

**ALEXANDRE FONTES PEREIRA**

**SUPLEMENTAÇÃO DE NITROGÊNIO SOBRE A FERMENTAÇÃO  
ALCOÓLICA PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA, CERVEJA E VINHO**

**Dissertação 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 *Magister Scientiae*.**

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2007**

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

T

P436s  
2007  
Pereira, Alexandre Fontes, 1979-  
Suplementação de nitrogênio sobre a fermentação  
alcoólica para produção de cachaça, cerveja e vinho  
/ Alexandre Fontes Pereira. – Viçosa, MG, 2007.  
xii, 99f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Paulo Henrique Alves da Silva.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 90-99.

1. Fermentação. 2. Leveduras - Metabolismo.  
3. Nitrogênio. 4. Cinética. 5. Cachaça - Análise.  
6. Cachaça - Qualidade. 7. Cachaça - Composição.  
8. Vinho - Composição. 9. Carbamato de etila - Análise.  
10. Cromatografia a gás. I. Universidade Federal de  
Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 663.13


ALEXANDRE FONTES PEREIRA

**SUPLEMENTAÇÃO DE NITROGÊNIO SOBRE A FERMENTAÇÃO  
ALCOÓLICA PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA, CERVEJA E VINHO**

Dissertação 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 *Magister Scientiae*.


APROVADA : 13 de agosto de 2007.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. José Antonio Marques Pereira  
(Co-orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Márcio Henrique Pereira Barbosa  
(Co-orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. José Benício Paes Chaves

  
\_\_\_\_\_  
Prof. José Carlos Gomes

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Paulo Henrique Alves da Silva  
(Orientador)

*A Deus pela saúde e fé.  
Aos meus pais pelo amor e grande incentivo.  
Aos meus irmãos pelo grande exemplo.  
Ao professor Paulo Henrique Alves da Silva pela orientação.  
Ao meu tio Eduardo Rezende pelo grande apoio.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, o meu verdadeiro mestre, por me dar força para lutar e não desistir de um sonho.

À minha mãe Maria Amélia Fontes Pereira, pelo seu amor, exemplo, incentivo, carinho, apoio e por todos os momentos ao meu lado.

Ao meu pai Carlos Roberto Rezende Pereira, pelo amor, carinho e por todos os momentos de incentivo.

Aos meus irmãos Vinícius, Patrícia e Cristiane, pela grande amizade, carinho e exemplo.

À Universidade Federal de Viçosa, pela realização deste trabalho.

Ao professor Paulo Henrique Alves da Silva, pela excelente orientação, oportunidade, confiança, amizade e grande ensinamento que me proporcionou.

Ao professor José Antônio Marques Pereira, pela co-orientação, participação na banca examinadora e amizade.

Ao professor Márcio Henrique Pereira Barbosa, pela co-orientação, participação na banca examinadora e participação neste trabalho.

Ao professor José Benício Paes Chaves, pela orientação na parte estatística, participação na banca examinadora, pelos ensinamentos e amizade.

Ao professor José Carlos Gomes, pelos grandes ensinamentos, incentivo, amizade e participação na banca examinadora.

À professora Nilda de Fátima Ferreira Soares, pela oportunidade, pelos grandes ensinamentos, pela amizade e apoio.

Ao meu tio Eduardo Rezende Pereira, pelos grandes ensinamentos em cromatografia, amizade, apoio e incentivo.

À Mônica Neves Guimarães, pela dedicação, grande ajuda na parte experimental e amizade.

Ao Nívio Batista, pela grande amizade e ajuda na parte experimental.

Ao Leandro Dias Araujo, pela ajuda na realização deste trabalho e pela amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, aos professores e funcionários, pela contribuição e amizade.

Ao CNPQ, pela bolsa muito importante para a realização desta pesquisa.

Aos meus amigos em especial, Nathália Ramos Melo, Matheus Ottomar, Geruza Dias, Maria Patrícia Milagres e José Manoel Martins.

A todos que contribuíram e conviveram comigo durante a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

ALEXANDRE FONTES PEREIRA, filho de Carlos Roberto Rezende Pereira e Maria Amélia Fontes Pereira, nasceu em Viçosa, estado de Minas Gerais, em 26 de junho de 1979.

Graduou-se em Ciência e Tecnologia de Laticínios em março de 2003 pela Universidade Federal de Viçosa.

Iniciou, em fevereiro de 2006, o curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa.

## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	vi
RESUMO.....	ix
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Cachaça: histórico, características, leveduras, fermentação, legislação e processo de produção.....	3
<b>2.1.1. Leveduras na produção de aguardente de cana-de-açúcar.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.2. Fermentação alcoólica: etanol e compostos secundários da cachaça.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1.3. Aspectos legais referentes à cachaça. ....</b>	<b>5</b>
2.1.4. Processo de produção da cachaça.....	8
2.2. Cerveja: características gerais, leveduras etanologênicas, fermentação da cerveja e processo de produção .....	9
2.2.1. Características gerais da cerveja.....	9
2.2.2. Leveduras etanologênicas na produção da cerveja.....	9
2.2.3. Fermentação da cerveja .....	10
2.2.4. Processo de produção de cerveja .....	11
2.3. Vinho – características, principais voláteis e processo de produção .....	12
2.3.1. Características gerais do vinho.....	12
2.3.2. Principais voláteis encontrados em vinho .....	12
2.3.3. Processo de produção do vinho .....	13
<b>2.4. Suplementação de Nitrogênio e metabolismo de <i>Saccharomyces</i> .....</b>	<b>14</b>
2.5. Principais compostos voláteis encontrados nas bebidas alcoólicas.....	14
2.5.1. Acetaldeído.....	15
2.5.2. Acetato de etila .....	15
2.5.3. Álcoois Superiores .....	16
2.5.4. Ácido Acético .....	18
2.6. Contaminantes Orgânicos.....	18
2.6.1. Metanol.....	18
<b>2.6.2. Carbamato de etila.....</b>	<b>19</b>
2.6.3. 1- butanol e 2- butanol .....	24
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>

3.1. Cinética de fermentação e composição dos mostos de cachaça, cerveja e vinho .....	25
<b>3.1.1. Mosto de cachaça</b> .....	25
<b>3.1.2. Mosto de cerveja</b> .....	26
<b>3.1.3. Mosto de vinho</b> .....	28
3.2. Metodologias de análise de parâmetros cinéticos de fermentação em mostos de cachaça, cerveja e vinho .....	29
3.2.1. Determinação do teor de sólidos solúveis (°Brix) .....	29
3.2.2. Determinação do teor alcoólico por picnometria .....	29
O picnômetro foi previamente lavado com água e depois com álcool; posteriormente colocado em uma estufa e pesado. Depois de preenchido com água o picnômetro foi pesado a 20 °C. Foi repetido o procedimento de lavagem e secagem em estufa e posteriormente o picnômetro foi preenchido com a amostra até o seu transbordamento e pesado a 20 °C. ....	29
3.2.3. Medida da acidez total .....	30
3.3. Metodologias de análise cromatográfica nas amostras de cachaça, cerveja e vinho .....	30
3.3.1. Métodos cromatográficos de análise dos contaminantes orgânicos metanol, 1-butanol e 2-butanol .....	30
3.3.2. Métodos cromatográficos de análise de carbamato de etila .....	31
3.3.2.1. Análise em detecção por ionização em chama .....	32
3.3.2.2. Análise por detecção em espectrometria de massa .....	33
3.3.3. Método cromatográfico de análise dos álcoois superiores .....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
4.1. Influência da linhagem de levedura e da adição de nitrogênio na cinética de fermentação para a produção de cachaça .....	35
4.2. Influência da linhagem de levedura e da adição de nitrogênio na cinética de fermentação para a produção de cerveja .....	41
4.3. Influência da linhagem de levedura e da adição de nitrogênio na cinética de fermentação para a produção de vinho .....	46
4.4. Resultados das análises de compostos voláteis na cachaça por cromatografia gasosa .....	50
4.4.1. Influência de duas linhagens de levedura e da adição de fontes nitrogenadas na formação do acetato de etila em cachaça .....	50
4.4.2. Influência de duas linhagens de levedura e da adição de fontes nitrogenadas na formação do 1-propanol em cachaça .....	52

4.4.3. Influência de duas linhagens de levedura e da adição de fontes nitrogenadas na formação dos compostos acetaldeído e metanol em cachaça .....	53
4.4.4. Influência de duas linhagens de levedura e da adição de fontes nitrogenadas na formação dos compostos álcool isobutílico, álcool isoamílico e carbamato de etila em cachaça .....	55
4.4.5. Influência de duas linhagens de levedura e da adição nitrogenada na formação dos compostos ácido acético, 1-butanol e 2-butanol em cachaça ..	61
4.5. Resultados das análises de compostos voláteis em cerveja por cromatografia gasosa.....	65
4.5.1. Influência de duas linhagens de levedura e da adição nitrogenada na formação dos compostos acetato de etila, metanol e acetaldeído em cerveja .....	66
4.5.3. Influência de duas linhagens de levedura e da adição nitrogenada na formação do ácido acético em cerveja .....	73
4.5.4. Influência de duas linhagens de levedura e da adição nitrogenada na formação do 1-butanol e do 2-butanol em cerveja.....	74
4.5.5. Influência de duas linhagens de levedura e da adição nitrogenada na formação do carbamato de etila em cerveja .....	75
4.6. Resultados das análises de compostos voláteis em vinho por cromatografia gasosa .....	77
4.6.1. Influência de duas linhagens de levedura e da adição nitrogenada na formação do acetaldeído e do acetato de etila em vinho.....	78
4.6.2. Influência de duas linhagens de levedura e da adição nitrogenada na formação do metanol e do ácido acético em vinho.....	79
4.6.3. Influência de duas linhagens de levedura e da adição nitrogenada na formação dos compostos 1-propanol, isobutílico e isoamílico no vinho .....	80
4.6.4. Influência de duas linhagens de levedura e da adição nitrogenada na formação do carbamato de etila em vinho .....	83
4.6.5. Influência de duas linhagens de levedura e da adição nitrogenada na formação do 1-butanol em vinho .....	86
5. CONCLUSÕES .....	88
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>90</b>

## RESUMO

PEREIRA, Alexandre Fontes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2007. **Suplementação de nitrogênio sobre a fermentação alcoólica para produção de cachaça, cerveja e vinho.** Orientador: Paulo Henrique Alves da Silva. Co-orientadores: José Antônio Marques Pereira e Márcio Henrique Pereira Barbosa.

A etapa de fermentação alcoólica é de grande importância na composição química e sensorial das bebidas alcoólicas. O processo fermentativo é influenciado pela linhagem de levedura, pela presença de substâncias nitrogenadas no meio, pela temperatura e por outros fatores. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de duas linhagens de levedura, de alta e baixa fermentação, três fontes nitrogenadas, sulfato de amônio, peptona de caseína e um *pool* de aminoácidos, em três concentrações, 0 (sem adição), 5 g/L e 25 g/L, na cinética de fermentação e na composição de três tipos de bebidas: cachaça, cerveja e vinho. Os parâmetros analisados para cálculo da cinética de fermentação foram o pH, a acidez total, o teor de sólidos solúveis (°Brix) e o teor alcoólico (°GL), em amostras coletadas em 12, 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação em mostos para produção experimental de cachaça, cerveja e vinho. Os valores de pH nos mostos de cachaça, cerveja e vinho reduziram durante o processo fermentativo. No mosto para a fabricação de cachaça o pH variou de 5,4 a 3,0, no mosto de cerveja variou de 4,8 a 3,0 e no mosto de vinho variou de 3,6 a 3,0. A acidez aumentou nos três mostos com o tempo, mas não atingiu valores considerados fora dos limites legais. O maior rendimento da fermentação alcoólica, ou seja, maior produção de etanol por consumo de substrato foi obtido pela linhagem de levedura Saflager (baixa fermentação) utilizando como fonte de nitrogênio sulfato de amônio, na concentração de 5 g/L, nos mostos de cachaça, cerveja e vinho. As médias de concentração final de etanol nos mostos foram 7,7 °GL em cachaça, 4,8 °GL em cerveja e 14,6 °GL em vinho. Os principais compostos voláteis e contaminantes orgânicos presentes nas amostras de cachaça, cerveja e vinho foram analisados por cromatografia gasosa (GC), sendo

a análise de carbamato de etila confirmada por cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GCMS). Os principais voláteis analisados foram: acetaldeído, acetato de etila, 1-propanol, álcool isobutílico, álcool isoamílico e ácido acético. Os contaminantes orgânicos analisados foram: metanol, 1-butanol, 2-butanol e carbamato de etila. Nas amostras de cachaça os álcoois superiores, 1-propanol, isobutílico e isoamílico tiveram comportamentos diferentes para as leveduras de baixa fermentação (Saflager) e alta fermentação (Safbrew) e a adição de 5 g/L das fontes nitrogenadas já foi suficiente para elevar consideravelmente suas concentrações. Nas amostras de cerveja, os compostos 1-propanol e álcool isobutílico tiveram seus valores elevados com o aumento da concentração do sulfato de amônio. Já o álcool isoamílico atingiu valores mais elevados com a adição do *pool* de aminoácidos. A levedura de alta fermentação induziu uma maior produção de álcool isobutílico e de álcool isoamílico. Já a levedura de baixa fermentação induziu uma maior produção de 1-propanol. Os valores de carbamato de etila aumentaram nas amostras de cachaça, cerveja e vinho com o aumento na concentração das fontes nitrogenadas. Nas amostras de cerveja e vinho os valores mais elevados de carbamato de etila foram maiores na baixa fermentação, enquanto que nas amostras de cachaça estes valores foram superiores na alta fermentação.

## ABSTRACT

PEREIRA, Alexandre Fontes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2007. **Supplementation of nitrogen about the alcoholic fermentation for production of “cachaça”, beer and wine.** Adviser: Paulo Henrique Alves da Silva. Co-Advisers: José Antônio Marques Pereira and Márcio Henrique Pereira Barbosa.

The alcoholic fermentation step is of major importance on the sensory and chemical composition of alcoholic beverages. The fermentation process is influenced by the yeast strain, by the presence of nitrogen compounds on the environment, by the temperature and other factors. The objective of this paper was to evaluate the influence of two different yeast strains, of high and low fermentation, three nitrogen sources, ammonium sulfate, casein peptone and a *pool* of amino acids, in three different concentrations, 0 (with no addition), 5 g/L and 25 g/L, on the fermentation kinetics and on the chemical composition of three different types of liquors: “cachaça”, beer and wine. The analyzed parameters for the fermentation kinetic evaluation were the pH, the total acidity, the total soluble solid content (°Brix) and the alcoholic content (°GL), on samples collected between 12, 24, 48, 72 and 96 hours of fermentation in musts for the experimental production of “cachaça”, beer and wine. The pH on the three musts had a falling tendency with time. On the must for “cachaça” production, the pH varied between 5,4 and 3; on the beer must, between 4,8 and 3,0 and on the wine must, it varied between 3,6 and 3. The acidity increased with time for the three musts, but did not reach the values considered out of the Brazilian legal standard.

The higher productivity of the alcoholic fermentation, that is, the higher production of ethanol per consumption of substrate was obtained by the low fermentation (Saflager) yeast strain, using as nitrogen source ammonium sulfate 5 g/L, on the musts of “cachaça”, beer and wine. The final ethanol concentration average on the musts were 7,7°GL for “cachaça”, 4,8°GL for beer and 14,6°GL for wine. The major volatile compounds and organic contaminants contained on the “cachaça”, beer and wine samples were analyzed by gas chromatography (GC). The ethyl carbamate was also analyzed by gas chromatography with mass spectrometry

(GCMS). The main volatile compounds analyzed were: acetaldehyde, ethyl acetate, 1-propanol, isobutylic alcohol, isoamilic alcohol, acetic acid. The organic contaminants were methanol, 1-butanol, 2-butanol e ethyl carbamate. On the “cachaça” sample, the higher alcohols, 1-propanol, isobutylic alcohol and isoamilic alcohol had different results for the low fermentation yeast (Saflager) and for the high fermentation yeast (Safbrew). The addiction of 5 g/L of the nitrogen source was enough to elevate considerably the concentrations of higher alcohols. On the beer samples, the compounds 1-propanol and isoamilic alcohol had their values increased with a higher concentration of ammonium sulfate. On the other hand, the isoamilic alcohol reached bigger values with the addiction of the amino acids *pool*. The high fermentation yeast induced a higher production of isobutylic alcohol and isoamilic alcohol, while the low fermentation yeast induced a higer production of 1-propanol. The ethyl carbamate values increased on the cachaça, beer and wine samples with the increase of the nitrogen source concentration; on the beer and wine samples, the ethyl carbamate values were higher on the low fermentation, while on the “cachaça” sample these values were higher on the high fermentation.

## 1. INTRODUÇÃO

Os processos biotecnológicos dos quais as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* participam são os mais difundidos mundialmente, sendo responsáveis por toda a produção industrial de bebidas alcoólicas e de bioetanol do mundo. Do ponto de vista econômico e tecnológico estas leveduras são, portanto, consideradas os microrganismos mais importantes.

Bebidas alcoólicas são classificadas em fermentadas, fermento-destiladas e mistura. As mais produzidas e consumidas mundialmente são a cerveja, o vinho e a cachaça. Uma grande diferença entre elas é o teor alcoólico, que varia de 3 % a 8 % na cerveja, 9 % a 11 % no vinho e 38 % a 54 % na cachaça e aguardente de cana-de-açúcar, medido a 20 °C. Além desta característica do produto final, o tipo de matéria-prima envolvido na produção diferencia os tipos de bebidas.

São vários os fatores que interferem na qualidade das bebidas alcoólicas. Destaca-se entre eles: o tipo e a qualidade da matéria-prima, o tipo e o método de condução do processo fermentativo, as práticas tecnológicas, as operações unitárias envolvidas no processamento e as características de maturação e envelhecimento. Grande ênfase tem sido dada às leveduras e as condições de fermentação, pois são em função de seus metabolismos que são gerados os diversos tipos de bebidas alcoólicas.

Na produção de bebidas alcoólicas a complementação nitrogenada do mosto, com substâncias nitrogenadas como sulfato de amônio, amônia, uréia, proteína, pequenos peptídeos, bases nitrogenadas ou aminoácidos pode constituir uma prática benéfica para a multiplicação e o desenvolvimento do fermento, aumentando os índices de eficiência, rendimento e produtividade do processo. A levedura da fermentação alcoólica, espécie *Saccharomyces cerevisiae* é, portanto capaz de utilizar, além das fontes de nutrientes orgânicos, diversos compostos nitrogenados, iniciando-se o metabolismo através de diversos sistemas de transporte e absorção. Embora conveniente, se não for bem conduzida, a prática de enriquecimento nitrogenado pode na realidade prejudicar a qualidade do produto final, pois a produção de diversos compostos secundários é também influenciada pelos mesmos substratos.

Alguns álcoois superiores são produzidos metabolicamente a partir de certos aminoácidos, sendo influenciados pela composição do meio e pelas suas características, tais como concentração e tipo de fonte de nitrogênio, concentração e tipo de açúcares, pH, temperatura, grau de aeração durante a fermentação e linhagem da levedura.

Contrastando com o empirismo de séculos atrás, atualmente os processos fermentativos alcoólicos têm diversos métodos instrumentais que permitem um monitoramento bem eficiente de suas produtividades. Da mesma maneira, várias linhagens de leveduras podem ser empregadas nos vários segmentos da indústria de bebidas. A escolha do tipo de linhagem pode influenciar significativamente a eficiência e a qualidade do processo fermentativo, bem como a qualidade química e sensorial do produto final. As leveduras são por si só, importantes produtoras de aroma.

O etanol é proveniente do metabolismo principal das leveduras e, em paralelo, diversos compostos secundários são produzidos em proporções menores, mas de importância preponderante para a composição e a qualidade química e sensorial das bebidas. Os compostos secundários podem influenciar positivamente ou negativamente a qualidade das bebidas. A presença e a concentração destes compostos são responsáveis pelas características de qualidade. As principais classes de compostos secundários já identificados em bebidas são: aldeídos, ésteres, álcoois superiores, cetonas, ácidos graxos e seus ésteres, compostos fenólicos, mercaptanas e outros.

Nos últimos anos a identificação e quantificação de alguns grupos de compostos têm sido cada vez mais pesquisadas devido à relação dos mesmos com problemas toxicológicos ao ser humano. Algumas ações cancerígenas sobre o sistema nervoso central têm sido associadas ao carbamato de etila e a outros grupos de compostos, como álcoois superiores, aldeídos, acroleína, etc.

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar os efeitos da adição de diferentes fontes de nitrogênio sobre a fermentação alcoólica conduzida por duas linhagens de levedura. Estes efeitos foram avaliados sobre a composição do mosto, sobre a cinética dos processos fermentativos e sobre a formação de compostos secundários que interferem na qualidade de cachaça, cerveja e vinho produzidos experimentalmente em laboratório.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Cachaça: histórico, características, leveduras, fermentação, legislação e processo de produção

A história da cachaça se confunde com a própria história do Brasil. Foi a primeira bebida destilada na América Latina, descoberta entre os anos 1534 e 1549, durante o processo de produção do açúcar. Ali surgia a aguardente de cana genuinamente brasileira, denominada cachaça. Hoje, é uma bebida muito consumida, com cerca de 5 mil marcas, 30 mil produtores no Brasil e volume anual em torno de 1,4 bilhões de litros (ABRABE, 2006).

A industrialização da cana-de-açúcar no Brasil tem grande importância econômica, estimando-se que cerca de 15 milhões de pessoas, diretamente ou indiretamente empregadas, estejam envolvidas nas atividades de produção de cachaça, álcool, açúcar, melado e rapadura (SEBRAE, 2005).

