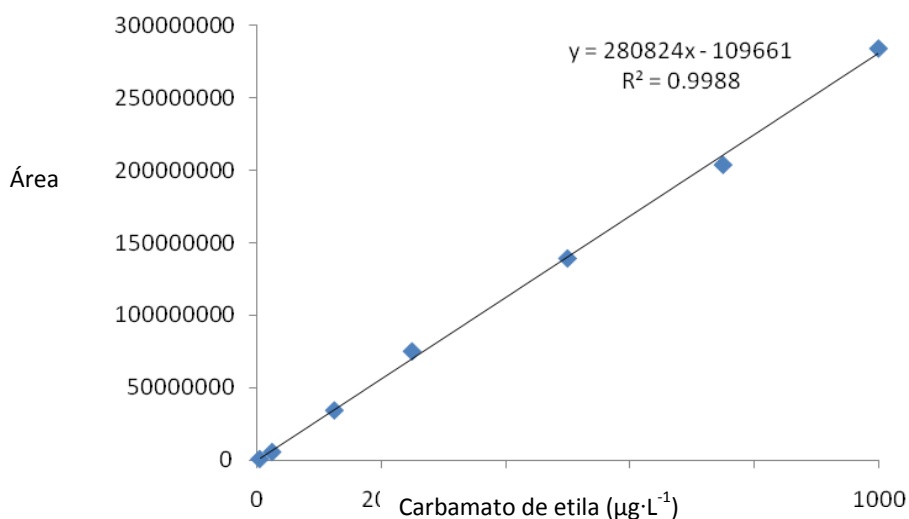


Figura 11- Curva analítica para quantificação de carbamato de etila.

## 2.5- Delineamento Experimental e Análise Estatística

Para avaliação do efeito de diferentes mostos quanto ao teor de nitrogênio, cobre e teor de carbamato de etila, os ensaios experimentais da fermentação foram conduzidos segundo o delineamento inteiramente casualizado, sendo 3 tipos de mostos (açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana) em 3 repetições. Os ensaios experimentais da destilação foram conduzidos segundo esquema fatorial (3x3), disposto em delineamento inteiramente casualizado, composto por 3 tipos de mostos de fermentação (açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana) e 3 frações do destilado (cabeça, coração e cauda) em 3 repetições.

Os dados foram avaliados por meio de análise de variância, e caso ocorresse significância era realizado o teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Os dados do teor de carbamato de etila durante a fermentação foram interpretados por meio de análise de variância e regressão utilizando o testes F ao nível de 5 % de probabilidade.

As análises estatísticas foram realizadas valendo-se do pacote estatístico Sistema Para Análises Estatísticas – SAEG (2007).

### 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 - Produção do destilado alcoólico

Para determinar o final da fermentação observou-se nos diferentes mostos, a interrupção da produção de bolhas, redução da temperatura, até próxima à temperatura ambiente, sedimentação do inóculo e concentração de sólidos solúveis em 5 °Brix. O tempo de fermentação foi diferente para os mostos elaborados com açúcar cristal e açúcar mascavo em comparação com o mosto elaborado com caldo-de-cana, sendo de 48 e 24 horas respectivamente.

#### 3.2- Análise de nitrogênio e compostos nitrogenados nos mostos

Os teores de nitrogênio encontrados nos diferentes mostos são mostrados na Tabela 12. Pode-se observar que houve diferença significativa do teor de nitrogênio considerando os mostos elaborados com açúcar cristal açúcar mascavo e o mosto elaborado com caldo-de-cana.

Tabela 12 – Teores médios de nitrogênio nos mostos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana.

	TEOR DE NITROGÊNIO (%)
Açúcar cristal	0,00 a
Açúcar Mascavo	0,20 a
Caldo-de-cana	1,00 b

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

#### 3.3- Análise de cobre nos mostos

Os teores de cobre nos mostos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana estão mostrados na Tabela 13. Pode-se observar que há diferença significativa nos teores de cobre encontrados nos mostos de açúcar cristal e caldo-de-cana quando comparados ao mosto de açúcar mascavo.

Tabela 13- Médias da concentração de cobre nos mostos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana.

AMOSTRAS	COBRE (mg·L <sup>-1</sup> mosto)
Açúcar cristal	0,15 b
Açúcar mascavo	0,52 a
Caldo-de-cana	0,24 b

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

### 3.4- Determinação e quantificação de carbamato de etila (CE) durante a fermentação

O perfil de formação de carbamato de etila durante a fermentação dos diferentes mostos é mostrado na Tabela 14.

A formação do carbamato de etila durante a fermentação apresentou o mesmo perfil nos diferentes mostos fermentados. No mosto de caldo-de-cana a formação do CE foi mais acentuada à partir da 8ª hora de fermentação enquanto nos mostos de açúcar cristal e mascavo este fato só é observado na 16ª hora. Este comportamento se justifica, pois de forma geral a fermentação dos mostos de açúcar cristal e mascavo foi mais lenta, durando 48 horas, enquanto para o mosto de caldo-de-cana a fermentação teve duração de 24 horas. Tal fato mostra que a formação de CE está associada ao desenvolvimento e taxa de fermentação do inóculo, demonstrando sua influência na formação de CE durante a fermentação do mosto para produção de destilado alcoólico.

Tabela 14- Teor de CE nos diferentes mostos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana, durante a fermentação.

TEMPO (horas)	CARBAMATO DE ETILA (µg·L <sup>-1</sup> )		
	Açúcar cristal	Açúcar Mascavo	Caldo-de-cana
0	0	0	0
4	30,0	30,0	50,0
8	50,0	140,0	13910,0
12	70,0	220,0	28030,0
16	180,0	160,0	44960,0
20	45890,0	44500,0	69750,0
24	64840,0	66940,0	114680,0 <sup>ns</sup>
28	87080,0	80740,0	-
32	100580,0	100890,0	-
48	119990,0 <sup>ns</sup>	120890,0 <sup>ns</sup>	-

Coefficiente de variância = 109,393

ns= não significativo pelo teste F ao nível de 5 % de probabilidade .