Legalmente a cachaça é “a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de trinta e oito a quarenta e oito por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até seis gramas por litro, expressos em sacarose” (BRASIL, 2003). As aguardentes de cana-de-açúcar, que abrangem as cachaças, podem ter graduação alcoólica de até 54 ° GL.

No Brasil a cachaça pode ser informalmente dividida em três segmentos: as industriais, as artesanais e as informais, sendo que as últimas não têm qualquer tipo de registro.

Denominam-se cachaças industriais aquelas produzidas em larga escala, utilizando-se de colunas contínuas de destilação, leveduras prensadas no processo de fermentação e outros processos não convencionais em um sistema artesanal, como a queima da cana antes da colheita. As empresas produtoras concentram-se nos estados de São Paulo, Ceará, Pernambuco e Rio de Janeiro, e respondem pela maior parte da produção nacional, chegando a mais de 70 % do total produzido.

As cachaças denominadas artesanais ou de alambique são aquelas produzidas em pequenas destilarias, onde normalmente se emprega mão-de-obra

familiar. A produção da cachaça é feita utilizando-se fermento “caipira” ou selvagem, destilado em alambiques de cobre, com separação das frações do destilado, entre outros procedimentos. Estes procedimentos caracterizam a cachaça artesanal como de melhor qualidade sensorial do que as industriais. A produção chega a 400 milhões de litros anuais, segundo o Ministério da Agricultura (OLIVEIRA et al., 2005).

### **2.1.1. Leveduras na produção de aguardente de cana-de-açúcar**

MORAIS et al. (1997) observaram que durante a multiplicação do fermento natural e no decorrer da fermentação para a produção de aguardente de cana artesanal, a qual varia de 12 horas a 48 horas, há uma sucessão de espécies de leveduras, sendo a espécie predominante *Saccharomyces cerevisiae*. *Cândida sake*, *Kluyveromyces marxianus var. drosophilarum* e outras leveduras também são freqüentes. Espécies de leveduras transientes também foram encontradas em número variável, provavelmente proveniente das adições diárias de caldo de cana nas dornas de fermentação.

Com o progresso da tecnologia de fermentação alcoólica e da taxonomia de leveduras, foi possível verificar também que a linhagem predominante é a que possui características mais propícias de adaptação às diferentes condições de processo, tais como teor de açúcar no mosto, teor de etanol no vinho, acidez do vinho, operação de clarificação do caldo, temperatura do mosto. Alterando-se as condições de processo, provavelmente será estabelecido um novo equilíbrio entre as linhagens de leveduras, podendo surgir outra linhagem dominante. Assim, a inoculação de uma linhagem selecionada, ou de uma linhagem dominante isolada de uma determinada destilaria não garante sua permanência e/ou melhora a eficiência em outras destilarias (BASSO et al., 1993).

A utilização de linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* na fabricação da cachaça de alambique está sendo avaliada por alguns pesquisadores (PATARO et al., 2002) em conjunto com produtores de cachaça artesanal de Minas Gerais. As linhagens selecionadas têm sido utilizadas como fermento iniciador e têm conseguido dominar a fermentação por um período de 20 a 30 dias. Esses mesmo autores verificaram também que o uso da levedura

selecionada, na maioria das vezes, aumentou a produtividade do alambique e melhorou a qualidade do produto final, principalmente em relação aos teores de acidez e concentração de álcoois superiores.

### **2.1.2. Fermentação alcoólica: etanol e compostos secundários da cachaça**

São vários os fatores que interferem na qualidade das bebidas alcoólicas, tais como: a matéria-prima, a fermentação, o método de condução do processo fermentativo, a destilação, o envelhecimento, etc. No entanto, as leveduras e as condições de fermentação têm sido apontadas como os fatores que mais influenciam o aroma das bebidas alcoólicas (SUOMALAINEN e LEHTONEN, 1979).

Na linha de produção de aguardente, é na etapa da fermentação alcoólica que são produzidos os principais componentes químicos da bebida, pela ação direta ou indireta da levedura e de outros microrganismos atuantes nesta fase. (GUTIERREZ, 1993).

A cachaça é composta principalmente de água e álcool em proporções variáveis, segundo a sua graduação e de componentes secundários em quantidades muito menores, que conferem à bebida suas características peculiares de aroma e sabor (CARDOSO, 2001). Os componentes secundários, responsáveis pelo aroma ou “bouquet” das bebidas, pertencem às seguintes classes: aldeídos, álcoois superiores, ésteres, furfural, terpenos, lactonas, furanos, pirazinas e ácidos orgânicos, dentre outros. (LEHTONEN e JOUNELA-ERIKSSON, 1983; NYKANEN, 1983).

### **2.1.3. Aspectos legais referentes à cachaça.**

A produção de cachaça no Brasil está buscando uma imagem fortemente vinculada à qualidade da bebida e investindo no desenvolvimento de um mercado consumidor mais exigente, de modo a diversificar e desvincular-se parcialmente de sua linha tradicional de bebida popular. Neste sentido, principalmente os pequenos e médios produtores já se estruturaram e conseguiram resultados, colocando no mercado aguardentes de qualidade, abrindo espaço para

consumidores diferenciados e exportação do produto. Essa cachaça de qualidade tem permitido a agregação de valor do seu preço ao consumidor, remunerando e permitindo um ciclo de expansão aos produtores artesanais. Um exemplo concreto é encontrado na iniciativa de produtores tradicionais de Minas Gerais, que se organizaram e fundaram a AMPAQ – Associação Mineira de Produtores de Aguardente de Qualidade, que instituiu um “selo de qualidade” para orientação do consumidor e garantia da qualidade.

Apesar da tradição e importância da cachaça, a cadeia produtiva do país não é tecnologicamente homogênea, havendo uma busca no desenvolvimento de tecnologias para aprimorar e controlar a qualidade e a padronização da bebida (MIRANDA, 2005). Estes dois fatores, qualidade e padronização, são essenciais para que a cachaça atinja patamares mais altos de consumo no mercado externo e interno. Em ambos os mercados se vêem aumentar as pressões para a melhoria da qualidade.

No mercado externo percebe-se que as exigências relativas à especificação de produtos e insumos estão substituindo gradativamente as barreiras tarifárias, transformando-se no fator determinante do protecionismo comercial e do ganho de mercado (SEBRAE, 2005). Desta maneira, os produtos que atenderem ou superarem a qualidade exigida terão maiores chances de conquistar o mercado, e aqueles que não chegarem a esta meta, apenas não serão aceitos, sendo retirados do mercado.

Da mesma maneira que no exterior, as exigências de qualidade se tornam mais intensas também no mercado interno. Os produtores buscam melhores equipamentos e serviços, enquanto os consumidores buscam por produtos que traduzam sua expectativa de satisfação, qualidade e status, determinando sua escolha.

Reiterando, a cachaça é um produto de importância econômica crescente, cuja grande aceitação no mercado nacional e internacional impõe uma melhoria na qualidade dos produtos, e assim o estabelecimento de um controle químico e sensorial bem superior ao existente.

Em nível nacional, a cachaça deve seguir os padrões de qualidade estabelecida pela Instrução Normativa nº13, de 30 de junho de 2005. Esta Instrução Normativa aprova o Regulamento Técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. Este documento

define e diferencia os termos cachaça e aguardente, além de estabelecer os limites de cada composto significativo na bebida (BRASIL, 2005). Os limites da legislação estão representados nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1 – Limites dos Compostos Secundários na cachaça, em mg/100 mL de álcool anidro.**

<b>Composto</b>	<b>Limite Máximo</b>
<b>Acidez Volátil, expressa em ácido acético</b>	150
<b>Ésteres totais, expressos em acetato de etila</b>	200
<b>Aldeídos totais, expressos em acetaldeído</b>	30
<b>Somas dos álcoois superiores: isoamílico, isobutílico e 1-propanol</b>	360
<b>Soma de furfural e hidroximetilfurfural</b>	5
<b>Metanol</b>	20

Fonte: BRASIL, 2005.

**Tabela 2 – Limites dos Contaminantes orgânicos na cachaça, em mg/100 mL de álcool anidro.**

<b>Composto</b>	<b>Limite Máximo</b>
<b>Álcool metílico (metanol)</b>	20
<b>Carbamato de etila</b>	0,15
<b>Acroleína</b>	5
<b>Álcool séc-butílico (2-butanol)</b>	10
<b>Álcool n-butílico (1-butanol)</b>	3

Fonte: BRASIL, 2005.

#### 2.1.4. Processo de produção da cachaça



Fluxograma do processo de produção, segundo SILVA (1995):

## **2.2. Cerveja: características gerais, leveduras etanologênicas, fermentação da cerveja e processo de produção**

### **2.2.1. Características gerais da cerveja**

A cerveja é uma bebida não destilada, obtida pela fermentação alcoólica de mosto de cereal maltado, geralmente malte de cevada. O uso de outra matéria-prima amilácea é facultativo, e em geral o teor alcoólico é baixo, de 3 % a 8 %. A primeira fase do processo de produção de cerveja ocorre na chamada sala de fabricação, onde as matérias-primas (malte e adjuntos) são misturadas e dissolvidas visando à obtenção de uma mistura líquida açucarada chamada mosto, o qual é a base para a futura cerveja. Os processos envolvidos são: a moagem do malte, a mistura com água, o aquecimento para facilitar a dissolução, a transformação do amido em açúcar pelas enzimas do malte, a filtração para separar as cascas do malte e dos adjuntos, adição do lúpulo, fervura do mosto para dissolução do lúpulo e esterilização, resfriamento e por último a aeração do mosto. Após o resfriamento e aeração, o mosto recebe fermento, dando início à fase de fermentação. Nesta fase, o fermento transforma o açúcar do mosto em álcool e gás carbônico, obtendo assim a energia necessária à sua sobrevivência (AQUARONE, et al., 2001).

### **2.2.2. Leveduras etanologênicas na produção da cerveja**

O fermento utilizado na fermentação alcoólica da cerveja é uma *Saccharomyces ssp* que pertence à família *Saccharomycetaceae* e se distingue das restantes por suas características morfológicas e fisiológicas (AQUARONE, 2001; EHRHARTD & SASSEN, 1995).

As leveduras de baixa fermentação são espécies de *Saccharomyces uvarum* ou também *Saccharomyces calshbergensis*, que produzem a cerveja americana e a alemã Pilsener do tipo lager. Essas cervejas são processadas pela fermentação profunda (baixa), na qual as leveduras se depositam, após a fermentação tumultuosa, no fundo do tanque. Os agentes biológicos de baixa fermentação são considerados como de alta atividade fermentativa e de menor

capacidade respiratória que as leveduras de alta fermentação (*Saccharomyces cerevisiae*). A levedura de baixa fermentação desenvolve-se em temperatura de 5 °C a 15 °C (REINOLD, 1997).

*Saccharomyces cerevisiae* é considerada levedura de alta fermentação, pois emerge para superfície após a fermentação tumultuosa (ou principal). Essas espécies de leveduras produzem as cervejas inglesas Porter ou Stout do tipo ale, que geralmente são produzidas por fermentação superficial (alta). Esse microrganismo se desenvolve em temperaturas de 12°C a 21°C (EHRTHARTD & SASSEN, 1995; REINOLD, 1997). Embora esta diferenciação seja empregada no setor de cervejarias, outras classificações são utilizadas para agrupar diferentes espécies e linhagens de *Saccharomyces* (ANDRIETA et al., 1999; VAUGHAN-MARTINI et al., 1993).

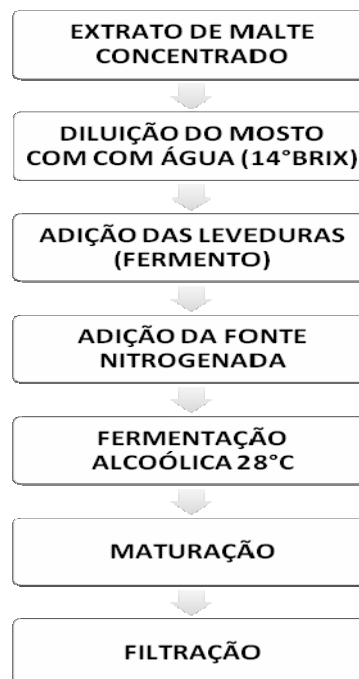
### **2.2.3. Fermentação da cerveja**

A fermentação é certamente a fase mais importante para o paladar da cerveja, visto que paralelamente à transformação de açúcar em álcool e gás carbônico, o fermento produz outras substâncias em menores proporções, mas que são as responsáveis pelo aroma e o sabor do produto. Após a fermentação ocorre a etapa de maturação e ao término desta fase a cerveja está praticamente concluída, com aroma e sabor finais definidos. A cerveja passa por uma etapa chamada de filtração, que visa à eliminação de partículas suspensas. A mesma passa por filtros especiais que retêm células de leveduras em suspensão, resinas do lúpulo e colóides, que constituem a maior parte das substâncias suspensas. Em seguida, passa por filtros de celulose que retêm as partículas mais finas, assegurando o brilho e a perfeita transparência da cerveja. Essa etapa do processo não altera a composição e o sabor da cerveja, mas é fundamental para garantir sua apresentação, conferindo-lhe um aspecto cristalino. Depois de filtrada a cerveja está pronta para ser envasada, é a fase final do processo de produção, porém esta fica armazenada em adegas de pressões que garantem a pressão dentro do tanque, evitando assim a incorporação de oxigênio pela bebida que pode ser prejudicial para o paladar da cerveja (POTTER, et al., 1999).

Em seguida, a bebida é acondicionada em garrafas, latas ou barris, sendo comum às cervejarias submeter a cerveja ao processo de pasteurização, principalmente quando as embalagens garrafa e lata são utilizadas. Já no barril, a bebida normalmente não é pasteurizada e por isso recebe o nome de chopp. A pasteurização nada mais é que um processo térmico, no qual a cerveja é submetida a um aquecimento a 60 °C por um determinado tempo e posterior resfriamento, visando conferir maior estabilidade ao produto, assegurando assim, vida útil ao produto seis meses após a fabricação do mesmo. Os controles rigorosos durante todas essas etapas do processo visam a garantia do produto final. Por isso, faz-se necessário estudar as etapas críticas de cada fase do processo a fim de que esses pontos críticos não venham a impactar na qualidade do produto final.

#### 2.2.4. Processo de produção de cerveja

O processo básico de fabricação consiste em diversas etapas e qualquer variação nesses ingredientes e/ou processos gera diferentes tipos de cerveja. O fluxograma genérico de produção de cerveja, empregado neste trabalho, é apresentado no fluxograma a seguir.



Fluxograma para a produção de cerveja

## **2.3. Vinho – características, principais voláteis e processo de produção**

### **2.3.1. Características gerais do vinho**

O vinho é definido como a bebida fermentada que provém exclusivamente de mosto de uvas frescas, transformado inicialmente pela ação de leveduras e posteriormente por bactérias maloláticas, em um processo simbiótico. É uma bebida de grande complexidade química devido à natureza das moléculas presentes e de suas reatividades. Como todo alimento ou bebida fermentada, as etapas de fermentação são críticas para a obtenção de um produto de alta qualidade. Esta qualidade pode ser expressa por parâmetros químicos, físicos, microbiológicos e sensoriais.

Com relação aos processos fermentativos envolvidos na produção do vinho, as suas eficiências podem ser estimadas pela produtividade, referenciada pelo consumo de substratos, formação de produtos e/ou balanceamento de compostos secundários. Estes compostos têm características específicas de volatilidade e estabilidade, posicionando-se de maneira diferenciada em relação à participação no sabor e na conservação da bebida.

A adição de leveduras e bactérias selecionadas na etapa de fermentação é uma tendência universal em biotecnologia, proporcionando processos mais produtivos, controláveis e mais seguros em termos de qualidade. Algumas vias metabólicas indesejáveis dos microrganismos podem ser inibidas ou mesmo suprimidas por manipulações de processo. (MANFROI, 2002).

### **2.3.2. Principais voláteis encontrados em vinho**

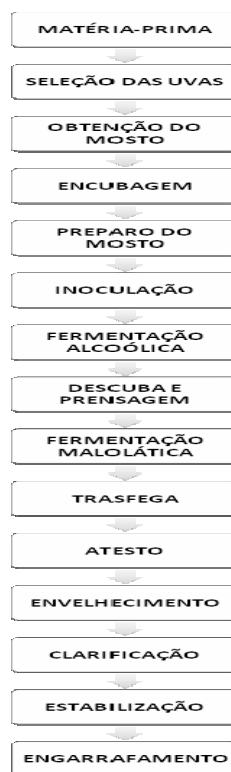
O aroma de vinhos foi objeto de numerosos estudos, mesmo assim diversos questionamentos permanecem até os dias atuais sobre o papel de certos compostos voláteis com função aromática no vinho. Isto é particularmente verdade no caso de vinhos de aroma complexo e principalmente nesses de mais alto grau de qualidade e complexidade. Com esta dificuldade, novos métodos de análise estão surgindo de forma a correlacionar a análise química (instrumental) e

a análise sensorial. Um exemplo é a cromatografia gasosa com olfatometria (GC-O). (FERREIRA et al., 2001).

Alguns processos e características das matérias-primas têm sido bastante investigados no campo da enologia para otimizar as características sensoriais (aroma e sabor) e a qualidade intrínseca do vinho. É de grande importância a variedade da uva, o fermento utilizado, o uso de enzimas selecionadas, a maceração das uvas em condições controladas de atmosfera e temperatura. Para a obtenção de um vinho de boa qualidade é de grande importância a identificação e a quantificação de seus compostos secundários, dentre eles os polifenóis, terpenos, compostos sulfurados voláteis, antocianinas, taninos, álcoois superiores, acetaldeído, acetato de etila e outros. (FLAMINI, 2003).

Diversos compostos voláteis têm sido encontrados no vinho e são os principais responsáveis pelo seu aroma e sabor. É de grande importância o estudo destes voláteis, o seu limiar de percepção sensorial, o “threshold”. Diversos estudos têm procurado a identificação e a quantificação destes voláteis pelo método de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (FID) e com espectrometria de massa. (BOIDO, et al., 2003).

### 2.3.3. Processo de produção do vinho



Fluxograma do processo de produção de vinho (LONA, 1998).

## **2.4. Suplementação de Nitrogênio e metabolismo de *Saccharomyces***

A busca de padrões operacionais adequados para assegurar a qualidade das bebidas alcoólicas deverá considerar ajustes nos níveis dos nutrientes disponíveis para a levedura, de modo a equilibrar seus efeitos benéficos sobre a viabilidade celular e o metabolismo fermentativo com níveis adequados de compostos secundários da fermentação (DOMINGUEZ, NELSON e MAIA, 1997).

Em todos os processos industriais em que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* participa os meios de cultura devem conter necessariamente uma fonte de nitrogênio, além de uma fonte de carbono, sais minerais e vitaminas (COOPER, 1994). O metabolismo do carbono é amplamente entendido e pesquisado. Já o metabolismo de nitrogênio necessita de mais estudos e pesquisas. O nitrogênio é um elemento essencial aos organismos vivos, sendo que as células de levedura podem utilizar uma ampla variedade de compostos nitrogenados, tais como: amônio, aminoácidos e peptídeos. Nem todas as fontes de nitrogênio propiciam crescimento igualmente eficiente. Foi observado que amônia, glutamato, glutamina e asparagina são preferencialmente utilizadas por leveduras e induzem altas taxas de crescimento. Quando estas fontes primárias estão ausentes ou presentes em baixas concentrações, fontes nitrogenadas alternativas, como outros aminoácidos e peptídeos podem ser utilizadas (TERSCHURE et. al., 2000).

A cinética da fermentação e a produção de aromas e metabólitos secundários podem ser em parte, dependentes da qualidade e quantidade de nitrogênio do mosto (HENSCHKE & JIRANEK, 1994).

## **2.5. Principais compostos voláteis encontrados nas bebidas alcoólicas**

Os compostos voláteis presentes nas bebidas alcoólicas são os compostos secundários formados na fermentação alcoólica do mosto ou durante alguma etapa do processo de fabricação. A natureza e proporção desses compostos são determinadas em diferentes níveis, pelas características da matéria-prima, da fermentação, da destilação e do envelhecimento. Os principais compostos secundários formados durante a fermentação alcoólica pertencem às classes funcionais dos ácidos, ésteres, aldeídos e álcoois, e em proporções menores formam-se também cetonas, compostos fenólicos aminas e mercaptanas

As bebidas alcoólicas são formadas basicamente por uma solução de etanol em água. Estes são os dois compostos majoritários. O que diferencia os produtos são as pequenas concentrações dos compostos secundários, sendo que os álcoois superiores, principalmente o isoamílico, isobutílico e o 1-propanol e os ésteres, principalmente o acetato de etila, contribuem mais significativamente para o aroma e sabor (MIRANDA, 2005).

### 2.5.1. Acetaldeído

O acetaldeído (figura 1) é um aldeído presente naturalmente em diversas fontes como nas folhas de tabaco, no aroma de frutas como: pêra, maçã, morango, abacaxi; no óleo essencial de magnólia, alecrim, bálsamo, cânfora, mostarda. Em bebidas é formado durante o processo fermentativo (BURDOCK, 2002). O acetaldeído provém da descarboxilação do piruvato (MAMEDE, 2004). Sua formação durante a fermentação alcoólica depende da linhagem da levedura, do pH, de substâncias nitrogenadas, da temperatura de fermentação e, principalmente, da quantidade de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) adicionado ao mosto (FICAGNA, 2005). No caso da produção de cachaça não é prática comum a adição de dióxido de enxofre ao meio.

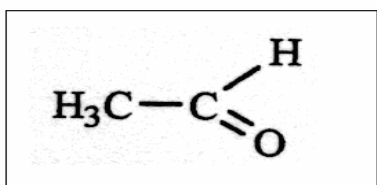


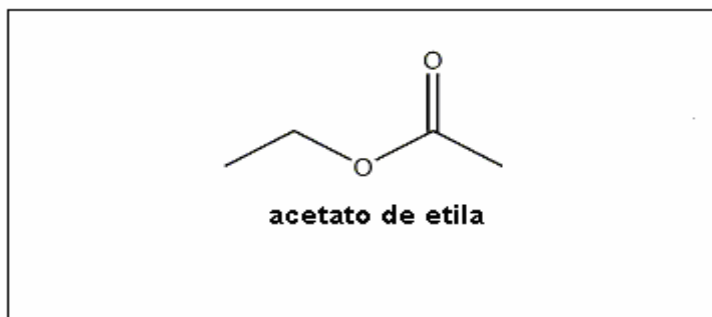
Figura 1 – acetaldeído

### 2.5.2. Acetato de etila

Os ésteres, em geral, são formados durante a fermentação alcoólica (esterificação biológica) graças às leveduras e bactérias, e mais lentamente no curso de envelhecimento do vinho através de esterificação química.

O acetato de etila (figura 2) é o éster formado pelas leveduras em maior quantidade durante as fermentações alcoólicas. O acetato de etila corresponde à cerca de 80 % do conteúdo total de ésteres na aguardente de cana, em pequenas concentrações confere aroma agradável de frutas, enquanto que em elevadas

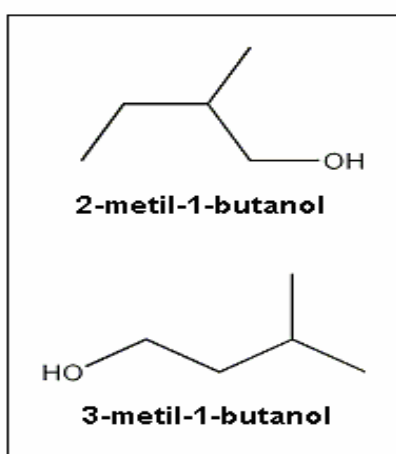
concentrações este éster participa de forma negativa na qualidade do mesmo, sendo que é um componente característico da “cabeça” do destilado. (FIGANA, 2005).



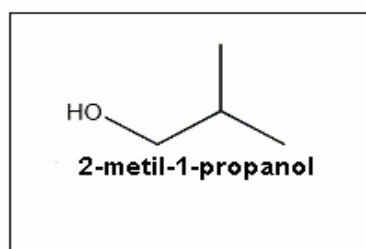
**Figura 2 - acetato de etila**

### 2.5.3. Álcoois Superiores

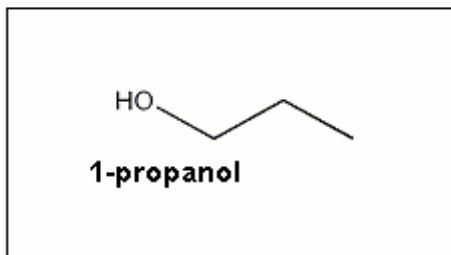
Durante a fermentação alcoólica, as leveduras produzem, além do etanol, outros álcoois com mais de dois carbonos em sua cadeia, os chamados álcoois superiores (figuras 3, 4 e 5). Estes álcoois de interesse na cachaça, no vinho e na cerveja e que devem ser quantificados são os álcoois: isoamílico (álcoois 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol), isobutílico (2-metil-1-propanol) e do n-propílico (1-propanol). O limite máximo da soma das concentrações destes álcoois é de 360 mg/100 mL de álcool anidro (BRASIL, 2005).



**Figura 3 – álcool isoamílico**

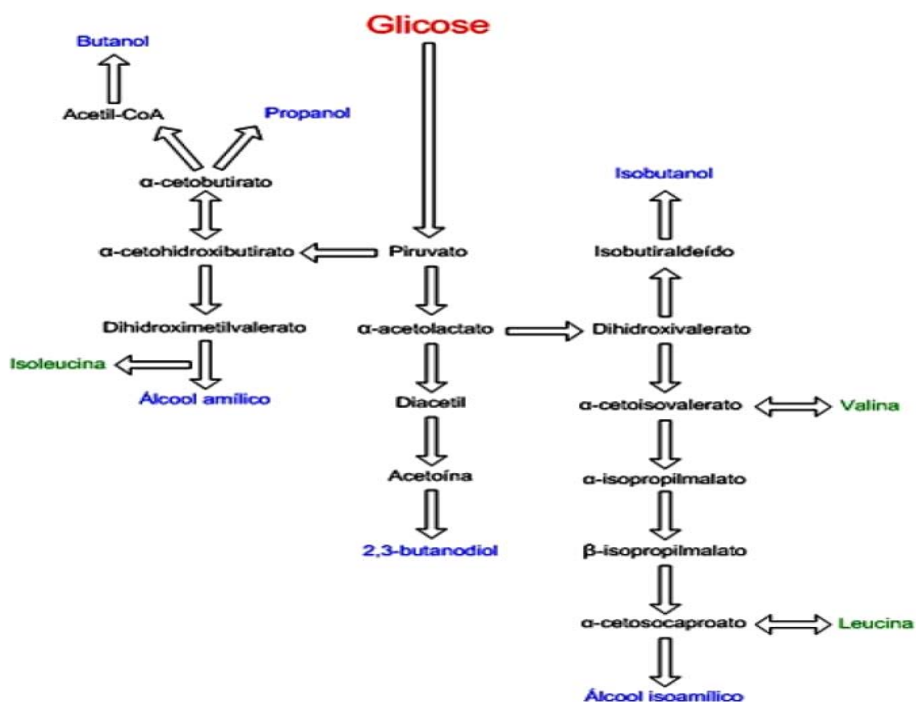


**Figura 4 – álcool isobutílico.**



**Figura 5 – 1-propanol.**

A produção destes álcoois durante a fermentação alcoólica é influenciada principalmente pelas condições do meio, entre elas, a concentração de açúcares, o pH, o conteúdo e a fonte de nitrogênio disponível, a temperatura de fermentação, a aeração e a linhagem de levedura. (FIGANA, 2005). Eles são formados a partir do desvio do metabolismo dos aminoácidos pelas leveduras, ocasião em que cetoácido envolvido é descarboxilado a aldeído, com posterior redução a álcool superior. Com o aumento do número de carbonos, o aroma modifica-se substancialmente e os álcoois tornam-se oleosos; alguns deles lembram fortemente aroma de flores (CARDOSO *et al.*, 2001).

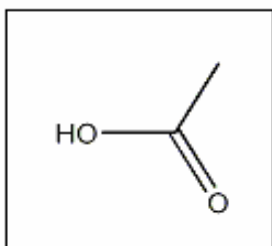


**Figura 6 – Formação dos álcoois superiores em bebidas alcoólicas.**

#### 2.5.4. Ácido Acético

A acidez volátil na cachaça é expressa em concentração de ácido acético (figura 7), que é o ácido volátil predominante. Usualmente uma grande concentração de ácido acético é consequência de má condição do mosto fermentado, tendo havido contaminação por bactérias acéticas que utilizam o etanol em seu metabolismo produzindo o ácido. Também a condução da destilação pode acarretar cachaça com acidez elevada e o reflexo natural é de um produto final de baixa qualidade (MIRANDA, 2005).

A legislação vigente no país hoje impõe um limite máximo de 150 miligramas de ácido acético por 100 mililitros de álcool anidro (BRASIL, 2005). Este limite é alto e gera discussões entre os técnicos envolvidos na área. Entretanto, na legislação esses teores são mantidos elevados não visando salvaguardar a cachaça recém destilada de má qualidade, mas certamente a envelhecida cujo teor aumenta com o tempo de envelhecimento em função da oxidação de etanol com formação de ácido acético e acetaldeído. Desse modo, uma cachaça de baixa acidez inicial pode revelar seu grau de maturação pelo aumento da acidez volátil que, todavia, não desqualifica o produto no aspecto sensorial pelo conjunto agradável que forma com outros componentes (MIRANDA, 2005).



**Figura 7 – ácido acético**

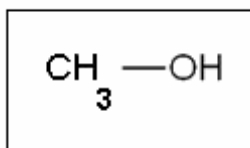
### 2.6. Contaminantes Orgânicos

#### 2.6.1. Metanol

O metanol (figura 8) é um álcool considerado como um contaminante nas bebidas alcoólicas, com isso, sua presença é indesejável. Tolera-se um limite de no máximo 20 mg/100 mL de álcool anidro na cachaça, pela legislação brasileira em vigor (BRASIL, 2005).

O metanol não é proveniente da atividade do metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*, mas pela atividade de enzimas pécnicas. A pectinesterase catalisa a desesterificação do metil éster do polímero do ácido poligalacturônico para formar ácido péctico, metanol e íons hidrogênio

No organismo, o metanol é oxidado a ácido fórmico e posteriormente a CO<sub>2</sub>, provocando uma acidose grave (diminuição do pH sangüíneo), afetando o sistema respiratório, podendo levar ao coma e até mesmo à morte. A ingestão de metanol, mesmo em quantidades reduzidas, em longos períodos de consumo, pode provocar cegueira e até mesmo a morte. (FICAGNA, 2005).



**Figura 8 – metanol**

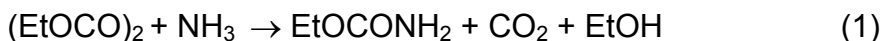
### **2.6.2. Carbamato de etila**

O Carbamato de etila ou uretana, com fórmula molecular **H<sub>2</sub>NCOOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>**, é um composto potencialmente carcinogênico (SCHLATTER, 1995). Ele é formado naturalmente em alimentos e bebidas tais como: pão, iogurte, vinho, cerveja, saquê e principalmente em bebidas fermento-destiladas tais como: uísque, rum, vodka, grapa, cachaça e tiquira (BOSCOLO, 2002). Sendo o Brasil um dos maiores produtores de destilados alcoólicos do mundo, é muito importante o conhecimento dos níveis de ocorrência de uma substância potencialmente carcinogênica como o carbamato de etila em tais produtos, pois além dos aspectos ligados à saúde pública, a sua presença em concentrações superiores a 150 µg/L constitui também uma barreira para exportações para a Europa e América do Norte (LAWRENCE, 1990).

Existem várias vias possíveis para a formação de carbamato de etila nas bebidas destiladas, geralmente envolvendo a reação entre o etanol e precursores nitrogenados, tais como: uréia, fosfato de carbamila e cianeto. Este último é considerado um precursor de carbamato de etila durante e após o processo de destilação (COOK, et al., 1990).

O Canadá, em 1985, através do “Health and Welfare Department” estabeleceu os seguintes teores máximos de carbamato de etila para bebidas alcoólicas: vinhos 30 µg/L; vinhos fortificados 100 µg/L; bebidas destiladas 150 µg/L; destilados de frutas e licotes 400 µg/L. 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. Muitas metodologias analíticas vêm sendo propostas para a determinação de carbamato de etila em alimentos, todas empregando a cromatografia a gás com diferentes dispositivos de detecção (DENNIS, et al., 1986).

A pesquisa sobre a formação de carbamato de etila em alimentos começou em 1970, com a investigação sobre a formação deste composto a partir da reação de amônia com pirocarbonato de dietila (eq.1), aditivo usado na fabricação de vinho, com a finalidade de controlar a atividade microbológica (ARESTA et al., 2001). Esta reação depende da concentração do íon amônia e ocorre na faixa de pH entre 4 e 9 e em condições mais ácidas onde existe o equilíbrio  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ .



Este não é o único mecanismo para a formação de carbamato de etila em bebidas alcoólicas. Na verdade, o carbamato pode ser formado por diferentes vias dependendo da natureza do alimento a ser considerado e dos precursores disponíveis na matéria-prima ou que venham a ser disponibilizados (ZIMMERLI & SCHALATTER, 1991).

A uréia já foi adicionada como ativadora da fermentação de vinhos e bebidas afins, por ser comprovadamente um precursor do carbamato de etila, porém, ela não é mais utilizada. (VARNAN & SUTHERLAND, 1997).

Os teores de carbamato de etila em vinhos e os de uréia empregados na adubação de parreiras podem ser correlacionados. Entretanto, foram encontrados níveis de carbamato de etila em bebidas onde não foram utilizadas uréia nem pirocarbonato de dietila.

A uréia é uma fonte de nitrogênio para as leveduras, no passado era freqüentemente adicionada à dorna de fermentação, porém atualmente sabe-se que não é aconselhável, pois este composto pode reagir com etanol produzindo

carbamato de etila, o qual é considerado carcinogênico. Mesmo quando não adicionada, a uréia pode ser produzida durante o processo fermentativo, devido ao metabolismo das leveduras. Os aminoácidos são também possíveis precursores de carbamato de etila, como, por exemplo, a arginina, cuja degradação pelas leveduras produz ornitina e uréia. Portanto a presença de aminoácidos também é indesejável no produto final (POLASTRO et al., 2001). Em vinhos, pesquisadores indicam os fatores que mais influenciam na formação do carbamato de etila, os principais são o tempo, a luz, a temperatura e o pH (FIELD & LANG 1988; TEGMO-LARSSON & SPITTLER, 1990).

TEGMO-LARSSON & SPITTLER (1990) pesquisaram o efeito do armazenamento em várias temperaturas e diferentes condições de exposição à luz na formação de carbamato de etila, em uma série de vinhos tintos e brancos de mesa e fortificados. Durante (3, 6 e 12) meses de estocagem, foram utilizadas temperaturas de (22, 32 e 43) °C na ausência de luz, à 22 °C em luz fluorescente, e em condições naturais de luz e temperatura, simulando o ponto de venda deste produtos. Os resultados mostraram que à temperatura de 43 °C, a concentração de carbamato de etila pode exceder níveis aceitáveis, mas a 22 °C, ou seja, em condições apropriadas de estocagem, estas concentrações não são alcançadas. A luz não teve influência significativa na formação do carbamato de etila.

Alguns trabalhos têm sido publicados sobre a redução do carbamato de etila formado durante o processo de produção do vinho, relatando cuidados específicos com fertilizantes, nas cultivares e na fermentação (BUTZKE & BISSON, 2003; MORRIS et al., 2003; ZIETMAN et al., 2003).

Alguns fatores que influenciam na formação do carbamato de etila em bebidas alcoólicas não são controláveis, contudo, outros podem ser manipulados, como, por exemplo, eliminar a prática de se adicionar uréia para estimular a fermentação, o que hoje já não ocorre mais (NAGATO et al., 2003). Pesquisas com vinho e aguardentes de frutas fermentadas indicam que é possível reduzir o nível de carbamato de etila, reduzindo o nível dos agentes precursores, selecionando a força do fermento, controlando a condição de fermentação e ajustando o pH da massa fermentativa com sulfato de cobre (NOUT, 1994; BUTKE & BISSON, 2003).

Modificação genética em leveduras do vinho tem sido estudada com objetivo de eliminar a produção de uréia e, conseqüentemente, a produção do carbamato etila (VARNAN & SUTHERLAND, 1997).

A formação de carbamato de etila em destilados pode ocorrer antes, durante e depois do processo de destilação. A formação antes da destilação deve ocorrer pelas mesmas vias que ocorrem em vinhos, mas sua contribuição para o produto final não é considerável, uma vez que o carbamato de etila tem um ponto de ebulição de 183°C e o processo de destilação remove quase por completo este composto (BOSCOLO, 2002).

Devido aos altos teores de carbamato de etila encontrados em aguardentes de frutas como ameixa, cereja e damasco, da ordem de (500 a 4400) µg/L, muitos experimentos foram conduzidos em bebidas destiladas para se conhecer o mecanismo de formação e a origem dos precursores desta reação, e para reduzir o conteúdo de carbamato de etila em bebidas destiladas. Estudos foram feitos durante o processo de fabricação, comparando a destilação feita em destilador de cobre e de vidro. Foram determinadas as concentrações de carbamato de etila, cobre e etanol. A formação de carbamato de etila somente ocorreu com destilação em presença de cobre, sendo que esta concentração foi dependente do tempo: quanto maior o tempo de armazenamento, maior a formação de carbamato de etila. Numa segunda destilação, várias frações foram coletadas em diferentes concentrações de etanol, e o carbamato de etila formado, somente (1 a 2) % deste total é que destila junto com a fração mais concentrada em álcool. O restante é distribuído entre o resíduo e outras frações. Estes resultados permitiram concluir que o mecanismo de formação do carbamato de etila é dependente do contato do cobre com alguns compostos protéicos presentes no mosto, durante a destilação (RIFFKIN et al., 1989).

A formação do carbamato de etila em uísque obtido de vários cereais foi estudada por AYLOTT et al. (1990) após a destilação e a maturação por um ano em barris de carvalho. Eles analisaram possíveis precursores que favorecem a formação do carbamato de etila, como cianetos, cianatos, cianidrina e complexos cobre-cianeto, verificam que existe a necessidade da presença de traços destes compostos. Exposição à luz artificial fluorescente em laboratório, de amostras de destilados engarrafadas em vidros de cor clara por 72 horas à 43 °C, apresentaram níveis crescentes de carbamato de etila sendo esta formação a

completada após 3 dias. Durante o estudo, níveis de carbamato de etila, aumentaram rapidamente nas 3 primeiras semanas de maturação e esses variaram de (45 a 65) µg/L, enquanto a análise de compostos contendo cianeto decresceram e nenhuma amostra foi detectada a presença de ácido cianídrico (limite de detecção 5 µg/L), e complexo cobre-cianeto no uísque maturado ou produto final acabado. Concluindo que a concentração final do carbamato de etila no produto destilado é dependente apenas da concentração inicial, medida após a destilação, mais a que é formada na presença destes precursores.

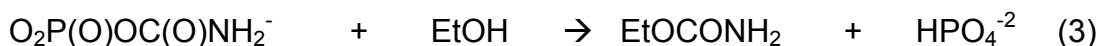
Existem relatos também da influência de maltagem da cevada na formação do carbamato de etila. Diversos compostos presentes naturalmente no malte foram analisados, pois estes podem ser transferidos para o mosto e durante a fermentação originar cianeto e este passar para o destilado. Descreveram também o isolamento e a identificação de um glicosídeo cianogênico, que é considerado o maior responsável pelo teor de carbamato de etila que ocorre no destilado. Fatores que influenciam a formação deste precursor são descritos e variedades diferentes de cevada foram escolhidas no sentido de se reduzir ainda mais os níveis de carbamato de etila no uísque (NAGATO, 1995).

Os fatores que influenciaram a formação do carbamato de etila em destilados são pH, luz, teor de etanol, temperatura e concentração de íons Cu (II) na bebida. Muitos fatores ainda merecem atenção na elucidação dos mecanismos que resultam na formação de carbamato de etila a partir de precursores nitrogenados em destilados. BOSCOLO (2002) estudou a interferência do O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> dissolvidos na bebida na formação do carbamato de etila e investigou o papel do íon Cu (II) como catalisador para a conversão do cianeto a carbamato de etila, independentemente do precursor nitrogenado. Observaram correlação positiva para íon cianeto e a presença do carbamato de etila em cachaças. Também foi comprovado que a formação de carbamato de etila aumenta com a temperatura.

A azodicarbamida, um aditivo usado na produção de pão e cerveja, também é um agente formador de carbamato de etila (eq. 2). Felizmente, a quantidade de carbamato de etila nestes produtos raramente atinge concentrações superiores a 10 µg/L (DENNIS et al., 1997).



Fosfato de carbamila produzido pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode reagir com etanol e produzir carbamato de etila no mosto (eq.3). O fosfato de carbamila em sistemas biológicos é gerado a partir da síntese de arginina, catalisada pela carbamil sintase envolvendo ATP, CO<sub>2</sub> E NH<sub>3</sub> (BOSCOLO, 2002).



Em molho de soja, MATSUDO et al. (1993) concluíram que o acúmulo de citrulina no molho cru é o responsável pela ocorrência de carbamato de etila. O estudo foi feito analisando uréia, etanol, ácido lático e os aminoácidos citrulina, ornitina e arginina no molho antes da pasteurização. A concentração de carbamato de etila teve um aumento diretamente proporcional ao tempo de aquecimento a 80 °C, durante a pasteurização.

### 2.6.3. 1- butanol e 2- butanol

A formação de 1-butanol (figura 10) nas bebidas alcoólicas está diretamente relacionada com a linhagem da levedura, os nutrientes presentes no meio, a temperatura, o pH e a presença de compostos nitrogenados e certos aminoácidos. O 1-butanol (figura 10) ou álcool n-butílico não é permitido na cachaça em quantidade superior a 3 mg/100 ml de álcool anidro. O 2-butanol (figura 11) ou álcool sec-butílico não é permitido em quantidade superior a 10 mg/100 ml de álcool anidro. Estes são considerados como contaminantes orgânicos nos padrões de qualidade estabelecidos pela Instrução Normativa n°13, de 30 de junho de 2005. (BRASIL, 2005).

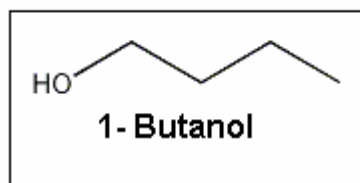


Figura 10 – 1- butanol

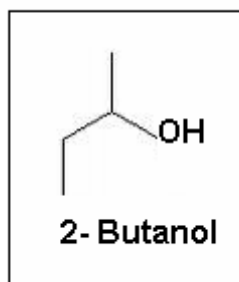


Figura 11 – 2- butanol

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Cinética de fermentação e composição dos mostos de cachaça, cerveja e vinho**

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fermentações e Produção de Bebidas do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

##### **3.1.1. Mosto de cachaça**

Para o preparo do inóculo foram utilizadas duas linhagens de levedura, obtidas na forma liofilizada da empresa Agromalte Ltda. A primeira linhagem utilizada foi a Saflager W-34/70 (baixa fermentação). Esta foi pesada em balança eletrônica (2,4 gramas), de acordo com a recomendação do fabricante e foi posteriormente suspensa em 100 mL de mosto a 28 °C. A suspensão resultante foi dividida em duas partes de 50 mL e cada parte foi utilizada como inóculo em diferentes balões de vidro com 3000 mL de volume de mosto. Foi feito o mesmo procedimento de preparação do inóculo com a levedura Safbrew S-33 (alta fermentação), que foi pesada de acordo com a recomendação do fabricante (1,5 gramas) e posteriormente suspensa em 100 mL de mosto a 28 °C; esta suspensão foi dividida em duas partes e foi utilizada como inóculo em diferentes balões de vidro com 3000 mL de volume de mosto.