Pode-se observar na Tabela 14 que não houve diferença significativa na formação de carbamato de etila durante a fermentação nos mostos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana, pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.

Portanto, apesar de haver diferença significativa entre os teores de cobre nos diferentes mostos (Tabela 13), essa diferença parece não afetar a formação de carbamato de etila durante o processo fermentativo. Assim, o cobre presente no mosto não interfere significativamente na formação de CE durante a fermentação.

Os diferentes teores de nitrogênio (Tabela 12) encontrados nos mostos também parecem não afetar a formação de carbamato de etila durante o processo fermentativo, mesmo considerando que a associação de compostos protéicos e etanol constituem uma possível rota para a formação de CE (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002).

Foi realizada análise do teor de nitrogênio no final da fermentação dos três diferentes mostos e os resultados indicaram ausência deste em todos os diferentes mostos fermentados, pode-se concluir que o nitrogênio presente inicialmente em pequenas quantidades nos mostos foi, em sua totalidade, utilizado no metabolismo natural da levedura, não estando disponível para a reação de formação de CE ao final da fermentação.

### **3.4- Determinação e quantificação de carbamato de etila no destilado alcoólico**

Os teores médios de carbamato de etila avaliados nas diferentes frações durante a destilação estão mostrados na Tabela 15. Pode-se observar que há diferença significativa no teor de CE formado nos diferentes apenas nas amostras referentes a fração coração.

Durante a destilação dos diferentes mostos fermentados há uma redução no teor de CE em relação ao teor final encontrado na fermentação. Esta diferença pode explicada pelo ponto de ebulição elevado do carbamato de etila (182- 184°C), dificultando seu arraste do mosto para o destilado.

Os resultados mostram que as amostras da fração cabeça do destilado apresentaram os teores mais elevados de carbamato de etila. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Andrade-Sobrinho (2009).

Tabela 15- Média do Teor de CE nas frações dos destilados obtidos da fermentação de diferentes mostos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana.

FRAÇÃO	CARBAMATO DE ETILA					
	Açúcar cristal		Açúcar mascavo		Caldo-de-cana	
	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	%	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	%	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	%
Cabeça	8285a		9265 a		8060 a	
Cabeça	79170a	<b>91,70</b>	8022 a	<b>92,14</b>	9745 a	<b>91,88</b>
Cabeça	85650a		87224 a		10282 b	
Coração	54 a	<b>0,63</b>	65 a	<b>0,71</b>	111 b	<b>0,99</b>
Coração	56 a		61 a		106 b	
Coração	61 a		64 a		86 b	
Cauda	983 a	<b>7,66</b>	841 a	<b>7,15</b>	1068 a	<b>7,13</b>
Cauda	1087.0 a		1060 a		1110 a	

Em cada linha, médias seguidas por pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Considerando que durante a destilação o mosto é aquecido a temperaturas próximas a 90 °C, o etanol se volatiliza rapidamente pois tem ponto de ebulição a 78 °C, conseguindo arrastar apenas pequena fração de CE, uma vez que este tem ponto de ebulição de 182 e 184 °C. A solubilidade do CE é maior em etanol ( $1200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) que em água ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (ANDRADE-SOBRINHO, 2009). Assim é previsível que a fração cabeça, onde a concentração alcoólica é maior, apresente maiores concentrações de CE que as frações coração e cauda.

Em todos os destilados produzidos, a partir dos diferentes mostos, o teor de carbamato de etila encontrado nas frações da cabeça apresentou valores superiores a  $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , que é o valor máximo estabelecido pela legislação, ressaltando a importância de se separar a fração cabeça durante a destilação e eliminá-la para garantir a segurança e qualidade da cachaça produzida, constituindo este, um mecanismo de controle da concentração de carbamato de etila na produção de cachaça.

Nas amostras retiradas da fração coração, obtidas a partir da destilação dos diferentes mostos fermentados, o teor de CE variou de 54 a  $110 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para os diferentes mostos. Todas as amostras apresentaram teores de carbamato de etila abaixo do valor máximo admitido pela legislação. A maior concentração de CE pode ser observada no destilado obtido com caldo-de-cana.

Em todas as amostras obtidas das caudas dos destilados, o teor de carbamato de etila se encontra acima do permitido pela legislação, ressaltando a importância de se utilizar somente a fração coração do destilado e estabelecer padrões rigorosos quanto ao ponto de “corte” do destilado para garantir a menor quantidade de CE na cachaça produzida.

Pode-se observar na Tabela 16, o teor de carbamato de etila no final da fermentação nos diferentes mostos, o teor de CE em cada um dos diferentes destilados e nos respectivos resíduos da destilação (vinhoto).

Tabela 16- Teores médios de carbamato de etila nos diferentes mostos ao final da fermentação, nos diferentes destilados e no vinhoto.

MOSTO	CARBAMATO DE ETILA					
	Fermentação		Destilado		Vinhoto	
	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	%	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	%	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	%
Açúcar cristal	119990	<b>100</b>	27008	<b>22,50</b>	92982	<b>77,50</b>
Açúcar Mascavo	120890	<b>100</b>	26602	<b>22,00</b>	94288	<b>78,00</b>
Caldo-de-cana	114680	<b>100</b>	30568	<b>26,66</b>	84112	<b>73,34</b>

O mosto elaborado com caldo-de-cana apresentou o maior percentual de carbamato de etila no destilado. Este resultado pode ser explicado pela maior teor alcoólico deste destilado em relação aos demais, possibilitando um maior arraste de CE em função da sua maior solubilidade em etanol do que em água, como discutido anteriormente.