No preparo do mosto foi utilizado caldo de cana-de-açúcar, recém cortada, submetida à moagem, filtrado e diluído com água destilada até um teor de sólidos solúveis de 14 °Brix. Foi adicionado o fosfato dibásico de potássio, na concentração de 0,1 g/L e o sulfato de magnésio heptahidratado, na concentração de 0,2 g/L como fontes de potássio e magnésio, respectivamente, sendo estas fontes usadas para enriquecimento mineral do meio.

Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial (2x3x3) em um delineamento experimental inteiramente casualizado. Foram utilizadas duas linhagens de levedura, Saflager W-34/70 (baixa fermentação) e Safbrew S-33 (alta fermentação). Foram utilizadas três fontes de nitrogênio, sulfato de amônio,

peptona de caseína e um *pool* de aminoácidos, em três diferentes concentrações, 0 (sem adição), 5 g/L e 25 g/L.

No primeiro tratamento foi mantido apenas o caldo de cana-de-açúcar sem adição de nitrogênio. No segundo tratamento foi adicionado 5 g/L de sulfato de amônio de alto grau de pureza da Merck, no caldo de cana-de-açúcar. No terceiro tratamento foi adicionado 25 g/L de sulfato de amônio de alto grau de pureza da Merck, no caldo de cana-de-açúcar. Foi repetido este procedimento para as outras fontes de nitrogênio, a peptona de caseína e um *pool* de aminoácidos, nas mesmas concentrações utilizadas do sulfato de amônio.

O *pool* de aminoácidos foi composto pelos seguintes aminoácidos: arginina, treonina, serina, aspartato e isoleucina, estes podem ser considerados uma das melhores fontes de nitrogênio para as leveduras (DUTRA et al., 1999).

As fermentações foram conduzidas à temperatura ajustada de 28 °C em balões de vidro com um volume de 3000 mL de mosto. Coletou-se 100 mL das amostras dos mostos fermentados de cachaça em um béquer, antes do início da fermentação, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas após a inoculação da levedura. Foram realizadas as seguintes análises: teor de sólidos solúveis (°Brix), pH, teor alcoólico e acidez total.

Após a obtenção do caldo de cana-de-açúcar fermentado (vinho), foi realizado o processo de destilação em um alambique de cobre. Os produtos da destilação foram divididos em frações: 10% destilado de cabeça, 80% destilado de coração e 10% destilado de cauda.

### **3.1.2. Mosto de cerveja**

Para o preparo do inóculo foram utilizadas duas linhagens de levedura, obtidas na forma liofilizada da empresa Agromalte Ltda. A primeira linhagem utilizada foi a Saflager W-34/70 (baixa fermentação). Esta foi pesada em balança eletrônica (2,4 gramas), de acordo com a recomendação do fabricante e foi posteriormente suspensa em 100 mL de mosto a 28 °C. A suspensão resultante foi dividida em duas partes de 50 mL e cada parte foi utilizada como inóculo em diferentes balões de vidro com 3000 mL de volume de mosto. Foi feito o mesmo procedimento de preparação do inóculo com a levedura Safbrew S-33 (alta

fermentação), que foi pesada de acordo com a recomendação do fabricante (1,5 gramas e posteriormente suspensa em 100 mL de mosto a 28 °C, esta suspensão foi dividida em duas partes e foi utilizada como inóculo em diferentes balões de vidro com 3000 mL de volume de mosto.

No preparo do mosto foi utilizado um extrato de malte concentrado tipo Bavária Pilsen da empresa Agromalte Ltda. Este extrato foi diluído com água destilada até um teor de sólidos solúveis de 14 °Brix e filtrado. No mosto foi adicionado o fosfato dibásico de potássio, na concentração de 0,1 g/L e o sulfato de magnésio heptahidratado, na concentração de 0,2 g/L como fontes de potássio e magnésio, respectivamente, sendo estas fontes usadas para enriquecimento mineral do meio.

Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial (2x2x3) em um delineamento experimental inteiramente casualizado. Foram utilizadas duas linhagens de levedura, Saflager W-34/70 (baixa fermentação) e Safbrew S-33 (alta fermentação). Foram utilizadas duas fontes de nitrogênio, sulfato de amônio e um *pool* de aminoácidos, em três diferentes concentrações, 0 (sem adição), 5 g/L e 25 g/L. No primeiro tratamento foi mantido apenas o mosto de cerveja sem adição de nitrogênio. No segundo tratamento foi adicionado 5 g/L de sulfato de amônio de alto grau de pureza da Merck, no mosto de cerveja. No terceiro tratamento foi adicionado 25 g/L de sulfato de amônio de alto grau de pureza da Merck, no mosto de cerveja. Foi repetido este procedimento para o *pool* de aminoácidos, nas mesmas concentrações utilizadas do sulfato de amônio. O *pool* de aminoácidos foi composto pelos seguintes aminoácidos: arginina, treonina, serina, aspartato e isoleucina, estes podem ser considerados uma das melhores fontes de nitrogênio para as leveduras (DUTRA et al.,1999).

As fermentações foram conduzidas à temperatura ajustada de 28 °C em balões de vidro com um volume de 3000 mL de mosto. Coletou-se 100 mL das amostras dos mostos fermentados de cerveja em um béquer, antes do início da fermentação, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas após a inoculação da levedura. Foram realizadas as seguintes análises: teor de sólidos solúveis (°Brix), pH, teor alcoólico e acidez total.

Após a obtenção de mosto de cerveja fermentado foi realizado o processo de destilação rápida, em um aparelho denominado Gibertini, este procedimento foi usado para o preparo analítico das amostras para as análises cromatográficas.

### **3.1.3. Mosto de vinho**

Para o preparo do inóculo foram utilizadas duas linhagens de levedura, obtidas na forma liofilizada da empresa Agromalte Ltda. A primeira linhagem utilizada foi a Saflager W-34/70 (baixa fermentação). Esta foi pesada em balança eletrônica (2,4 gramas), de acordo com a recomendação do fabricante e foi posteriormente suspensa em 100 mL de mosto a 28 °C. A suspensão resultante foi dividida em duas partes de 50 mL e cada parte foi utilizada como inóculo em diferentes balões de vidro com 3000 mL de volume de mosto. Foi feito o mesmo procedimento de preparação do inóculo com a levedura Safbrew S-33 (alta fermentação), que foi pesada de acordo com a recomendação do fabricante (1,5 gramas) e posteriormente suspensa em 100 mL de mosto a 28 °C, esta suspensão foi dividida em duas partes e foi utilizada como inóculo em diferentes balões de vidro com 3000 mL de volume de mosto.

No preparo do mosto foi utilizado um suco de uva concentrado. Este suco foi diluído com água destilada até um teor de sólidos solúveis de 14 °Brix e filtrado. No mosto foi adicionado o fosfato dibásico de potássio, na concentração de 0,1 g/L e o sulfato de magnésio heptahidratado, na concentração de 0,2 g/L como fontes de potássio e magnésio, respectivamente, sendo estas fontes usadas para enriquecimento mineral do meio.

Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial (2x3) em um delineamento experimental inteiramente casualizado. Foram utilizadas duas linhagens utilizando-se duas linhagens de levedura, Saflager W-34/70 (baixa fermentação) e Safbrew S-33 (alta fermentação), em três diferentes concentrações 0 (sem adição), 5 g/L e 25 g/L da fonte de nitrogênio utilizada, o sulfato de amônio de alto grau de pureza da Merck.

As fermentações foram conduzidas à temperatura ajustada de 28 °C em balões de vidro com um volume de 3000 mL de mosto. Coletou-se 100 mL das amostras dos mostos fermentados de uva em um béquer, antes do início da fermentação, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas após a

inoculação da levedura. Foram realizadas as seguintes análises: teor de sólidos solúveis (°Brix), pH, teor alcoólico e acidez total.

Após a obtenção do mosto de uva fermentado (vinho), foi realizado o processo de destilação rápida, em um aparelho denominado Gibertini, este procedimento foi usado para o preparo analítico das amostras para as análises cromatográficas.

### **3.2. Metodologias de análise de parâmetros cinéticos de fermentação em mostos de cachaça, cerveja e vinho**

#### **3.2.1. Determinação do teor de sólidos solúveis (°Brix)**

Empregou-se um refratômetro tipo Brix, utilizado na medição da concentração de açúcar em alimentos em geral, principalmente na indústria de bebidas e refrigerantes, com escala de (0 a 32) °Brix.

#### **3.2.2. Determinação do teor alcoólico por picnometria**

O picnômetro foi previamente lavado com água e depois com álcool; posteriormente colocado em uma estufa e pesado. Depois de preenchido com água o picnômetro foi pesado a 20 °C. Foi repetido o procedimento de lavagem e secagem em estufa e posteriormente o picnômetro foi preenchido com a amostra até o seu transbordamento e pesado a 20 °C.

Foi realizado o seguinte cálculo de densidade a 20 °C.  $D_{20} = \frac{P_{am} - P_p}{P_{H_2O} - P_p}$ , em que  $P_p$  = peso do picnômetro vazio,  $P_{am}$  = peso do picnômetro com amostra e  $P_{H_2O}$  = peso do picnômetro com água.

Os valores encontrados foram comparados com uma tabela (densidade x grau alcoólico) e foram determinados os teores alcoólicos em °GL das amostras (A.O.A.C., 1995).

### **3.2.3. Medida da acidez total**

Transferiu-se 100 mL da amostra para um frasco erlenmeyer de 500 mL, em que foram adicionados 0,5 mL de indicador fenolftaleína e posteriormente foi titulado com solução de hidróxido de sódio 0,1 N padronizada, até coloração rósea. O cálculo:  $n \times M \times f \times E_q / 10 \times V =$  ácidos totais, em gramas de ácido acético por 100 mL de amostra.

n= volume gasto na titulação da solução de hidróxido de sódio, em mL.

N= normalidade da solução de hidróxido de sódio.

f= fator de correção da solução de hidróxido de sódio.

Eq= equivalente em gramas do ácido acético (60).

V= volume tomado da amostra em mL. (BRASIL, 1986).

### **3.3. Metodologias de análise cromatográfica nas amostras de cachaça, cerveja e vinho**

Esta parte do experimento foi realizada no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos e no Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa.

Foram realizadas análises das amostras de cachaça, cerveja e vinho em cromatografia gasosa. Foram analisados os principais voláteis, entre eles: ácido acético, acetato de etila, acetaldeído, álcoois superiores (1-propanol, álcool isobutílico e álcool isoamílico) e os principais contaminantes orgânicos: carbamato de etila, metanol, 1-butanol e 2-butanol.

#### **3.3.1. Métodos cromatográficos de análise dos contaminantes orgânicos metanol, 1-butanol e 2-butanol**

Este método foi utilizado para determinar as concentrações dos compostos metanol, 1-butanol e 2-butanol em bebidas alcoólicas por cromatografia em fase gasosa. Foram utilizados os seguintes equipamentos: balança analítica, cromatógrafo a gás GC-17 A modelo Shimadzu QP5050, com detector de ionização de chama (FID), coluna capilar de sílica fundida PAG de caráter muito polar, com as seguintes dimensões: (30 m de comprimento x 0.25 mm de espessura do filme x 0.25 µm de diâmetro interno). O hélio foi utilizado como gás

de arraste, o ar sintético foi utilizado como gás de ignição e manutenção da chama e o gás hidrogênio foi responsável pela chama do detector, todos com alto grau de pureza (99,999 %). Microseringa de 10 µL, graduada em 0,1 µL, pipetas graduadas de 1 mL e 10 mL, balões volumétricos de 10 mL e 100 mL, proveta de 100 mL e funil. Padrão externo de metanol, 1-butanol e 2-butanol, todos com grau cromatográfico da empresa Merck.

A programação da temperatura da coluna no forno foi a seguinte: temperatura inicial: 35 °C por 5 minutos; subiu em uma taxa de 10 °C por minuto até 120 °C, permanecendo nesta temperatura por 10 minutos.

Temperatura do injetor: 180 °C

Temperatura do detector: 200 °C

Vazão do gás de arraste (He): 1 mL/min.

Vazão da chama (H<sub>2</sub>): 20 mL/min.

Vazão do ar sintético: 175 mL/min.

Razão de divisão (split): 1:2 (NAGATO et al, 2001).

Injetou-se 1 µL das amostras; o metanol, o 1-butanol e o 2-butanol foram identificados pela comparação dos tempos de retenção dos padrões com o tempo de retenção destes compostos na amostra.

A quantificação do metanol e dos outros contaminantes orgânicos foi realizada pelo método do padrão externo. Sendo assim, foram construídas curvas de referência para cada um dos compostos separadamente, pela injeção de 1 µL de soluções aquosas do padrão puro de metanol, 1-butanol e 2-butanol em diferentes concentrações: (20, 60, 100, 140 e 180) mg/L. A quantificação foi realizada pela interpolação em curva padrão cujo o coeficiente de correlação foi de 0,9944 para o metanol, 0,9998 para o 1-butanol e de 0,9945 para o 2-butanol.

### **3.3.2. Métodos cromatográficos de análise de carbamato de etila**

O carbamato de etila foi identificado e quantificado por duas metodologias. A primeira análise foi realizada por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama, com uso do detector na máxima sensibilidade. Posteriormente as mesmas amostras foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa, com o modo seletivo de íons, em que foram monitorados os íons 62 m/z, 74 m/z e 89 m/z, para uma confirmação da análise anterior.

### 3.3.2.1. Análise em detecção por ionização em chama

Este método foi desenvolvido e usado para a determinação de carbamato de etila em bebidas alcoólicas. A identificação foi feita pela comparação dos tempos de retenção dos picos da amostra e do padrão, injetados nas mesmas condições.

As amostras de cachaça, cerveja e vinho foram analisadas por um cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (GC-FID). A coluna utilizada foi a capilar de sílica fundida PAG, de caráter muito polar, com as seguintes dimensões: (30 m de comprimento x 0.25 mm de espessura de filme x 0.25  $\mu$ m de diâmetro interno). Foram usados os seguintes gases: o hélio como gás de arraste, o ar sintético e o gás hidrogênio, todos com alto grau de pureza (99, 999%). Microseringa de 10  $\mu$ L, graduada em 0,1  $\mu$ L, pipetas graduadas de 1 mL e 10 mL, balões volumétricos de 10 mL e 100 mL, proveta de 100 mL e funil. Padrão externo de carbamato de etila da empresa Sigma, com grau cromatográfico. Injetou-se 1  $\mu$ L da solução padrão de carbamato de etila, em várias concentrações: (10, 25, 50, 100, 300, 500, 800, 2000)  $\mu$ g/L, em uma solução de etanol/água (40:60 v/v), em que foi construída uma curva de referência, com o gráfico da concentração do padrão *versus* a área dos picos de carbamato de etila. A quantificação foi realizada pela interpolação em curva padrão cujo coeficiente de correlação foi de 0,9925.

As condições cromatográficas foram as seguintes: A temperatura inicial da coluna foi de 45 °C por 5 minutos; subiu a uma taxa de 10 °C por minuto até 140 °C, permanecendo nesta temperatura por 10 min.

Temperatura do injetor: 200 °C

Temperatura do detector: 200 °C

Vazão do gás de arraste (He): 1 mL/min.

Vazão da chama (H<sub>2</sub>): 20 mL/min.

Vazão do ar sintético: 175 mL/min.

Razão de divisão: split 2

### **3.3.2.2. Análise por detecção em espectrometria de massa**

As amostras também foram analisadas em um cromatógrafo a gás, modelo Shimadzu GC-17 A acoplado com espectrometria de massa. Nesta metodologia foi utilizado o sistema de monitoramento seletivo de íons para a confirmação da presença do carbamato de etila nas amostras de cachaça, cerveja e vinho, sendo monitorados os íons 62 m/z, 74 m/z e 89 m/z. O injetor utilizado foi o automático tipo (split/splitless), a coluna utilizada foi a Supelcowax (30 m de comprimento x 0.25 mm de diâmetro interno x 0.25 µm de espessura de filme). A programação do forno foi a seguinte: temperatura inicial 40 °C e permaneceu nesta temperatura por 2 minutos. Subiu a uma taxa de 10 °C por minuto até 160 °C, permanecendo por 20 minutos nesta temperatura. Subiu a uma taxa de 20 °C por minuto até 220 °C. A temperatura do injetor foi de 200 °C e a da interface GC/MS foi de 220 °C. Foi injetado um volume de 1µL e o fluxo do hélio (gás de arraste) foi de 1,2 mL/minuto. A partir de uma solução estoque de carbamato de etila 1 mg/L em uma solução de etanol/água (40:60 v/v), foram preparadas soluções padrão (0 – 0,4762 ng/µL) para a construção da curva de referência. A quantificação foi realizada pela interpolação em curva padrão cujo coeficiente de correlação foi de 0,9959.

### **3.3.3. Método cromatográfico de análise dos álcoois superiores**

Os álcoois superiores analisados foram: álcool isobutílico (2-metil-1-propanol), álcoois isoamílicos (2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol) e 1-propanol, foram utilizados padrões com grau cromatográfico da empresa Merck. As identificações foram feitas pela comparação dos tempos de retenção dos picos da amostra com os dos padrões e injetadas na mesma condição no cromatógrafo a gás.

As amostras das bebidas cachaça, cerveja e vinho foram analisados por um cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (GC-FID), coluna capilar de sílica fundida PAG, de caráter muito polar, com as seguintes dimensões: (30 m de comprimento x 0.25 mm de espessura de filme x 0.25 µm de

diâmetro interno). Foi usado o hélio como gás de arraste e também o ar sintético e o gás hidrogênio, todos com alto grau de pureza (99,999 %).

Foram preparadas as soluções padrão para cada um dos álcoois superiores nas concentrações: (60, 150, 300, 450, 600, 1200) mg/L, em solução de etanol/água (40:60 v/v). A quantificação foi realizada pela interpolação em curva padrão cujo coeficiente de correlação foi de 0,9997 para o 1-propanol, de 0,9900 para o álcool isobutílico e de 0,9984 para o álcool isoamílico.

As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura inicial de 35 °C por 5 minutos, subiu a uma taxa de 10 °C por minuto até 100 °C, permanecendo nesta temperatura por 10 minutos.

Temperatura do injetor: 180 °C

Temperatura do detector: 200 °C

Vazão do gás de arraste (He): 1 mL/min.

Vazão da chama (H<sub>2</sub>): 20 mL/min.

Vazão do ar sintético: 175 mL/min.

Razão de divisão: split 10

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Influência da linhagem de levedura e da adição de nitrogênio na cinética de fermentação para a produção de cachaça

A avaliação dos efeitos da suplementação de nitrogênio realizado no presente trabalho foi realizada em amostras coletadas nos períodos 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas de fermentação.

Os valores de acidez estão representados nas Tabelas 1, 2 e 3. Estes valores estão expressos em gramas de ácido acético por 100 mL de amostra. A acidez do mosto aumentou com o tempo de fermentação. Usualmente uma grande concentração de ácido acético é consequência de má condição do mosto fermentado devido à contaminação por bactérias acéticas que utilizam o etanol em seu metabolismo produzindo o ácido.

**Tabela 1- Variação da acidez com a adição de sulfato amônio em três diferentes concentrações nas amostras de cachaça.**

Tempo de fermentação (horas)	Baixa fermentação (Saflager)			Alta fermentação (Safbrew)		
	0 g/L	5 g/L	25 g/L	0 g/L	5 g/L	25 g/L
12	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,07
24	0,11	0,07	0,07	0,16	0,16	0,18
48	0,22	0,26	0,26	0,26	0,26	0,27
72	0,36	0,37	0,30	0,25	0,27	0,32
96	0,37	0,38	0,31	0,25	0,28	0,33

**Tabela 2- Variação da acidez com a adição de peptona de caseína em três diferentes concentrações nas amostras de cachaça.**

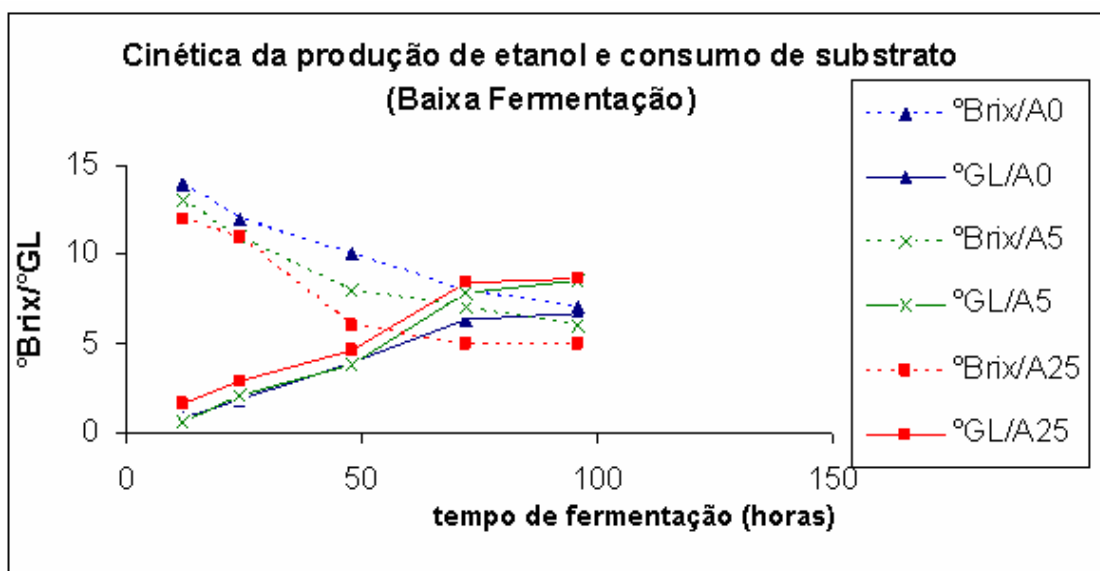
Tempo de fermentação (horas)	Baixa fermentação (Saflager)			Alta fermentação (Safbrew)		
	0 g/L	5 g/L	25 g/L	0 g/L	5 g/L	25 g/L
12	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	0,06
24	0,19	0,28	0,41	0,09	0,11	0,19
48	0,22	0,34	0,42	0,22	0,32	0,29
72	0,29	0,42	0,49	0,41	0,51	0,36
96	0,30	0,43	0,50	0,44	0,53	0,37

**Tabela 3- Variação da acidez com a adição de um pool de aminoácidos em três diferentes concentrações nas amostras de cachaça.**

Tempo de fermentação (horas)	Baixa fermentação (Saflager)			Alta fermentação (Safbrew)		
	0g/L	5g/L	25g/L	0g/L	5g/L	25g/L
12	0,03	0,03	0,02	0,04	0,04	0,05
24	0,16	0,22	0,21	0,07	0,06	0,07
48	0,19	0,29	0,26	0,15	0,21	0,16
72	0,29	0,32	0,32	0,22	0,25	0,18
96	0,30	0,37	0,34	0,23	0,26	0,19

Os valores do teor de sólidos solúveis (°Brix) e do teor alcoólico (°GL) estão representados graficamente nas Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

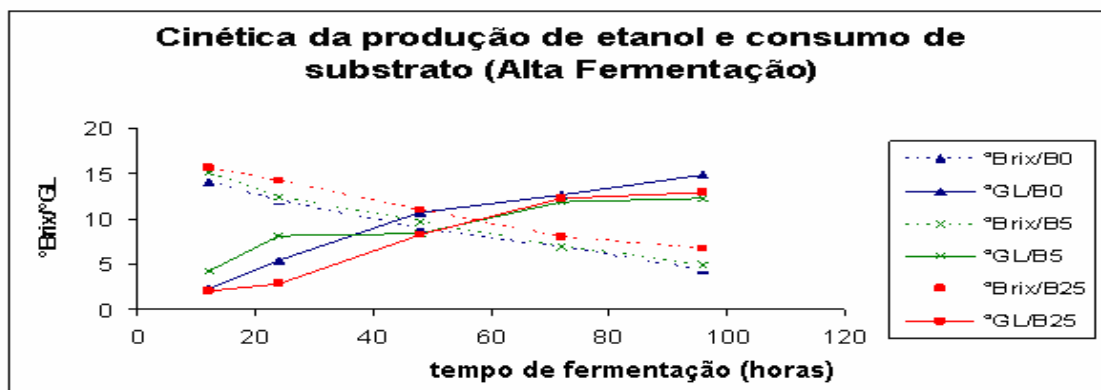
Estão representados na Figura 1 os valores dos sólidos solúveis (°Brix) e do teor alcoólico produzido por uma linhagem de levedura de baixa fermentação adicionada de uma fonte nitrogenada (sulfato de amônio) em três concentrações 0 (sem adição), 5 g/l e 25 g/L. O maior rendimento, ou seja, maior produção de etanol por consumo de substrato foi na concentração de 5 g/L.



**Figura 1- Evolução da fermentação alcoólica com levedura Saflager e adição de sulfato de amônio.**

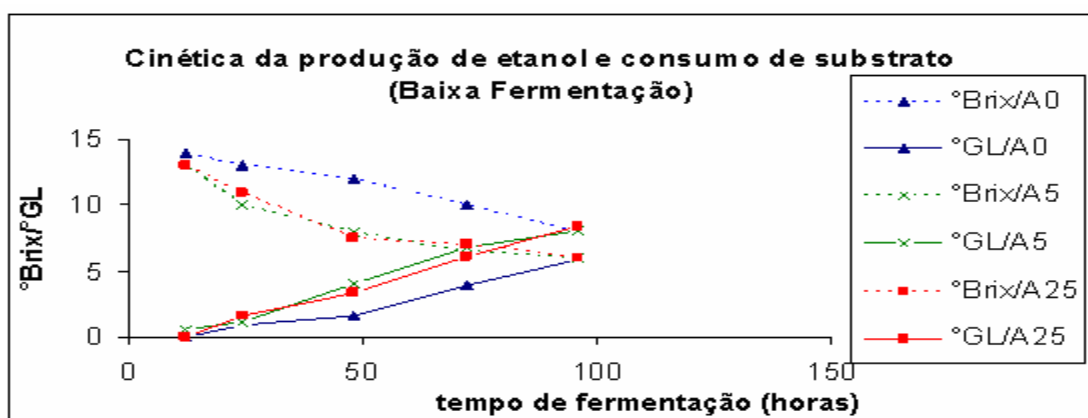
Na Figura 2 estão representados os valores dos sólidos solúveis (°Brix) e do etanol produzido por uma linhagem de levedura de alta fermentação, adicionada de uma fonte nitrogenada (sulfato de amônio) em três concentrações 0

(sem adição), 5 g/L e 25 g/L. Nesta situação a adição nitrogenada abaixou o rendimento da fermentação alcoólica, ou seja, nas concentrações 5 g/L e 25 g/L de sulfato amônio o rendimento da fermentação alcoólica foi menor.



**Figura 2- Evolução da fermentação alcoólica com levedura Safbrew e adição de sulfato de amônio.**

Na Figura 3 estão representados os valores dos sólidos solúveis (°Brix) e do etanol produzido por uma linhagem de levedura de baixa fermentação, adicionada de uma fonte nitrogenada (peptona de caseína) em três concentrações 0 (sem adição), 5 g/L e 25 g/L. Nesta situação o rendimento aumentou com o aumento da concentração da peptona da caseína. Já com a levedura de alta fermentação (Figura 4) a situação foi contrária, ou seja, a o rendimento da fermentação alcoólica foi menor com o aumento da concentração da peptona de caseína.



**Figura 3- Evolução da fermentação alcoólica com levedura Saflager e adição de peptona de caseína.**

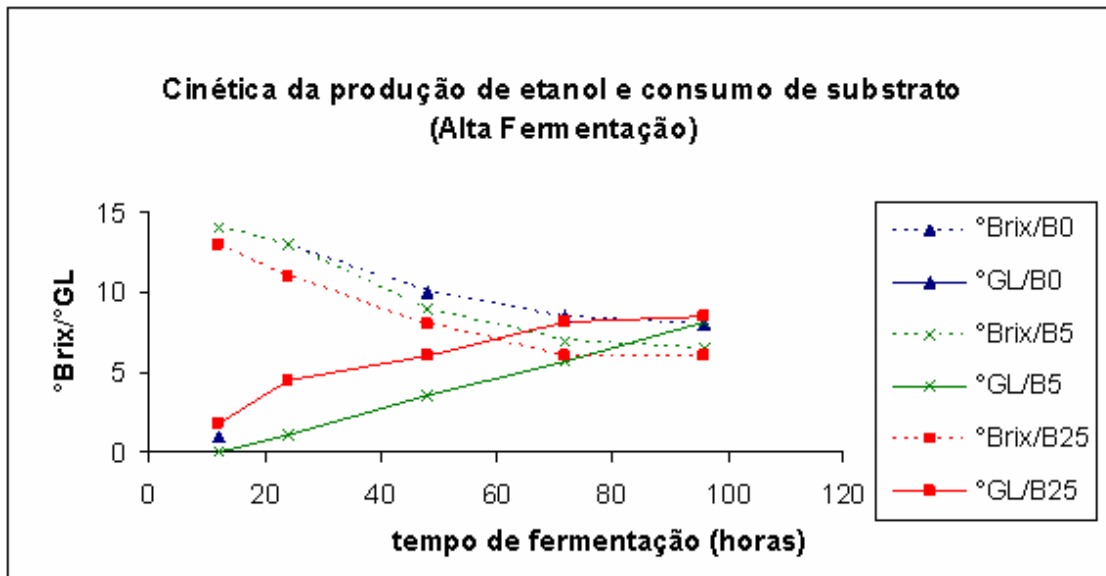


Figura 4- Evolução da fermentação alcoólica com levedura Safbrew e adição de peptona de caseína.

Na Figura 5 estão representados os valores dos sólidos solúveis (°Brix) e do etanol produzido por uma linhagem de levedura de baixa fermentação e na Figura 6 os mesmos valores para uma levedura de alta fermentação, nas duas com adição de uma fonte nitrogenada (*pool* de aminoácidos) em três concentrações 0 (sem adição), 5 g/L e 25 g/L. Nas duas situações o rendimento da fermentação alcoólica foi menor com o aumento da concentração do *pool* de aminoácidos.

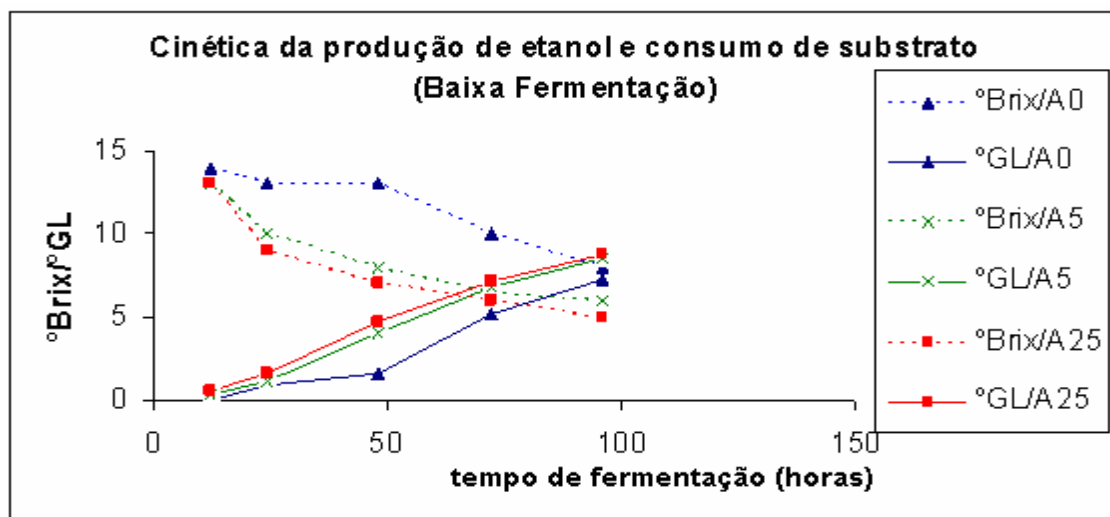
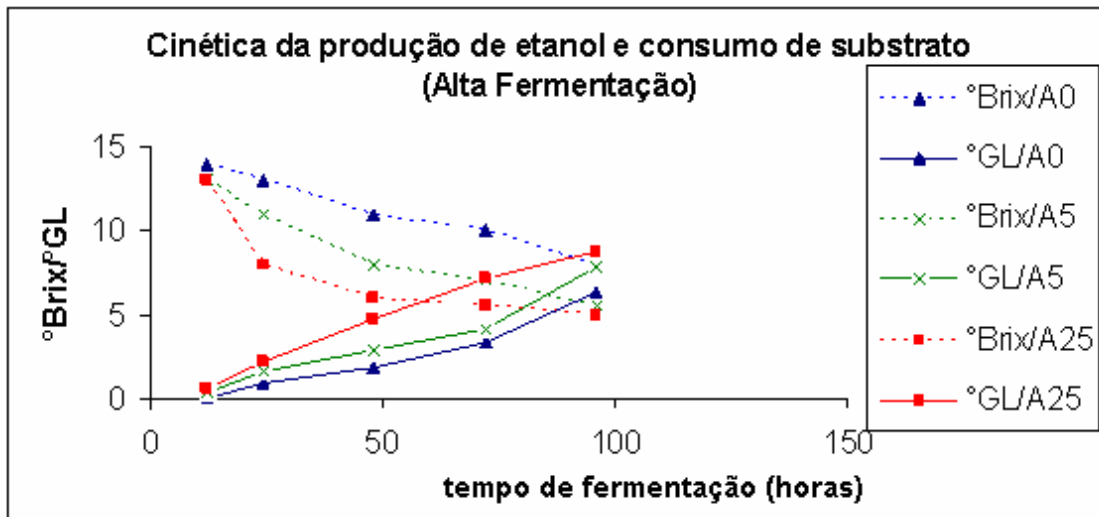
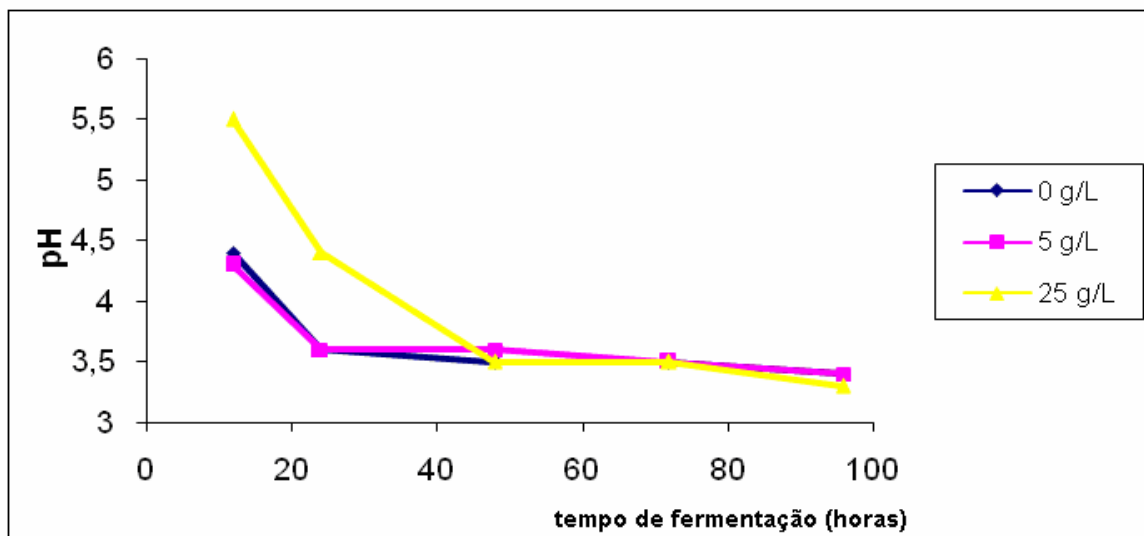


Figura 5- Evolução da fermentação alcoólica com levedura Saflager e adição de um *pool* aminoácidos.

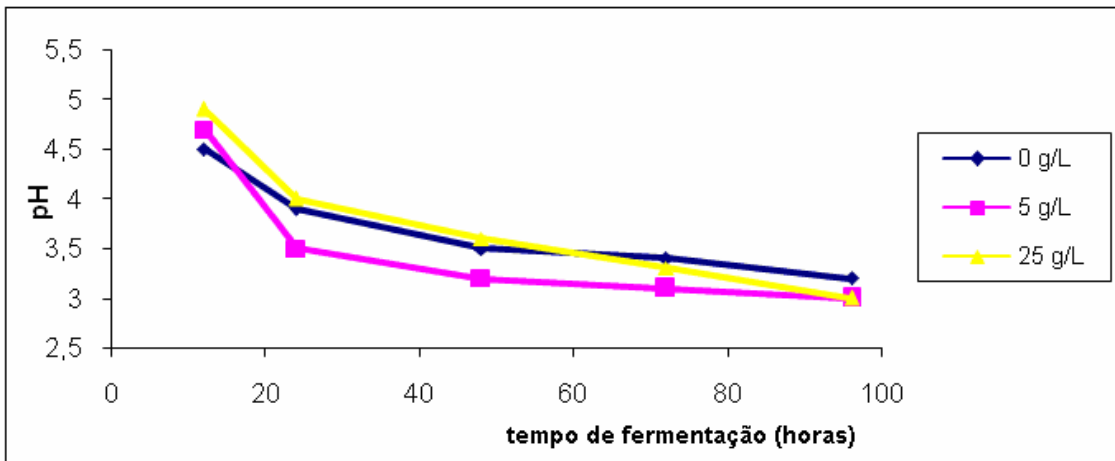


**Figura 6- Evolução da fermentação alcoólica com levedura Safbrew e adição de um *pool* aminoácidos.**

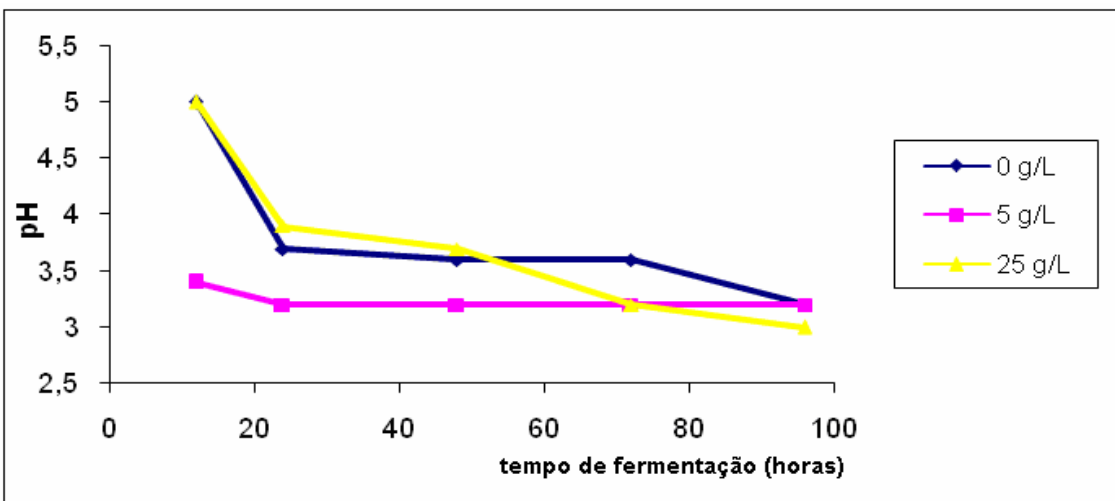
O pH desejável em mostos de cana-de-açúcar situa-se normalmente entre 4,0 e 5,0 durante a fermentação do mosto de cana-de-açúcar. Neste experimento o pH variou de 5,4 (máximo) a 3,0 (mínimo), estes valores estão bem próximos aos desejáveis na fermentação. Durante a fermentação o pH do mosto reduziu com o passar das horas até ficar praticamente constante. Os valores de pH estão representados graficamente nas Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6.



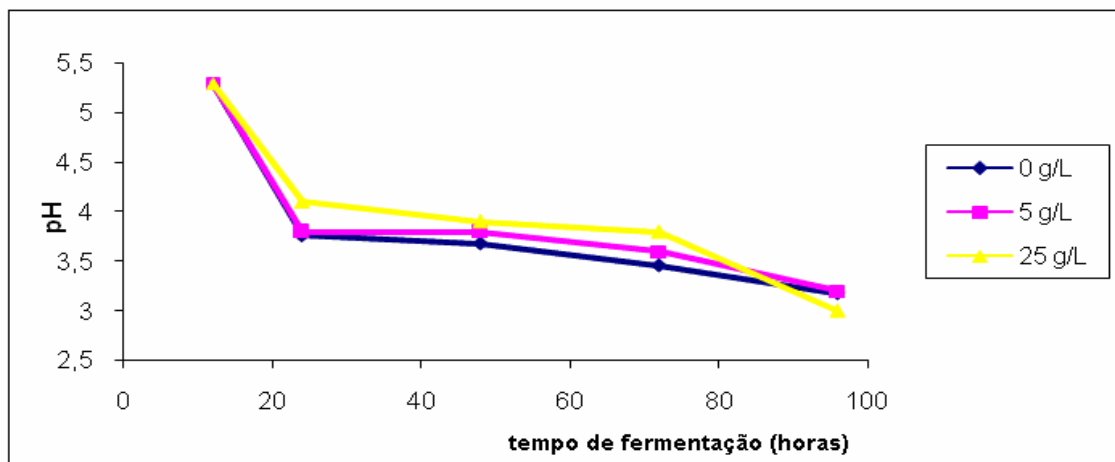
**Figura 1-Variação do pH na baixa fermentação com sulfato de amônio em cachaça.**



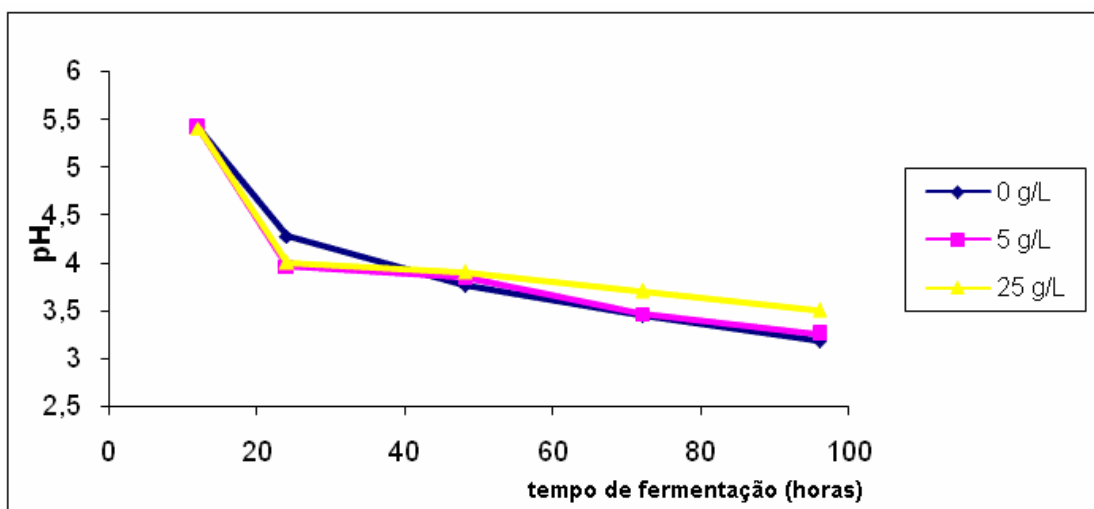
**Figura 2 - Variação do pH na alta fermentação com sulfato de amônio em cachaça.**



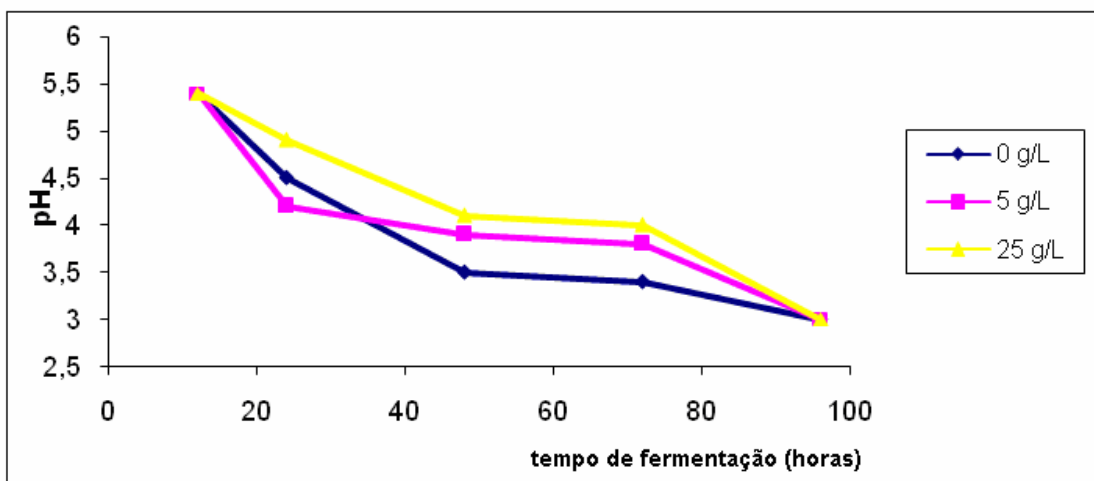
**Figura 3 - Variação do pH na baixa fermentação com peptona de caseína em cachaça.**



**Figura 4 - Variação do pH na alta fermentação com peptona de caseína em cachaça.**



**Figura 5 - Variação do pH na baixa fermentação com pool de aminoácidos em cachaça.**



**Figura 6 - Variação do pH na alta fermentação com pool de aminoácidos em cachaça.**

#### **4.2. Influência da linhagem de levedura e da adição de nitrogênio na cinética de fermentação para a produção de cerveja**

A avaliação dos efeitos da suplementação de nitrogênio realizado no presente trabalho foi realizada em amostras coletadas nos períodos 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas de fermentação.