O carbamato de etila restante no vinhoto pode ser considerando como mais um fator de risco para a utilização deste diretamente nas lavouras, alimentação animal ou emissão nos cursos de água sem tratamento adequado, podendo constituir uma fonte de contaminação e possibilidade de contato do ser humano com esta substância potencialmente carcinogênica.

Na Tabela 17 são apresentados os valores médios do teor de carbamato de etila e cobre nos destilados alcoólicos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana. Pode-se observar que nos três diferentes destilados, as frações cabeça e cauda apresentam teores mais elevados de cobre e carbamato de etila, reforçando a necessidade de separar tais frações da fração coração, que constitui a bebida propriamente dita, para produzir uma bebida com qualidade e segurança, e que atenda os padrões da legislação.

Não foi observada uma relação direta entre o teor de cobre e carbamato de etila encontrados nas amostras durante a destilação, porém, o Cu presente na bebida destilada pode atuar como catalisador da reação de formação de carbamato de etila a partir de cianeto e etanol (ARESTA, 2001), assim, níveis elevados de cobre podem acelerar a formação do carbamato de etila na bebida pronta durante a armazenagem, desqualificando a bebida para comercialização.

Tabela 17- Valores médios  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  do teor de carbamato de etila e cobre nos destilados alcoólicos elaborados com açúcar cristal, açúcar mascavo e caldo-de-cana.

FRAÇÃO	MOSTO					
	Açúcar cristal		Açúcar mascavo		Caldo-de-cana	
	Carbamato de etila	Cobre	Carbamato de etila	Cobre	Carbamato de etila	Cobre
Cabeça	8285	2609	9265	2474	8060	2835
Cabeça	7917	1707	8022	2296	9745	2009
Cabeça	8565	1702	7224	2059	10282	1854
Coração	54	1493	65	1770	111	1529
Coração	56	1963	61	2429	106	1955
Coração	61	3092	64	3661	86	2631
Cauda	983	3965	841	4374	1068	3072
Cauda	1087	.820	1060	5375	1110	3574

#### 4- CONCLUSÕES

Pode-se concluir que os diferentes mostos testados na fermentação não influenciaram no teor de carbamato de etila encontrado nos destilados, portanto os diferentes teores de nitrogênio e cobre encontrados nos mostos não interferem na formação do carbamato de etila.

Nos destilados alcoólicos elaborados observou-se maior teor de carbamato de etila naquele elaborado com caldo-de-cana, possivelmente pelo maior teor alcoólico apresentado por este destilado.

Na destilação, foram observadas diferenças significativas entre os diferentes mostos na fração coração do destilado. Em todas as amostras de cabeça e cauda dos diferentes destilados produzidos os teores de CE encontrados estão acima do permitido pela

legislação, reforçando a importância de se separar tais frações na elaboração do destilado alcoólico, visando obtenção de uma bebida com qualidade e segurança alimentar.

Do carbamato de etila formado durante a fermentação, parte é arrastada para o destilado e parte fica no vinhoto; portanto, o tratamento e/ou inadequada do vinhoto pode trazer riscos ao meio ambiente e a saúde da população.

O teor de cobre e carbamato de etila encontrados nas diferentes frações do destilado não apresentaram correlação, porém elevados teores de cobre na bebida pronta podem acarretar maior formação de carbamato de etila durante a armazenagem do produto antes da comercialização, que especificamente para cachaça, constitui-se em um período longo. Ao final deste período o teor de carbamato de etila pode estar acima do limite estabelecido pela legislação, inviabilizando a comercialização da bebida.

Observaram-se em todos os três destilados produzidos teores de cobre e carbamato de etila elevados nas frações cabeça e cauda, demonstrando a necessidade de separá-las de forma eficiente da fração coração, que constitui a bebida propriamente dita.

## 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE-SOBRINHO, L.G.; BOSCOLO, M.; LIMA-NETO, B.S.; FRANCO, D.W. **Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa)**. Quím. Nova, v. 25, n. 6B, p.1074-1077, 2002.

ANDRADE-SOBRINHO, L.G. de; CAPPELINI, L.T.D.; SILVA, A.A.; GALINARO, C.A.; BUCHVISER, S.F.; CARDOSO, D.R.; FRANDO, D.W. **Teores de carbamato de etila em aguardentes de cana e mandioca. Parte II**. Quím. Nova, v. 32, n. 1, p. 116-119, 2009.

BAFFA JÚNIOR, J.C.; SOARES, N.F.F.; PEREIRA, J.M.A.T.K.; MELO, N.R. **Ocorrência de carbamato de etila em cachças comerciais da região da Zona da mata Mineira – MG**. Alim. Nutr., v.18, n.4, p. 371-373, 2007.

BARCELOS, L.V.F.; CARDOSO, M.G.; VILELA, F.J.; ANJOS, J.P.A. **Teores de carbamato de etila e outros componentes secundários em diferentes cachaças produzidas em três regiões do estado de Minas Gerais: Zona da Mata, Sul de Minas e Vale do Jequitinhonha**. Quím. Nova, v. 30, n. 4, p. 1009-1011, 2007

BATTAGLIA, R.; CONACHER, R.B.S.; PAGE, B.D. **Ethyl carbamate (urethana) in alcoholic beverages and foods: a review**. Food Addit. Contam., London, v. 7, n. 4, p. 477-496, 1990.

BOSCOLO, M. **Caramelo e carbamato de etila em aguardente de cana. Ocorrência e quantificação**. São Paulo, 2001. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

BRAGA, S.V. **A Influência da temperatura na condução de dois processos fermentativos para produção de cachaça**. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. (Dissertação de Mestrado) Piracicaba, 90 p., 2006.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa N° 13 de 29 de junho de 2005. **Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça**. Diário Oficial (da República Federativa da Brasil), Brasília, n. 124, quinta-feira, 30 de junho de 2005. Seção 1.