A acidez do mosto para a produção de cerveja aumentou com tempo de fermentação. Os valores foram expressos em gramas de ácido acético por 100 mL de amostra e estão representados nas Tabelas 1 e 2. Os valores de acidez encontrados neste experimento não foram considerados elevados devido a um rigoroso controle de todo o processo fermentativo. Um valor elevado de acidez em

mostos para a produção de cerveja é consequência de má condição do mosto fermentado devido à contaminação por bactérias acéticas que utilizam o etanol em seu metabolismo produzindo o ácido.

**Tabela 1- Variação da acidez com sulfato amônio em três concentrações nas amostras de cerveja.**

Tempo de fermentação (horas)	Baixa fermentação (Saflager)			Alta fermentação (Safbrew)		
	0 g/L	5 g/L	25 g/L	0 g/L	5 g/L	25 g/L
12	0,12	0,15	0,17	0,21	0,21	0,21
24	0,29	0,35	0,34	0,29	0,33	0,52
48	0,31	0,39	0,37	0,34	0,43	0,56
72	0,33	0,43	0,45	0,35	0,46	0,58
96	0,34	0,44	0,56	0,36	0,46	0,59

**Tabela 2- Variação da acidez com pool de aminoácidos em três concentrações nas amostras de cerveja.**

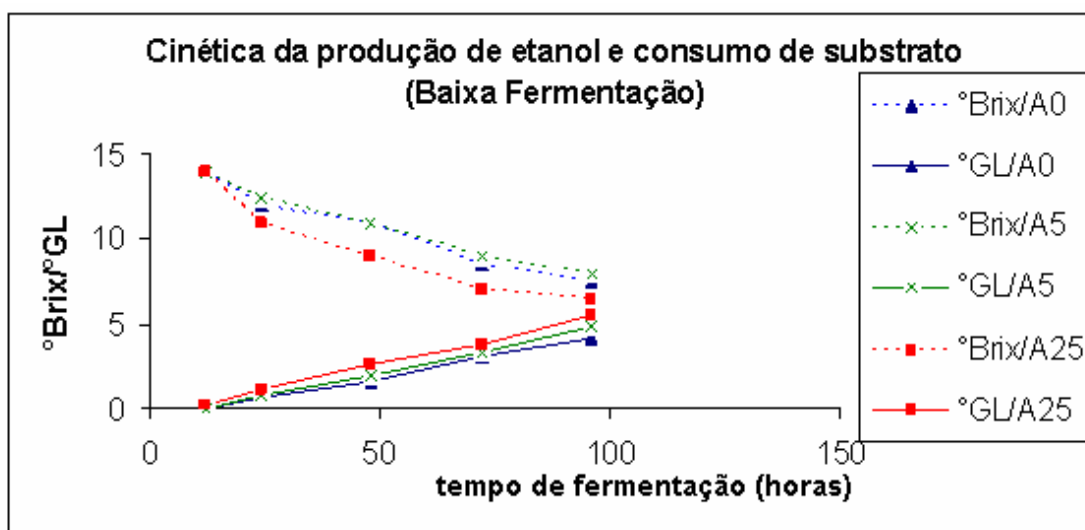
Tempo de fermentação (horas)	Baixa fermentação (Saflager)			Alta fermentação (Safbrew)		
	0 g/L	5 g/L	25 g/L	0 g/L	5 g/L	25 g/L
12	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
24	0,07	0,06	0,07	0,27	0,30	0,36
48	0,07	0,07	0,08	0,31	0,35	0,41
72	0,08	0,07	0,09	0,35	0,36	0,47
96	0,08	0,07	0,12	0,36	0,38	0,48

Os valores do teor de sólidos solúveis (°Brix) e do teor alcoólico (°GL) estão representados graficamente nas Figuras 1, 2, 3 e 4.

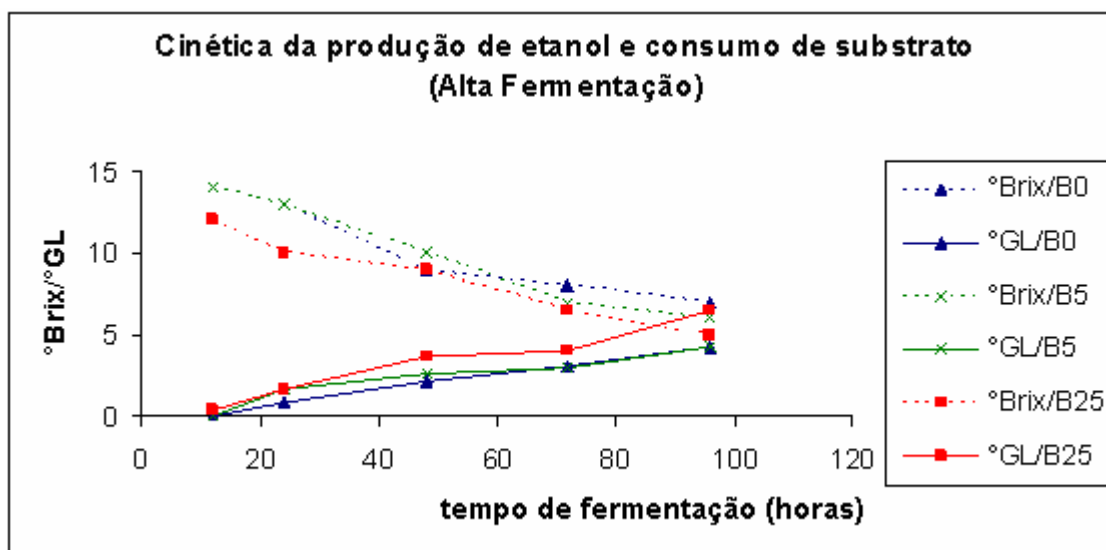
Estão representados na Figura 1 os valores do teor de sólidos solúveis (°Brix) e do teor alcoólico produzido por uma linhagem de levedura de baixa fermentação adicionada de uma fonte nitrogenada (sulfato de amônio) em três concentrações 0 (sem adição), 5 g/L e 25 g/L no mosto de cerveja. O maior rendimento, ou seja, maior produção de etanol por consumo de substrato foi na concentração de 5 g/L nesta situação.

Na Figura 2 estão representados os valores dos sólidos solúveis (°Brix) e teor alcoólico produzido por uma linhagem de levedura de alta fermentação,

adicionada de uma fonte nitrogenada (sulfato de amônio) em três concentrações 0 (sem adição), 5 g/L e 25 g/L. Nesta situação o rendimento maior foi na concentração de 25 g/L de sulfato de amônio.



**Figura 1- Evolução da fermentação alcoólica com levedura Saflager e adição de sulfato de amônio.**



**Figura 2 – Evolução da fermentação alcoólica com levedura Safbrew e adição de sulfato de amônio.**

Estão representados na Figura 3 os valores dos sólidos solúveis (°Brix) e do teor alcoólico produzido por uma linhagem de levedura de baixa fermentação adicionada de uma fonte nitrogenada (*pool* de aminoácidos) em três concentrações 0 (sem adição), 5 g/L e 25 g/L em mosto de cerveja. Nas três concentrações os rendimentos da fermentação alcoólica foram bem próximos.

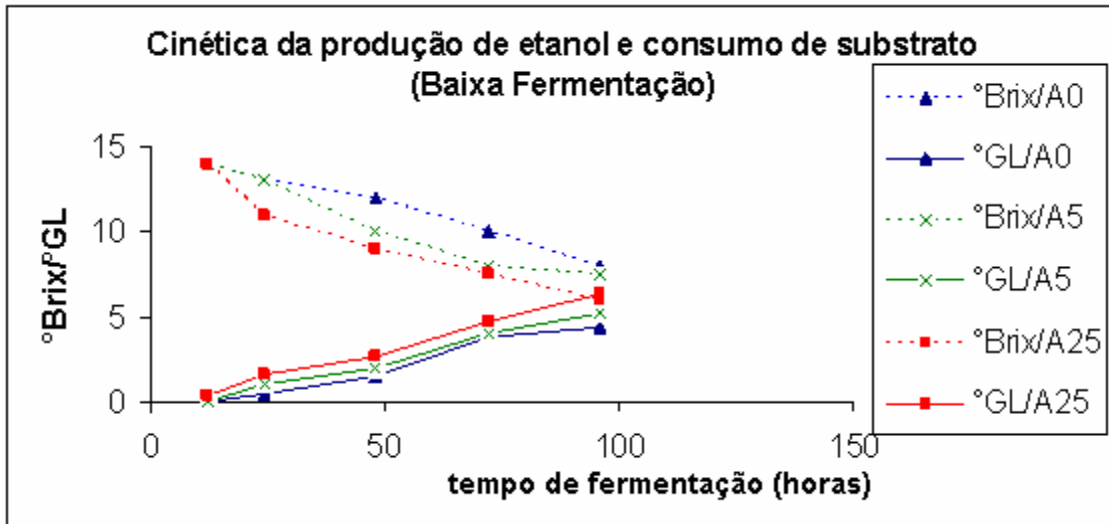


Figura 3 – Evolução da fermentação alcoólica com levedura Saflager e adição de um *pool* aminoácidos.

Na Figura 4 estão representados os valores dos sólidos solúveis (°Brix) e do teor alcoólico produzido por uma linhagem de levedura de alta fermentação, adicionada de uma fonte nitrogenada (*pool* de aminoácidos) em três concentrações 0 (sem adição), 5 g/L e 25 g/L em mosto de cerveja. Nesta situação o aumento da concentração do *pool* de aminoácidos influenciou negativamente o rendimento da fermentação alcoólica.

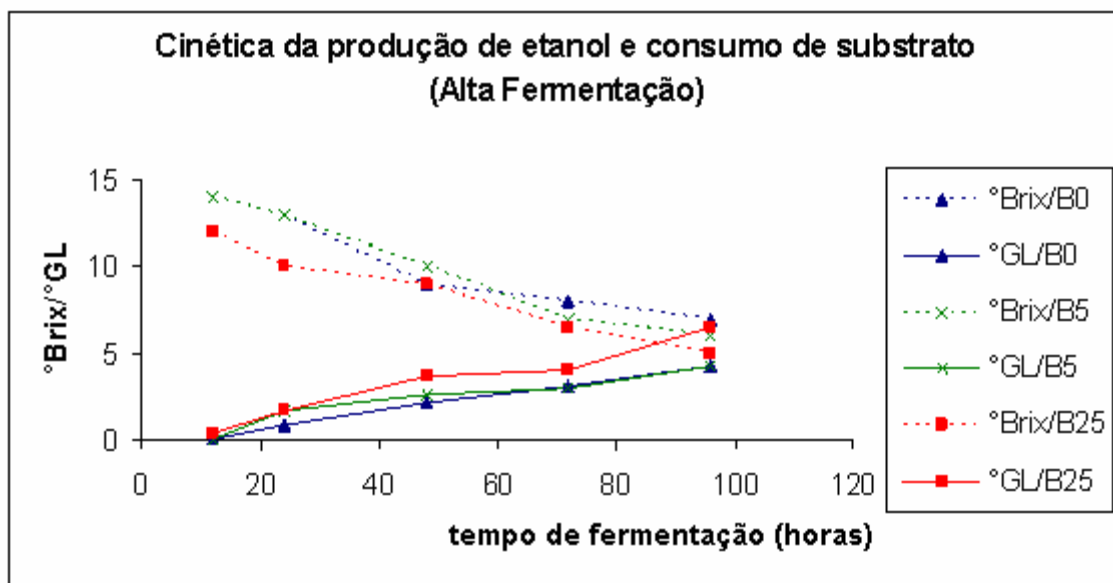


Figura 4 – Evolução da fermentação alcoólica com levedura Safbrew e adição de um *pool* aminoácidos.

O pH desejável em mostos para a fabricação de cerveja situa-se entre 5 e 3. O pH do mosto fermentado variou de 4,8 (máximo) a 3,0 (mínimo). Durante a fermentação o pH reduziu com o tempo de fermentação até permanecer constante. Os valores de pH estão representados nas Figuras 1, 2, 3 e 4.

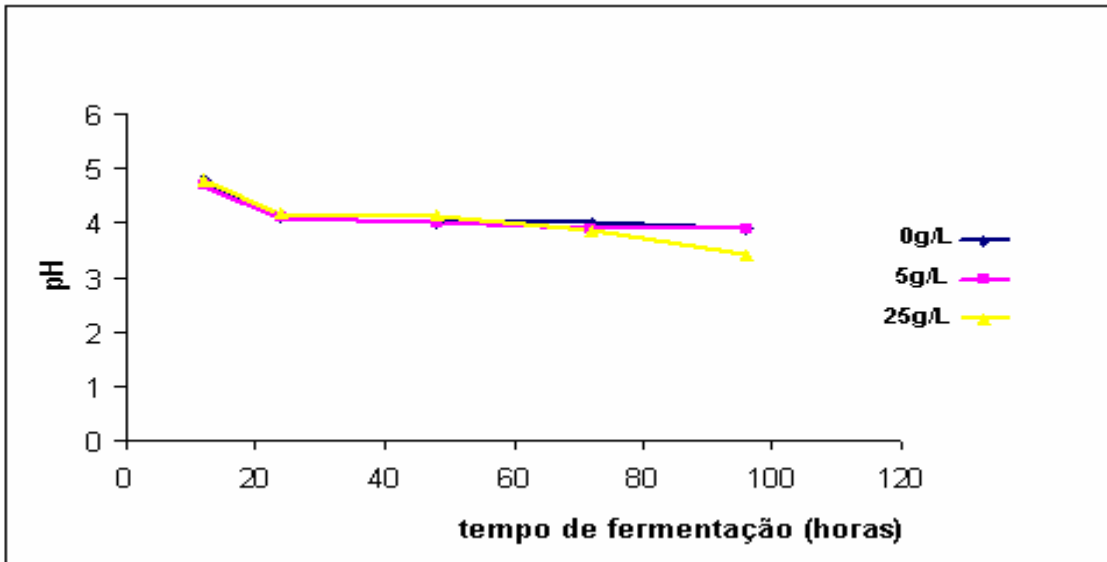


Figura 1 - Variação do pH na baixa fermentação com sulfato de amônio em cerveja.

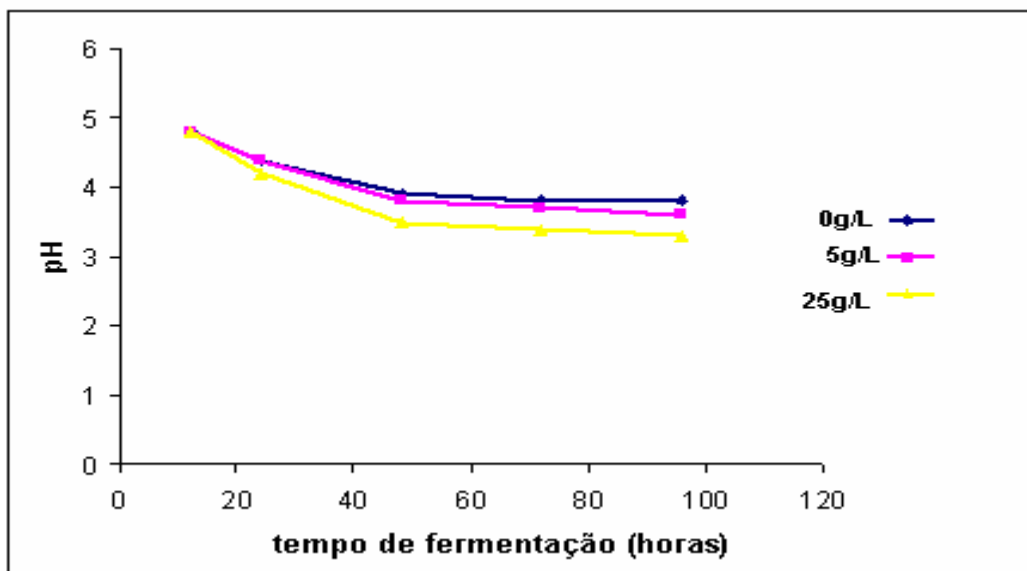
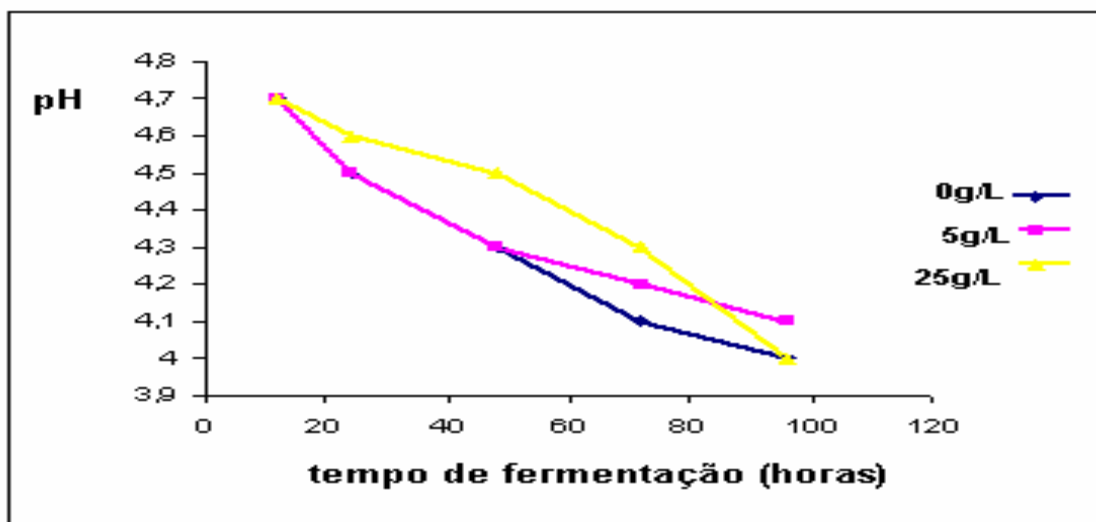
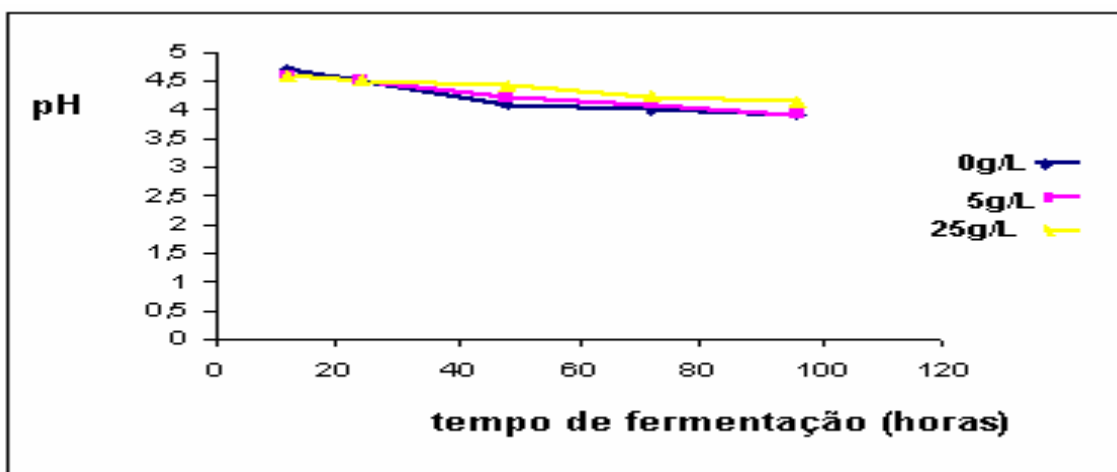


Figura 2 - Variação do pH na alta fermentação com sulfato de amônio em cerveja.



**Figura 3 - Variação do pH na baixa fermentação com pool de aminoácidos em cerveja.**



**Figura 4 - Variação do pH na alta fermentação com pool de aminoácidos em cerveja.**

#### **4.3. Influência da linhagem de levedura e da adição de nitrogênio na cinética de fermentação para a produção de vinho**

A avaliação dos efeitos da suplementação de nitrogênio realizado no presente trabalho foi realizada em amostras coletadas nos períodos 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas de fermentação.

A acidez em vinhos é proveniente principalmente de ácido tartárico e ácido acético, provenientes da uva e potencializados no processo de fabricação. Estes influenciam o sabor do vinho produzido. Verificou-se que todas as amostras encontraram-se dentro dos padrões legais para o teor de acidez total, que se situa

entre 55 e 130 meq/L (BRASIL, 1988). Os valores de acidez das amostras de vinho expressos em meq/L estão representados na Tabela 1.

**Tabela 1- Variação da acidez com sulfato de amônio nas amostras de vinho.**

Tempo de fermentação (horas)	Baixa fermentação (Saflager)			Alta fermentação (Safbrew)		
	0 g/L	5 g/L	25 g/L	0 g/L	5 g/L	25 g/L
12	72	102	109	56	94	108
24	81	117	114	68	105	116
48	101	122	124	70	118	123
72	103	125	128	71	124	128
96	106	127	130	71	126	129

Os valores do teor de sólidos solúveis (°Brix) e do teor alcoólico (°GL) estão representados graficamente nas Figuras 1 e 2 .

A Figura 1 representa os valores do teor de sólidos solúveis (°Brix) e do teor alcoólico produzido por uma linhagem de levedura de baixa fermentação adicionada de uma fonte nitrogenada (sulfato de amônio) em três concentrações 0 (sem adição nitrogenada), 5 g/L e 25 g/L em mosto de vinho. O maior rendimento nesta situação, ou seja, maior produção de etanol por consumo de substrato foi na concentração de 5 g/L semelhante aos mostos de cana-de-açúcar e de cerveja nas mesmas condições.

A Figura 2 representa os valores do teor de sólidos solúveis (°Brix) e do teor alcoólico produzido por uma linhagem de levedura de alta fermentação, adicionada de uma fonte nitrogenada (sulfato de amônio) em três concentrações 0 (sem adição), 5 g/L e 25 g/L. Nesta situação o rendimento da fermentação alcoólica foi maior sem a adição do sulfato de amônio.

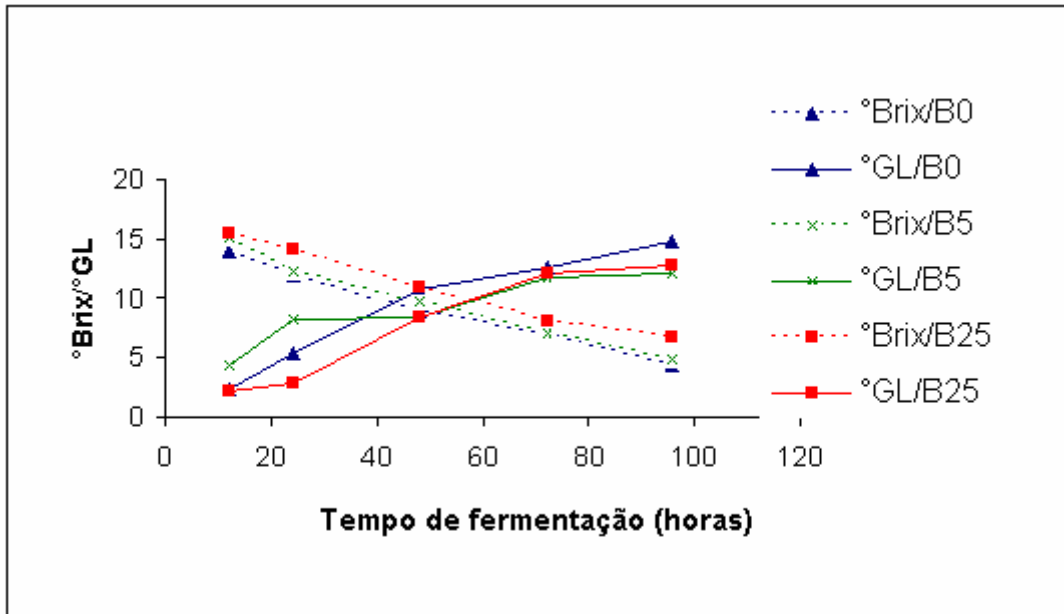


Figura 1- Evolução da fermentação alcoólica com levedura Saflager e adição de sulfato de amônio.

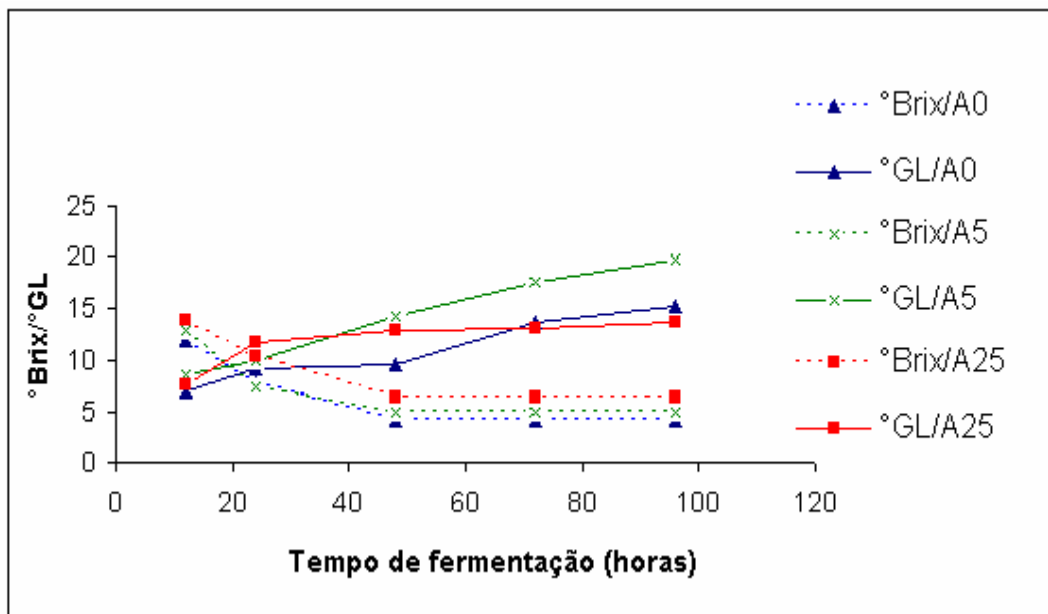
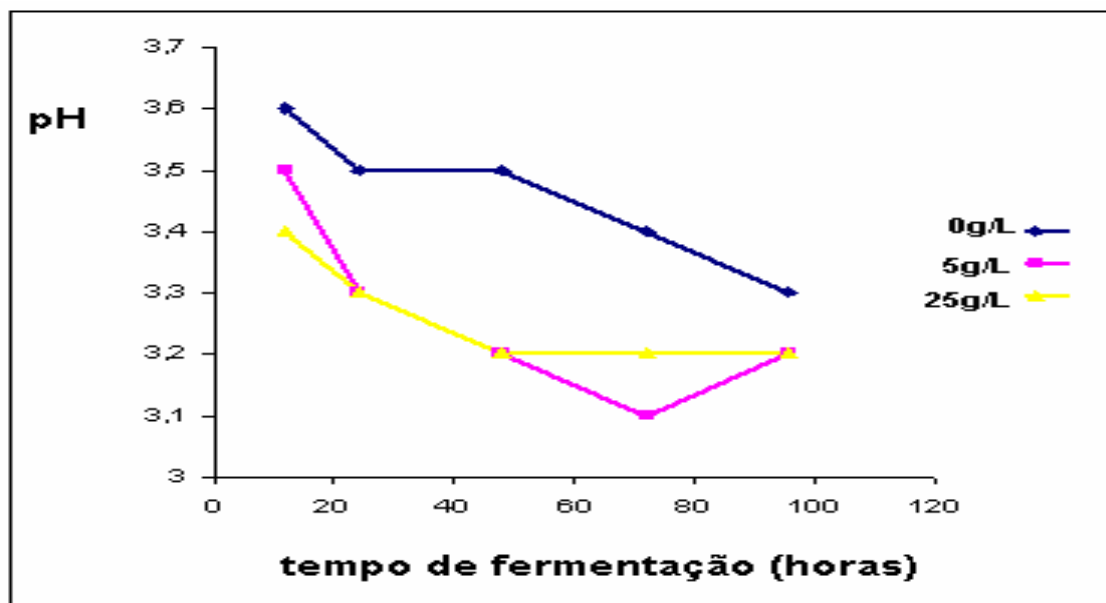
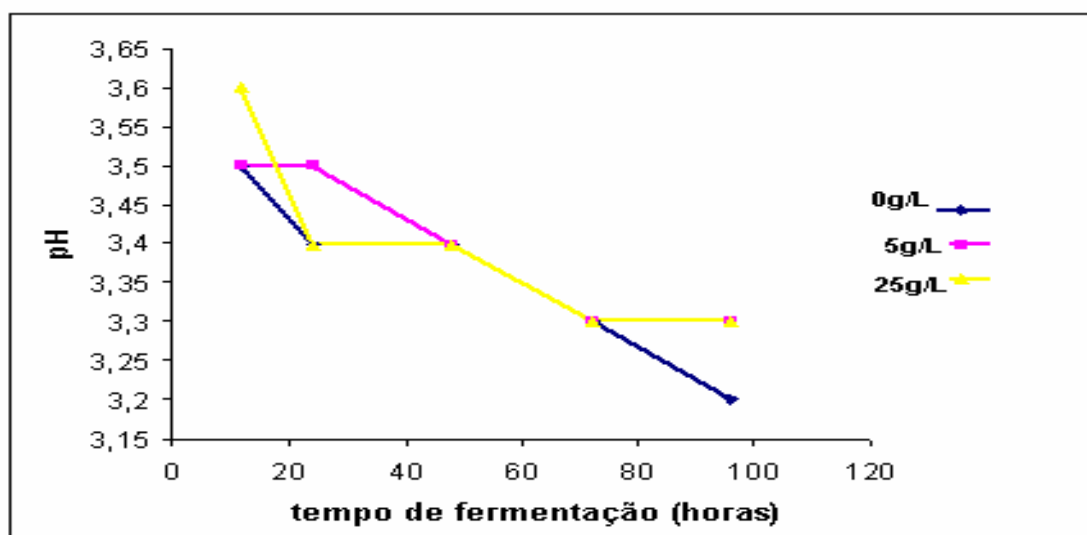


Figura 2- Evolução da fermentação alcoólica com levedura Safbrew e adição de sulfato de amônio.

Os valores de pH estão representados pelas Figuras 1 e 2. O valor situou-se entre 3,4 e 3,6 para a levedura de baixa fermentação e entre 3,2 e 3,5 para a levedura de alta fermentação. Os resultados obtidos estão próximos aos valores descritos por (BENASSI,1997).



**Figura 1- Variação do pH da baixa fermentação com sulfato de amônio em vinho.**

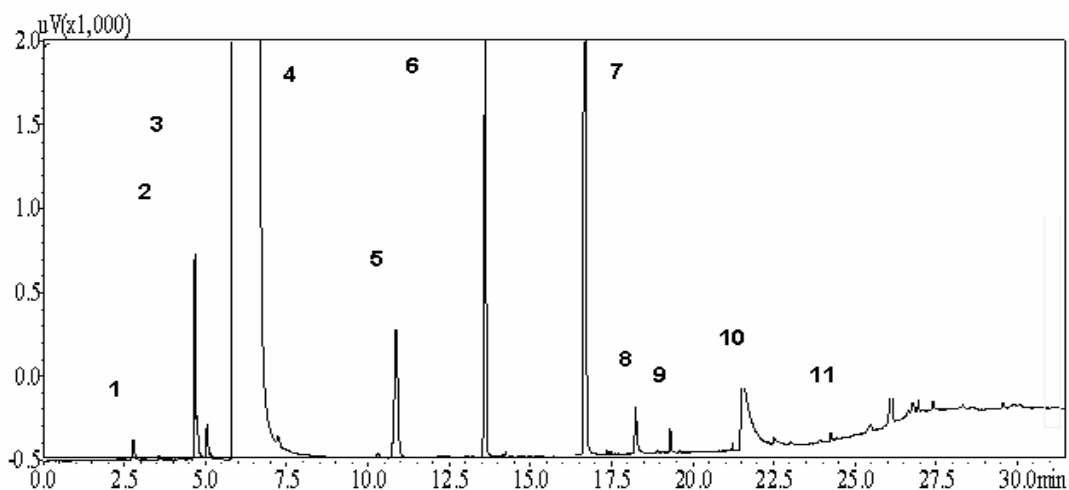


**Figura 2- Variação do pH da alta fermentação com sulfato de amônio em vinho.**

A medida do pH é de fundamental importância na análise de vinhos pelo seu efeito na cor, no sabor e na proporção entre  $\text{SO}_2$  livre e combinado. Para que o vinho atinja níveis satisfatórios destas características, o pH deve ficar entre 3,1 e 3,6. Um vinho com pH inferior a 3,4 apresenta uma notável resistência ao ataque de bactérias, principalmente *Bacterium tartareophorum*, promotora de doenças. Em vinhos com pH superior a 3,6 pode ocorrer o desenvolvimento da flora microbiana prejudicial (BENASSI,1997).

#### 4.4. Resultados das análises de compostos voláteis na cachaça por cromatografia gasosa

A Figura 1 representa um cromatograma típico das amostras de cachaça obtido nas condições cromatográficas previamente descritas.



**Figura 1 – Cromatograma típico das amostras de cachaça.**

(1) acetaldeído, (2) acetato de etila, (3) metanol, (4) etanol, (5) 1-propanol, (6) álcool isobutílico, (7) álcool isoamílico, (8) 1-butanol, (9) 2-butanol, (10) ácido acético, (11) carbamato de etila.

##### 4.4.1. Influência de duas linhagens de levedura e da adição de fontes nitrogenadas na formação do acetato de etila em cachaça

Tabela 1 – Resumo da análise de variância da concentração de acetato de etila nas amostras de cachaça com as fontes de variação.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Levedura	1	33179,8 n.s.
Fonte de nitrogênio	2	3597745,6 *
Concentração	2	4251396,8 *
Levedura * Fonte de nitrogênio	2	2425215,6 n.s.
Levedura * Concentração	2	41410,8 n.s.
Fonte de Nitrogênio * Concentração	4	1903791,9 n.s.
Resíduo	22	22139,3

\* significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

O acetato de etila é um éster formado pelas leveduras em maior quantidade durante a fermentação alcoólica. Neste composto não houve efeito das interações, desta forma foram avaliados os efeitos dos níveis dos fatores sobre as variáveis respostas de forma individual. Na Tabela 4 encontram-se os valores de sua média e desvio padrão, não houve diferenças entre as duas leveduras. Houve um aumento nos valores do acetato de etila com o aumento da concentração da fonte de nitrogênio, representado na Figura 2. Na análise da influência das fontes nitrogenadas (Tabela 2) foi realizado um teste de médias (Duncan) ao nível de significância de 5 % de probabilidade; o sulfato de amônio foi a fonte nitrogenada que mais contribuiu para a formação do acetato de etila nas amostras de cachaça, seguido pelo *pool* de aminoácidos e pela peptona de caseína.

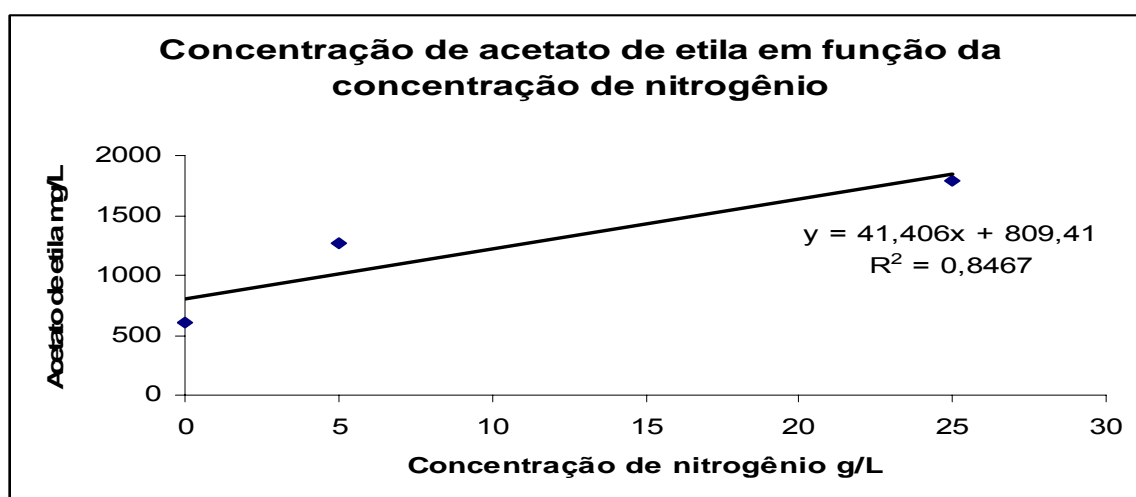


Figura 2 - Variação do acetato de etila com o aumento da concentração de nitrogênio.

Tabela 2 - Comparação de médias para o acetato de etila nas diferentes fontes de nitrogênio.

Fontes de nitrogênio	Acetato de etila (mg/L)
sulfato de amônio	1804,3 a
<i>pool</i> de aminoácidos	1149,7 b
peptona de caseína	716,7 c

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Duncan.

#### 4.4.2. Influência de duas linhagens de levedura e da adição de fontes nitrogenadas na formação do 1-propanol em cachaça

Tabela 3 – Resumo da análise de variância da concentração do 1-propanol nas amostras de cachaça com as fontes de variação.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Levedura	1	5498,0 n.s.
Fonte de nitrogênio	2	47716,9 *
Concentração	2	3673,2 n.s.
Levedura * fonte de nitrogênio	2	2398,9 n.s.
Levedura * Concentração	2	5879,5 n.s.
Fonte de Nitrogênio * Concentração	4	2051,1 n.s.
Resíduo	22	3993,8

\* significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Neste composto não houve efeito das interações, desta forma foram avaliados os efeitos dos níveis dos fatores sobre as variáveis respostas de forma individual. Na Tabela 4 encontram-se os valores de sua média e desvio padrão. Na análise da influência das fontes nitrogenadas (Tabela 5) foi realizado um teste de médias (Duncan) ao nível de significância de 5 % de probabilidade. As fontes nitrogenadas que mais contribuíram para a formação do 1-propanol foram as fontes nitrogenadas sulfato de amônio e peptona de caseína; o *pool* de aminoácidos foi o que menos influenciou a formação de 1-propanol.

Tabela 4 – Médias e desvio padrão dos compostos acetato de etila e 1-propanol para as 2 linhagens de levedura e as diferentes concentrações de nitrogênio.

Leveduras e Concentrações de N <sub>2</sub>	Acetato de etila		1-Propanol	
	Média (mg/L)	Desvio padrão	Média (mg/L)	Desvio padrão
Saflager w-3470	1119,1	11,9	177,4	11,3
Safbrew S-33	1253,8	23,8	202,1	15,0
0 g/L	606,0	15,3	171,3	4,8
5 g/L	1270,7	15,3	206,1	5,4
25g/L	1793,7	56,7	191,7	10,6

Tabela 5 – Comparação de médias para o 1-propanol nas diferentes fontes de nitrogênio.

<b>Fontes de nitrogênio</b>	<b>Médias (mg/L)</b>
Sulfato de amônio	233,7 <b>a</b>
Peptona de caseína	218,0 <b>a</b>
Pool de aminoácidos	117,5 <b>b</b>

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Duncan.

#### 4.4.3. Influência de duas linhagens de levedura e da adição de fontes nitrogenadas na formação dos compostos acetaldeído e metanol em cachaça

Tabela 6 – Resumo da análise de variância da concentração do acetaldeído nas amostras de cachaça com as fontes de variação.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>
Levedura	1	13008,3 n.s.
Fonte de nitrogênio	2	318463,0 n.s.
Concentração	2	64691,6 n.s.
Levedura * fonte de nitrogênio	2	44900,3 n.s.
Levedura * Concentração	2	51505,2 n.s.
Fonte de Nitrogênio * Concentração	4	51846,1 n.s.
Resíduo	22	718833,4

\* significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

As variações das concentrações do acetaldeído e do metanol na cachaça estão relacionadas na Tabela 8, com seus respectivos valores de média e desvio padrão. O acetaldeído não apresentou nenhuma fonte de variação significativa (Tabela 6). Os seus valores foram maiores na concentração de 5 g/L em média e na fonte nitrogenada peptona de caseína.