COOK, R.; MACCAIG, N.; MACMILLIAN, J.M.B.; LUMSDEN, W.B. **Ethyl carbamate formation in grain-based spirits. Part III**. The primary source. J. Inst. Brew., v. 96, p. 233–244, 1990.

CUNNIFF, P. **Official methos of analysis of AOAC international**. 4 ed. Maryland: AOAC International, v. I, p.1-8, 9, 31-34, 1998.

LABANCA, R.A. **Teores de carbamato de etila, cobre e grau alcoólico em aguardentes produzidas em Minas Gerais.** 2004, Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

MacKENZIE, W.M., CLYNE, A.H.; McDONALD, L.S. **Ethyl carbamate formation in grais based spirits. Part II. The Identification and determination of cyanide related species involved in ethyl carbamate formation in Scotch whisky.** J. Inst. Brew, v. 96, p. 223-232, 1990.

NAGATO, L.A.F.; NOVAES, F.V.; PENTEADO, M.V.C. **Carbamato de etila em bebidas alcoólicas.** Bol. SBCTA, Campinas, v. 37(1), p. 40-47, 2003.

RIFFIKIN, H.L.; WILSON, R.; HOWIE, D.; MÜLLER, S. **Ethyl carbamate formation in the production of pot still whisky.** J. Inst. Brew. V. 95, p. 115–119, 1989.

### CAPÍTULO 3

## **AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS SELECIONADAS COM BAIXO POTENCIAL DE FORMAÇÃO DE CARBAMATO DE ETILA PARA USO NA PRODUÇÃO DE CACHAÇA**

### **RESUMO**

A seleção de microrganismos é de vital importância para a qualidade e a quantidade de metabólitos primários (etanol e dióxido de carbono) que deverão ser obtidos no final da fermentação, processo decorrente da atividade de microrganismos. A utilização de leveduras selecionadas tem sido objeto de pesquisa, visando a um aumento da produtividade, vantagens tecnológicas e melhoria das características sensoriais da cachaça. Carbamato de etila é um composto formado em alimentos e bebidas destiladas. Por ser carcinógeno em concentrações acima de  $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$  para animais em testes de laboratoriais é considerado como um potencial carcinogênico para o homem. Com base nisto, este trabalho teve por objetivo selecionar leveduras com baixo potencial de formação de carbamato de etila na produção de cachaça. Foram selecionadas 16 leveduras; identificadas como pertencentes aos gêneros *Pichia*, *Kluyveromyces* e *Saccharomyces*. Analisou-se o teor de carbamato de etila, nas cachaças produzidas pelas leveduras selecionadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). A quantificação foi realizada através da comparação dos resultados cromatográficos das amostras com curva analítica. O valor médio de carbamato de etila encontrado nas amostras de coração está abaixo do valor máximo admitido pela legislação brasileira e da União Européia para bebidas fermento-destiladas ( $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Os resultados indicam que a levedura presente no inóculo pode influenciar a formação de carbamato de etila na cachaça. O gênero *Pichia* foi o que apresentou maior formação de carbamato de etila entre os gêneros avaliados (*Pichia*, *Kluyveromyces* e *Saccharomyces*).

## ABSTRACT

The selection of microorganisms is of vital importance for the quality and the quantity of primary metabolites (ethanol and carbon dioxide), which will be obtained at the end of fermentation, the resulting process of micro-organisms activities. The use of selected yeasts has been the subject of research, aiming to increase productivity, improve technological advantages and enhance the sensorial characteristics of cachaça. Ethyl carbamate is a compound formed in food and distilled beverages. As it is carcinogen in concentrations above  $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$  for animals in laboratory tests, ethyl carbamate is considered to be potentially carcinogenic for humans. Based on that, this work intended to select yeasts with low potential of formation of ethyl carbamate in the production of cachaça. Sixteen yeasts were selected; identified as belonging to the genera *Pichia*, *Kluyveromyces* and *Saccharomyces*. The content of ethyl carbamate was analyzed in cachaça produced by the selected yeasts by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Quantification was carried out by comparing the chromatographic results of the samples with analytical curve. The average value of ethyl carbamate found in the heart samples is below the maximum allowed value by the Brazilian and European legislations for ferment-distilled beverages ( $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). The results indicate that the yeast present in the inoculum can influence the formation of ethyl carbamate in cachaça. The *Pichia* genus presented the highest formation of ethyl carbamate among the analyzed genera (*Pichia*, *Kluyveromyces* e *Saccharomyces*).

## 1- INTRODUÇÃO

As leveduras são microrganismos responsáveis pela fermentação alcoólica, ou seja, pela transformação de açúcares presentes no mosto em etanol e dióxido de carbono, como produtos principais desta transformação (LOURENCINI, 1990), devem apresentar características específicas para o seu uso industrial, entre as quais, boa produtividade, tolerância ao álcool, osmotolerância, resistência a acidez elevada e a variações de temperatura, fácil propagação, capacidade de utilização de uma ampla variedade de substratos, resistência a certos resíduos tóxicos, mínima geração de calor durante a fermentação, a fim de preservar as características anteriormente citadas (MAIORELLA, 1985).

As leveduras mais comumente utilizadas na fabricação de bebidas alcoólicas são estirpes de *S. cerevisiae* e *S. uvarum*. Nas fermentações espontâneas, podemos encontrar um grande número de espécies de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*, com predominância de *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Kluyveromyces* (PATARO, 2000).

Diferentes cepas de leveduras presentes nessas fermentações estão constantemente em sucessão, devido à introdução de micro-organismos que acompanham o caldo-de-cana e também devido às condições de processo, tais como tempo de fermentação, teor de açúcares e demais componentes do substrato (PATARO et al., 1998).

A seleção de microrganismos é de vital importância para a qualidade e a quantidade de metabólitos primários como etanol e dióxido de carbono que deverão ser obtidos no final da fermentação, pois se trata de um processo químico decorrente da atividade de microrganismos que agem sobre diversos substratos orgânicos, alterando-o e originando a formação de outras substâncias (SILVA, 1994).

A utilização de leveduras selecionadas tem sido objeto de pesquisa, visando a um aumento da produtividade, vantagens tecnológicas e melhoria das características sensoriais da cachaça (OLIVEIRA, 2001).

Atualmente existem vários métodos de identificação de leveduras. O maior desafio ao se identificar leveduras recai na necessidade de diferenciar gêneros e espécies que taxonomicamente estão muito próximos, mas que têm propriedades muito diferentes no que se refere às suas características fermentativas e organolépticas.

A dificuldade de identificação de leveduras pela utilização de técnicas microbiológicas usuais tem induzido o desenvolvimento de um grande número de diferentes caminhos taxonômicos. A biologia molecular tem providenciado novas técnicas para a determinação taxonômica de leveduras. Estas técnicas incluem a análise de restrição do DNA genômico e mitocondrial, cariótipo molecular com eletroforese de campo pulsado e a reação em cadeia da polimerase (PCR). A caracterização de espécies de leveduras a partir de PCR utilizando iniciadores específicos vem sendo adotada (SABATÉ; GUILLAMON; CANO, 2000).

Uma vez que linhagens de leveduras isoladas de produções artesanais mostram-se bem adaptadas às condições ambientais encontradas nas dornas de fermentação, a simulação destas condições é utilizada como critério para seleção de leveduras (PATARO et al., 2000).

Quando se deseja selecionar uma levedura *Saccharomyces cerevisiae* para utilizá-la como iniciadora de um processo fermentativo e parte-se de um número elevado de leveduras diferentes, pode-se aplicar o que é conhecido como seleção massiva por competição. Este método de seleção é similar ao que ocorre nas fermentações espontâneas, e se baseia na própria competição entre as leveduras pelos nutrientes do meio de cultivo, para eleger aquelas que tenham melhor capacidade fermentativa (TORIJA, 2002).

De maneira natural, em bebidas destiladas, a formação do carbamato de etila pode ocorrer antes, durante e após a etapa de destilação pela reação do etanol com alguns compostos nitrogenados. O produto fermentado aquecido, como em bebidas destiladas, tem o seu nível de carbamato de etila aumentado ainda mais. Esta formação é dependente da concentração dos reagentes, temperatura, pH, luz e tempo de armazenamento (MacKENZIE; CLYNE; McDONALD, 1990).

O Ministério da Agricultura, por meio da Instrução Normativa Nº 13 de 29 de junho de 2005, promoveu mudanças nas exigências desta bebida, como a inclusão do limite de  $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  do contaminante carbamato de etila (BRASIL, 2005).

O mecanismo de formação de carbamato de etila é dependente do contato do cobre com alguns compostos protéicos presentes no mosto, durante a destilação nas fases líquidas e vapor (RIFFKIN et al., 1989).

A uréia é um metabólito natural formado no metabolismo dos aminoácidos (ex.: arginina) e do ácido nucléico, podendo estar sempre presente nos processos de fermentação alcoólica, embora em pequenas quantidades, possibilitando a formação de carbamato de etila ao reagir com etanol (BATTAGLIA; CONACHER; PAGE, 1990).

Vários fatores são importantes para a formação de carbamato de etila em bebidas destiladas, porém ainda não existe uma explicação satisfatória sobre a sua influência nas cachaças (ANDRADE-SOBRINHO, 2002), apesar de ser considerado um dos principais defeitos da cachaça (ANDRADE-SOBRINHO, 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a participação de leveduras selecionadas na formação de carbamato de etila na produção de cachaça.

## **2- MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1- Seleção, conservação e preparo do inóculo**

Foram realizadas diluições em série dos 4 inóculos obtidos de produtores de cachaça tradicional ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ ) e 1 mL de cada diluição foi assepticamente transferido assepticamente para o centro da placa contendo meio sólido YEPD (1 % extrato de levedura, 2 % peptona e 2 % glicose) procedendo-se à semeadura com alça de Drigalski. Em seguida as placas foram colocadas em estufa a 30 °C durante 72 horas. Para cada diluição foram empregadas três placas de Petri.

As colônias isoladas crescidas, com características macroscópicas de levedura foram semeadas, com auxílio de uma alça estéril, por esgotamento em placas de Petri contendo meio sólido YEPD e placas foram colocadas em estufa a 30 °C durante 72 horas.

As colônias puras obtidas, com características morfológicas de levedura, foram identificadas utilizando números cardinais e transferidas para tubos de ensaio contendo meio sólido inclinado YEPD e colocadas em estufa a 30 °C durante 24 horas. Uma colônia representativa de cada levedura pura isolada foi semeada em tubo de ensaio contendo meio sólido inclinado YEPD e após crescimento foram mantidas a -80 °C (GUIMARÃES, 2005).

Preparou-se uma suspensão de células das leveduras isoladas em 10 mL de meio líquido YEPD e incubou-se em estufa durante 12 horas. Após o período de crescimento esta suspensão foi transferida para erlenmeyer de 500 mL, adicionado 50 mL de meio líquido de YEPD e mantido sob agitação por 24 horas. Após este período o inóculo foi lavado com

água destilada e ressuspendido em 50 mL de meio líquido de YEPD mantendo-se sob agitação por 24 horas. Este processo foi repetido até a obtenção de um volume de 400 mL de inóculo.

## 2.2- Identificação de Leveduras

Células de leveduras foram diretamente coletadas das placas de petri contendo meio YEPD, com auxílio de palito de dente esterilizado e suspensas em 100  $\mu$ L do mix da reação de PCR, contendo 0,5  $\mu$ M do primer ITS 1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'), 0,5  $\mu$ M primer ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), 10  $\mu$ M desoxinucleotídeos, 1,5 mM  $MgCl_2$ , e tampão 1 x. Esta suspensão foi aquecida a 95 °C por 15 min em termociclador. Uma unidade de DNA polimerase foi adicionada em cada tubo.

As condições da análise de PCR foram: desnaturação a 95 °C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 55 °C por 2 min e extensão a 72 °C por 2 min e extensão final a 72 °C por 10 min.

O produto do PCR amplificado (10  $\mu$ L ou aproximadamente 0,5-1,0  $\mu$ g) foi digerido sem purificação adicional com as enzimas de restrição: *CfoI*, *HaeIII* e *HinfI*.

O produto do PCR e os fragmentos da restrição foram separados em gel de agarose nas concentrações de 1,4 e 3,0 %, respectivamente, contendo tampão TAE 1x. Após eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio, visualizado sob luz UV e fotografado. Os tamanhos dos fragmentos foram estimados por comparação com o comprimento padrão de DNA (100 pb). A identificação da levedura foi realizada por comparação com resultados obtidos por Esteve-Zaroso et al. (1999).

## 2.3- Produção da cachaça

Os mostos foram formulados com caldo de cana-de-açúcar devidamente diluído para conferir uma concentração de sólidos solúveis de 15 °Brix, sem suplementação de nutrientes. As fermentações foram conduzidas em recipientes de vidro, contendo 1,6 L de caldo-de-cana, inoculados com 0,4 L de pé-de-cuba que continham células de leveduras ativadas na proporção de  $10^9$  UFC·mL<sup>-1</sup>.

Foram utilizadas 16 leveduras selecionadas a partir de 4 diferentes inóculos fornecidos por produtores de cachaça.

Após a fermentação, que teve duração de 24 horas, o mosto fermentado foi submetido à destilação em Microdestilador de Álcool TECNAL-TE 012 e no destilado obtido foi realizada a determinação e quantificação de carbamato de etila.

O experimento foi realizado em 3 repetições e as análises feitas em triplicata.

#### **2.4- Quantificação do teor de carbamato de etila na cachaça**

As amostras de mosto e destilado alcoólico foram analisadas por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) segundo metodologia descrita por Baffa Júnior et al. (2007).

As análises foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu GC 17-A, com detector de massas Shimadzu QP-5050A tendo como fonte de ionização o impacto eletrônico com 70 eV. Foi utilizada uma coluna capilar de fase polar (polietilenoglicol), DB-WAX (60 m x 0,25 mm x 0,50 µm). As temperaturas do injetor e da interface do detector foram mantidas a 220 °C, e empregou-se a seguinte programação de temperatura para o forno: 90 °C (2 min), elevada a 150 °C a uma taxa de 10 °C·min<sup>-1</sup> e a 230 °C a uma taxa de 40 °C·min<sup>-1</sup> sendo assim mantida por 10 min. O volume de amostra injetado em duplicata foi de 2.0 µL em modo “splitless”. Foi usado hélio como gás de arraste com fluxo de 1,5 mL·min<sup>-1</sup>. Modo de aquisição SIM, monitorando os íons de m/z 62, 74 e 89.

A quantificação de carbamato de etila foi realizada pela comparação dos resultados cromatográficos das amostras com uma curva analítica (Figura 12) obtida a partir de uma solução estoque de carbamato de etila (New Química-99 %) 1mg·mL<sup>-1</sup> em etanol: água (40:60 v/v). As diluições foram realizadas abrangendo uma faixa de concentração de 0,005 a 50,0 mg·L<sup>-1</sup>.

#### **2.5- Delineamento experimental e Análise Estatística**

Para avaliação da participação de leveduras selecionadas na formação de carbamato de etila durante produção da cachaça, os ensaios experimentais foram conduzidos segundo o delineamento inteiramente casualizado, em 3 repetições.

Os dados foram avaliados por meio de análise de variância, e caso ocorresse significância era realizado o teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

As análises estatísticas foram realizadas valendo-se do pacote estatístico Sistema Para Análises Estatísticas – SAEG (2007).

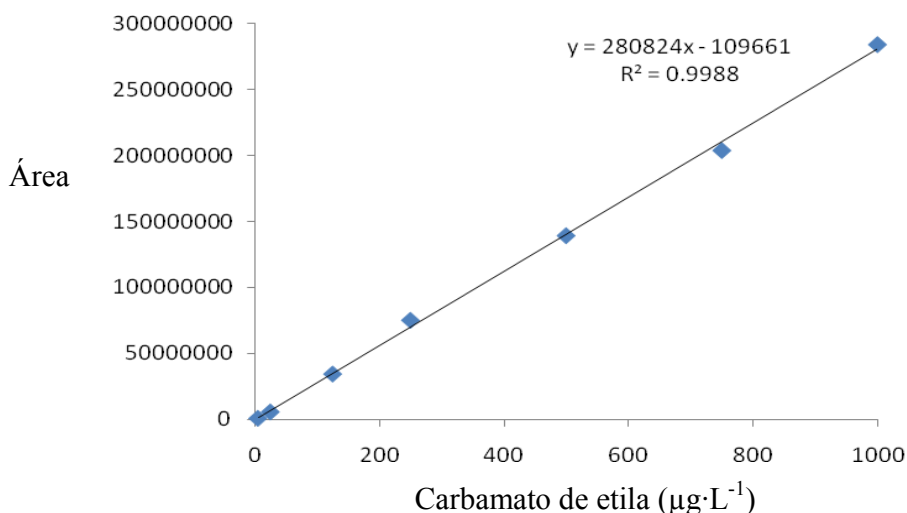


Figura 12- Curva analítica para quantificação de carbamato de etila.

### 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1- Identificação de Leveduras

Para identificação das leveduras selecionadas, foi elaborada uma tabela (Tabela 18) com os resultados do produto do PCR e dos fragmentos de restrição, em pares de base (pb) e comparado ao encontrado por Esteve-Zaroso et al. (1999).

Podem-se observar na tabela 18, que foram identificados os gêneros *Pichia*, *Kluyveromyces* e *Saccharomyces* entre as 16 leveduras selecionadas. A identificação da espécie não foi possível em função da ocorrência de valores que ocasionaram resultados ambíguos, sendo necessário para tal, a realização de testes bioquímicos para confirmação da espécie.

Em 2 dos fermentos analisados foram encontrados apenas leveduras da espécie *Saccharomyces*, notadamente a mais comumente encontrada associada à produção de cachaça. Em outros 2 fermentos, houve a predominância de leveduras do gênero *Kluyveromyces* e foi encontrada uma levedura do gênero *Pichia*. Diferentes cepas de leveduras presentes nessas fermentações estão constantemente em sucessão, devido à introdução de micro-organismos que acompanham o caldo-de-cana e também devido às

condições de processo, tais como tempo de fermentação, teor de açúcares e demais componentes do substrato (PATARO et al., 1998).

Tabela 18- Tamanho, em pb do produto de PCR e fragmentos de restrição das leveduras estudadas.

Levedura	Produto do PCR	Fragmentos de Restrição (pb)			Gênero Identificado
		<i>CfoI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	
1	550	320+230	430+120	210+210+130	<i>Kluyveromyces</i>
2	600	350+300	490+110	470+130	<i>Pichia</i>
3	610	348+262	440+170	240+230+140	<i>Kluyveromyces</i>
4	610	352+258	430+180	200+250+160	<i>Kluyveromyces</i>
5	600	340+260	420+180	210+250+150	<i>Kluyveromyces</i>
6	550	310+240	405+145	200+220+130	<i>Kluyveromyces</i>
7	550	310+240	400+150	210+200+140	<i>Kluyveromyces</i>
8	570	330+240	410+160	200+250+120	<i>Kluyveromyces</i>
9	600	345+255	460+140	200+230+95+75	<i>Saccharomyces</i>
10	610	350+260	470+130	200+235+95+80	<i>Saccharomyces</i>
11	610	350+260	460+150	200+230+95+85	<i>Saccharomyces</i>
12	610	350+260	475+135	190+230+100+90	<i>Saccharomyces</i>
13	600	330+270	430+170	200+230+100+70	<i>Saccharomyces</i>
14	610	340+260	460+150	205+230+100+75	<i>Saccharomyces</i>
15	590	330+260	420+170	200+230+95+65	<i>Saccharomyces</i>
16	600	350+250	440+160	210+230+90+70	<i>Saccharomyces</i>

Os resultados obtidos mostram que em função da região, variedade da cana-de-açúcar e condução do processo de fermentação, há favorecimento de determinados gêneros de levedura, o que fornece ao fermento características específicas na produção da cachaça, estando fortemente relacionado à sua qualidade.

### 3.2- Quantificação do teor de carbamato de etila na cachaça

Os teores médios de carbamato de etila encontrados nas cachaças produzidas pelas diferentes leveduras selecionadas estão apresentados na Tabela 19.

Os resultados obtidos mostraram que além da associação da levedura com a qualidade sensorial da cachaça produzida (OLIVEIRA, 2001), ela está associada também com o teor de carbamato de etila formado no processo.

Pode-se observar que houve diferença significativa no teor de carbamato produzido pela levedura do gênero *Pichia*, sendo superior aos demais. Esta diferença parece ser em

função do metabolismo das leveduras, já que as demais variáveis do processo de produção de cachaça se mantiveram constantes. Uma provável rota de formação do carbamato de etila, fortemente influenciada pela levedura é a reação da uréia decorrente do metabolismo dos aminoácidos, com o etanol formado (BATTAGLIA; CONACHER; PAGE, 1990).

Tabela 19- Médias dos teores de carbamato de etila produzido por diferentes leveduras.

LEVEDURA	TEOR DE CARBAMATO ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
1	64,19 a
2	67,05 b
3	64,03 a
4	64,51 a
5	63,41 a
6	63,45 a
7	63,62 a
8	64,17 a
9	64,13 a
10	63,52 a
11	63,21 a
12	63,54 a
13	63,11 a
14	63,28 a
15	63,12 a
16	64,09 a

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

#### 4- CONCLUSÃO

O resultado obtido mostra que a seleção do inóculo utilizado no processo de produção de cachaça é de extrema importância para a qualidade e segurança da bebida produzida e para atender as especificações da legislação quanto à produção de carbamato de etila.

Os três gêneros avaliados (*Pichia*, *Kluyveromyces* e *Saccharomyces*) apresentaram produção de carbamato de etila abaixo do valor estabelecido pela legislação de  $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , sendo que o gênero *Pichia* apresentou menor produção de carbamato de etila durante o período de fermentação.

Este estudo mostra que o gênero da levedura predominante no fermento pode influenciar a formação de carbamato de etila durante a produção de cachaça.

## 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE-SOBRINHO, L.G.; BOSCOLO, M.; LIMA-NETO, B.S.; FRANCO, D.W. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa). **Quím. Nova**, Vol. 25, No. 6B, p.1074-1077, 2002.

ANDRADE-SOBRINHO, L.G.; CAPPELINI, L.T.D.; SILVA, A.A.; GALINARO, C.A.; BUCHVISER, S.F.; CARDOSO, D.R.; FRANDO, D.W. Teores de carbamato de etila em aguardentes de cana e mandioca. Parte II. **Quím. Nova**, Vol. 32, No. 1, 116-119, 2009.

BAFFA JÚNIOR, J.C.; SOARES, N.F.F.; PEREIRA, J.M.A.T.K.; MELO, N.R. Ocorrência de carbamato de etila em cachaças comerciais da região da Zona da mata Mineira – MG. **Alim. Nutr.**, v.18, n.4, p. 371-373, out./dez. 2007

BATTAGLIA, R.; CONACHER, R.B.S.; PAGE, B.D. Ethyl carbamate (urethana) in alcoholic beverages and foods: a review. **Food Addit. Contam.**, London, v. 7, n. 4, p. 477-496, 1990.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Instrução Normativa no 13 de 29 de junho de 2005. **Diário Oficial da União**. Brasília, 30 de junho de 2005.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; BELLOCH, C.; URUBURU, F.; QUEROL, A. identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **Int. J. Systematic Bacteriol.**, v.49, p. 329-337, 1999.

GUIMARÃES, T.M. **ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE CEPAS DE LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* PARA ELABORAÇÃO DE VINHO**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos –Universidade Federal do Parana, 117 p., 2005.

LOURENCINI, V.F. **Manual para manutenção de destilarias autônomas de álcool e fermentação alcoólica**. Piracicaba: Dedini Metalúrgica, 90 p., 1990.

MacKENZIE, W.M.; CLYNE, A.H.; MCDONALD, L.S. Ethyl carbamate formation in grain based spirits. Part II. The identification and determination of cyanide related species involved in ethyl carbamate formation in Scotch whisky. **J. Inst. Brew.**1990, 96, 223–232.

MAIORELLA, B.L. Ethanol. In: MOO-YOUNG, M. (ed) **Comprehensive biotechnology: the principles, applications e regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine**. Oxford: Pergamon Press, v.3, cap. 43, p. 861-914, 1985.

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

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

PATARO, C., SANTOS, A., CORREA, S.R., MORAIS, P.B., LINARDI, V.R., ROSA, C.A. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in aguardente distillery. **Rev. Microbiol.**, v. 29, p. 104-108, 1998.

RIFFIKIN, H.L.; WILSON, R.; HOWIE, D.; MÜLLER, S. Ethyl carbamate formation in the production of pot still whisky. **J. Inst. Brew.** 1989, 95, 115–119.

SABATÉ, J.; GUILLAMON, J.M.; CANO, J. PCR differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* from *Saccharomyces bayanus*/ *Saccharomyces pastorianus* using specific primers. **FEMS Microbiol. Letters**, 193, p. 255-259, 2000.

SILVA, R.B.O. **Leveduras contaminantes na produção de etanol industrial por processo contínuo: quantificação e identificação.** Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 145 p., 1994.

TORIJA, M.J. **Ecología de levaduras: selección y adaptación a fermentaciones vínicas.** Tarragona, Tese (Doutorado em Bioquímica) – Facultat d’Enologia, Universitat Rovira i Virgili. 260 f.2002.

## CONCLUSÃO GERAL

O menor tempo de fermentação do mosto elaborado com caldo-de-cana evidencia que sua composição favorece o processo metabólico da levedura, possivelmente pela presença de minerais e nitrogênio em concentrações adequadas ao processo fermentativo para produção de cachaça. Este fato é de extrema importância, pois demonstra que não é necessária a suplementação do caldo-de-cana para produção de cachaça e que a substituição do caldo-de-cana por outras fontes de sacarose prolonga o tempo de fermentação, não sendo viável.

Os destilados alcoólicos elaborados apresentaram acidez abaixo de 150 mg de ácido acético em 100 mL de álcool anidro, evidenciando que o inóculo utilizado foi capaz de suplantiar o crescimento de bactérias contaminantes produtoras de ácido acético; fator positivo, pois a elevada acidez altera de forma negativa as propriedades sensoriais da bebida.

As aminas bioativas encontradas são provenientes da matéria-prima utilizada na elaboração dos mostos, indicando que o inóculo utilizado não tem capacidade de formar tais aminas e que não houve crescimento de bactérias descarboxilase positiva, evidenciando a habilidade do inóculo em se desenvolver de forma adequada e suprimir o desenvolvimento de bactérias contaminantes durante a fermentação, tais como sua importância na segurança da bebida produzida, pois a presença de aminas é indesejável em alimentos por seu efeito negativo no organismo humano.

Os diferentes mostos testados na fermentação não influenciaram no teor de carbamato de etila encontrado nos destilados, portanto os diferentes teores de nitrogênio e cobre encontrados nos mostos não interferem na formação do carbamato de etila. Este fato demonstra que a formação do carbamato de etila é independente da composição do mosto.

Em todas as amostras de cabeça e cauda dos diferentes destilados produzidos os teores de CE e cobre encontrados estão acima do permitido pela legislação, reforçando a importância de se separar tais frações na elaboração do destilado alcoólico, visando obtenção de uma bebida com qualidade e segurança alimentar.

Do carbamato de etila formado durante a fermentação, parte é arrastada para o destilado e parte fica no vinhoto; portanto, o tratamento e/ou inadequado do vinhoto pode trazer riscos ao meio ambiente e a saúde da população.

Os três gêneros (*Pichia*, *Kluyveromyces* e *Saccharomyces*) avaliados durante a fermentação de caldo-de-cana para produção de cachaça, apresentaram formação de carbamato de etila abaixo do valor estabelecido pela legislação de  $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , sendo que o gênero *Pichia* apresentou menor produção de carbamato de etila durante o período de fermentação. Isto demonstra que a utilização de inóculo selecionado no processo de produção de cachaça é de extrema importância para a qualidade e segurança da bebida produzida e para atender as especificações da legislação quanto à produção de carbamato de etila.

Este estudo mostra que com a utilização de inóculo adequado e separação correta das diferentes frações do destilado, pode-se elaborar uma cachaça, que atende os padrões estabelecidos pela legislação quanto à acidez, teores de cobre e carbamato de etila, garantindo a qualidade da bebida e segurança ao consumidor.