Tabela 7 – Resumo da análise de variância da concentração do metanol nas amostras de cachaça com as fontes de variação.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Levedura	1	46827,2 n.s.
Fonte de nitrogênio	2	1351216,1 n.s.
Concentração	2	129431,9 n.s.
Levedura * fonte de nitrogênio	2	463301,5 n.s.
Levedura * Concentração	2	6515,4 n.s.
Fonte de Nitrogênio * Concentração	4	55581,8 n.s.
Resíduo	22	56542,9

\* significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

O metanol não é proveniente da atividade do metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*, mas pela atividade de enzimas pécnicas. A pectinesterase catalisa a desesterificação do metil éster do polímero do ácido poligalacturônico para formar ácido péctico, metanol e íons hidrogênio. O metanol não apresentou nenhuma fonte de variação significativa (Tabela 7).

Tabela 8 – Médias e desvio padrão dos compostos acetadeído e do metanol para as 2 linhagens de levedura e as diferentes concentrações de nitrogênio.

Leveduras e Concentrações e Fontes de N <sub>2</sub>	Acetaldeído		Metanol	
	Média (mg/L)	Desvio padrão	Média (mg/L)	Desvio padrão
Saflager w- 3470	352,1	241,2	290,5	9,7
Safbrew S-33	314,1	197,6	202,1	4,3
0 g/L	269,4	121,8	208,6	14,5
5 g/L	413,4	286,8	366,9	7,6
25g/L	316,6	206,5	404,1	3,4
Sulfato de amônio	172,9	41,5	449,1	4,8
Peptona de caseína	498,6	264,7	262,5	2,4
Pool de aminoácidos	327,9	147,6	268,1	9,4

#### 4.4.4. Influência de duas linhagens de levedura e da adição de fontes nitrogenadas na formação dos compostos álcool isobutílico, álcool isoamílico e carbamato de etila em cachaça

Tabela 9 – Resumo da análise de variância da concentração do álcool isobutílico nas amostras de cachaça com as fontes de variação.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>
Levedura	1	34745,5 *
Fonte de nitrogênio	2	47359,3 *
Concentração	2	9421,5 n.s.
Levedura * fonte de nitrogênio	2	3876,8 *
Levedura * Concentração	2	13397,1 *
Fonte de Nitrogênio * Concentração	4	21446,7 *
Resíduo	22	3909,7

\* significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Tabela 10 – Resumo da análise de variância da concentração do álcool isoamílico nas amostras de cachaça com as fontes de variação.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>
Levedura	1	286926,3 *
Fonte de nitrogênio	2	1008596,9 *
Concentração	2	520911,4 *
Levedura * fonte de nitrogênio	2	108359,1 *
Levedura * Concentração	2	532051,4 *
Fonte de Nitrogênio * Concentração	4	198452,2 *
Resíduo	22	32162,4

\* significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Tabela 11 – Resumo da análise de variância da concentração do carbamato de etila nas amostras de cachaça com as fontes de variação.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Levedura	1	320,3 *
Fonte de nitrogênio	2	81,8 *
Concentração	2	49,1 *
Levedura * fonte de nitrogênio	2	196,7 *
Levedura * Concentração	2	14,3 n.s.
Fonte de Nitrogênio * Concentração	4	37,4 *
Resíduo	22	9,4

\* significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

A Figura 3 representa um cromatograma típico do padrão do carbamato de etila encontrado nas amostras de cachaça.

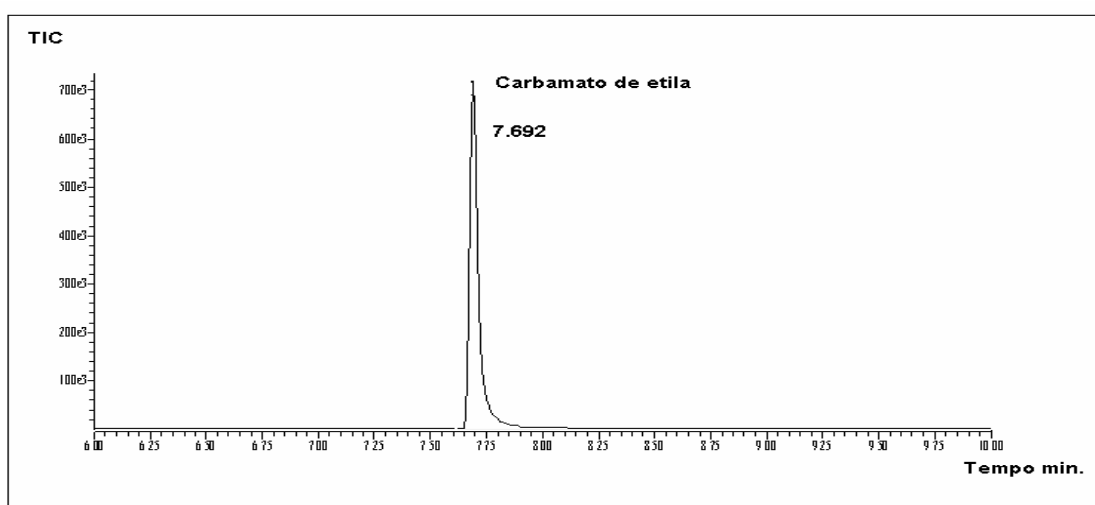


Figura 3 – Cromatograma típico do padrão externo do carbamato de etila usado na confirmação de sua presença nas amostras de cachaça.

A presença do carbamato de etila nas amostras de cachaça foi confirmada em um cromatógrafo a gás acoplado com espectrometria de massa. O método utilizado foi o do padrão externo com monitoramento seletivo de íons (MSI) em que foram monitorados os íons  $m/z$  62, 74 e 89.

Os valores de média e desvio padrão para os álcoois **isoamílico** e **isobutílico** e também para o **carbamato de etila** estão representados na Tabela

12. A Figura 4 representa a variação do álcool isobutílico em diferentes concentrações de nitrogênio com a levedura Saflager. Os valores do álcool isobutílico reduziram com o aumento da concentração de nitrogênio e com a levedura de baixa fermentação. Os valores da influência do sulfato de amônio e as suas concentrações para o isobutílico estão representados na Figura 7. Houve uma redução na concentração do isobutílico com o aumento da concentração de nitrogênio sulfato de amônio.

A concentração de isoamílico teve um aumento na interação da levedura de alta fermentação com o aumento da concentração de nitrogênio (Figura 5). Na interação entre as fontes de nitrogênio e suas concentrações (Figura 8) houve um aumento nas concentrações de isoamílico com a adição da fonte nitrogenada fornecida pelo *pool* de aminoácidos, visto que a produção destes álcoois durante a fermentação alcoólica é influenciada principalmente pelas condições do meio, entre elas: a concentração de açúcares, o pH, o conteúdo e a fonte de nitrogênio disponível, a temperatura de fermentação, a aeração e a linhagem de levedura. Estes álcoois superiores são formados a partir do desvio do metabolismo dos aminoácidos pelas leveduras, ocasião em que cetoácido envolvido é descarboxilado a aldeído, com posterior redução a álcool superior. Na levedura de baixa fermentação houve um aumento na concentração de carbamato de etila nas amostras de cachaça (Figura 6). Na interação entre as fontes de nitrogênio e as suas concentrações (Figura 9), o sulfato de amônio e o *pool* de aminoácidos influenciaram de maneira significativa um aumento nos valores do carbamato de etila, fato alarmante visto que este composto é potencialmente carcinogênico e existem várias vias possíveis para a sua formação nas bebidas destiladas, geralmente envolvendo a reação entre o etanol e seus precursores nitrogenados, tais como: uréia, fosfato de carbamila, sulfato de amônio e certos aminoácidos.

Tabela 12 – Médias e desvio padrão dos compostos álcool isobutílico, álcool isoamílico e carbamato de etila para as 2 linhagens de levedura e as diferentes concentrações de nitrogênio.

Leveduras e Concentrações e Fontes de N <sub>2</sub>	Álcool isobutílico		Álcool isoamílico		Carbamato de etila	
	Média (mg/L)	Desvio padrão	Média (mg/L)	Desvio padrão	Média (µg/L)	Desvio padrão
Saflager w-3470	234,1	9,6	772,9	5,1	126,1	6,0
Safbrew S-33	296,3	2,9	951,4	1,3	185,8	3,2
0 g/L	296,5	8,5	624,9	11,1	133,2	3,2
5 g/L	717,9	2,2	946,3	32,0	162,9	9,7
25g/L	740,8	9,1	1015,2	15,2	171,8	1,0
Sulfato de amônio	199,1	12,6	536,3	11,0	177,7	4,0
Peptona de caseína	324,1	24,8	1091,6	3,4	164,2	1,5
Pool de aminoácidos	272,4	33,0	958,5	8,5	126,7	3,8

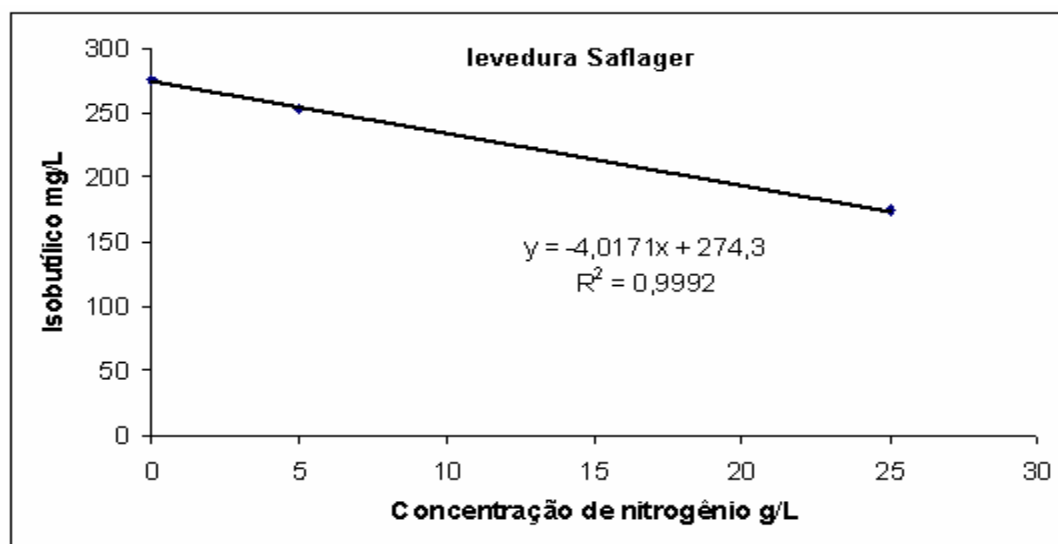
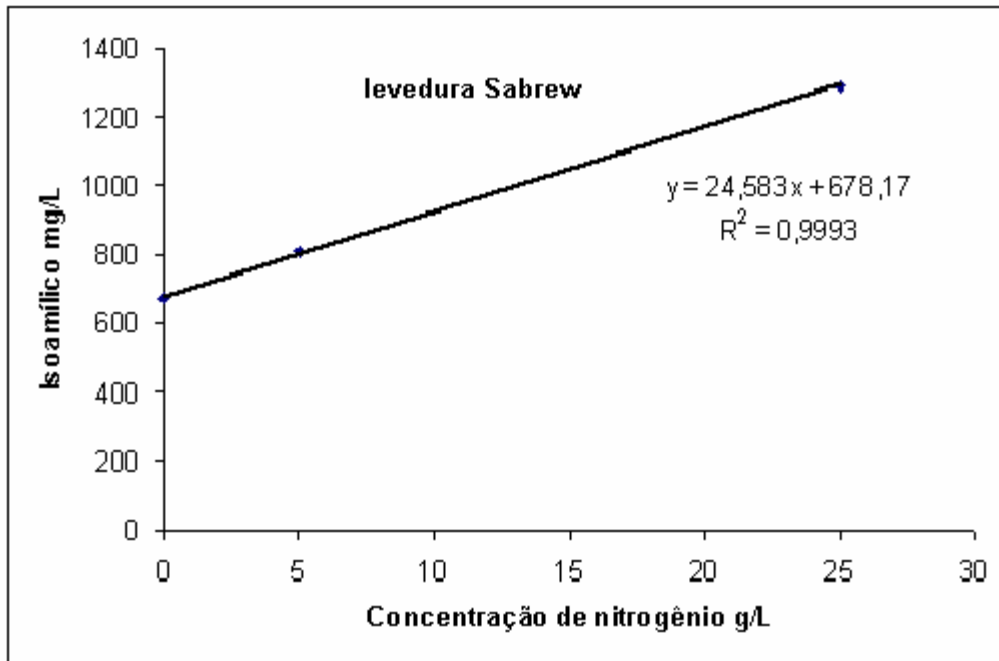
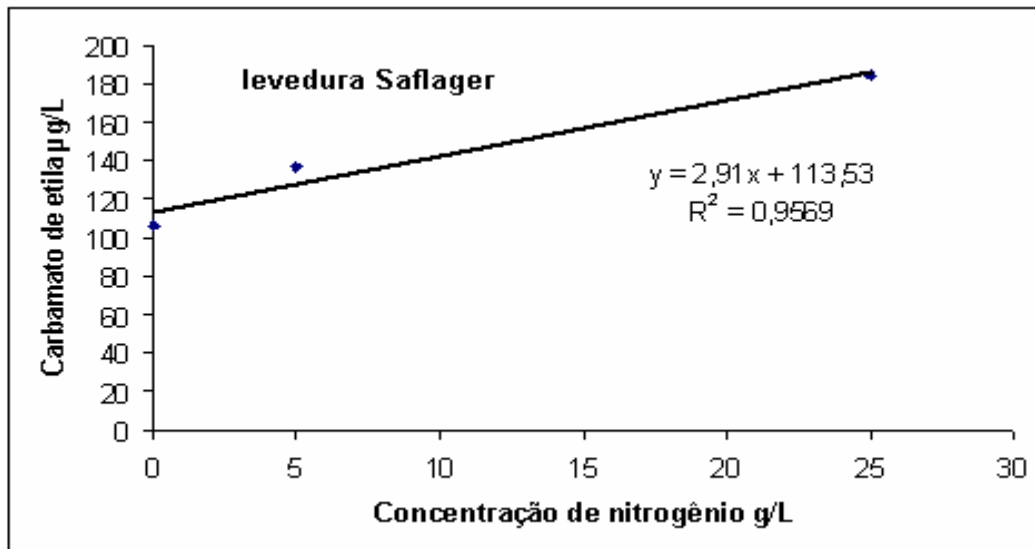


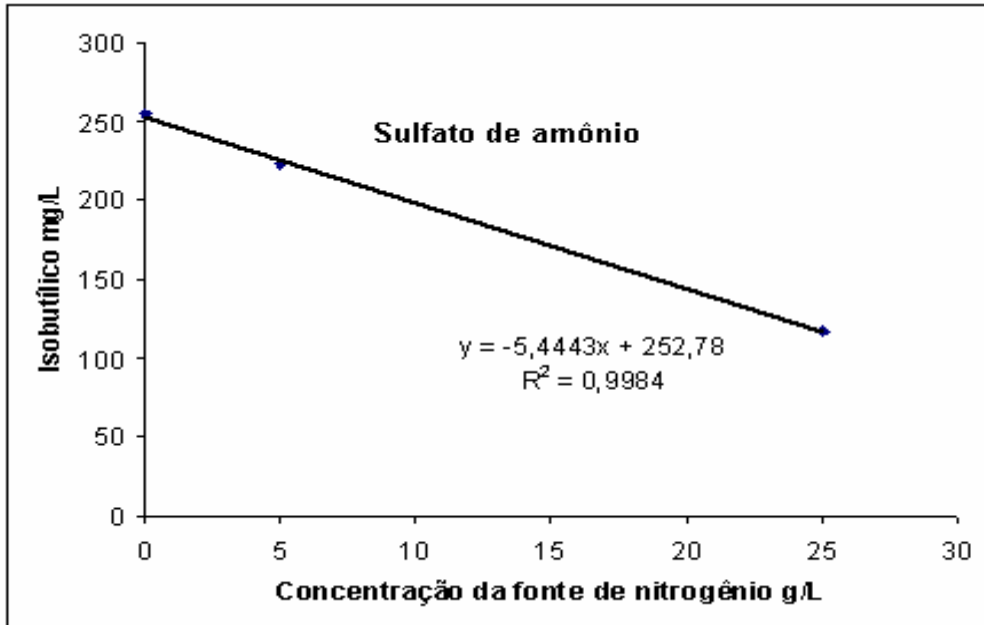
Figura 4 - Representação da concentração de álcool isobutílico em diferentes concentrações de nitrogênio com a levedura Saflager.



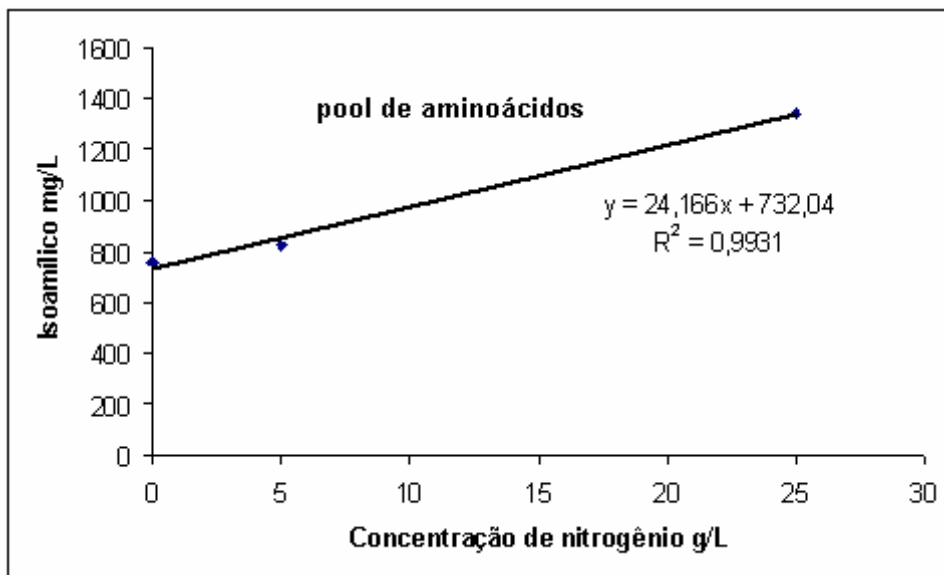
**Figura 5 - Representação da concentração de isoamílico em diferentes concentrações de nitrogênio com a levedura Saflager.**



**Figura 6 - Representação da concentração de carbamato de etila em diferentes concentrações de nitrogênio com a levedura Saflager.**



**Figura 7 – Variação do álcool isobutílico com a fonte de nitrogênio sulfato de amônio em diferentes concentrações.**



**Figura 8 - Representação da interação entre as fontes de nitrogênio e suas concentrações em g/L para o álcool isoamílico.**

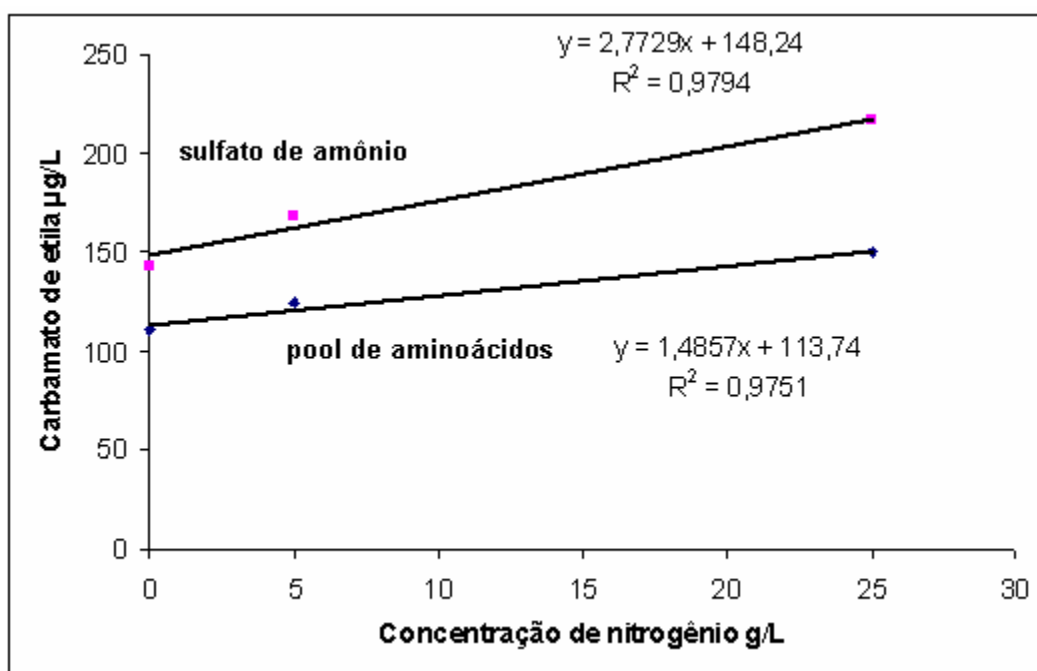


Figura 9- Representação da interação entre as fontes de nitrogênio e suas concentrações em g/L para o carbamato de etila.

#### 4.4.5. Influência de duas linhagens de levedura e da adição nitrogenada na formação dos compostos ácido acético, 1-butanol e 2-butanol em cachaça

Tabela 12 – Resumo da análise de variância da concentração do ácido acético nas amostras de cachaça com as fontes de variação.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Levedura	1	286926,3 n.s.
Fonte de nitrogênio	2	1008596,9 n.s.
Concentração	2	520911,4 n.s.
Levedura * fonte de nitrogênio	2	108359,1 n.s.
Levedura * Concentração	2	532051,4 n.s.
Fonte de Nitrogênio *	4	198452,2 n.s.
Concentração		
Resíduo	22	86150,2

\* significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Os valores de média e desvio padrão para o ácido acético, 1-butanol e 2-butanol estão representados na Tabela 15.

A acidez volátil na cachaça é expressa em concentração de ácido acético, que é o ácido volátil predominante. Usualmente uma grande concentração de ácido acético é consequência de má condição do mosto fermentado devido a uma contaminação por bactérias acéticas que utilizam o etanol em seu metabolismo produzindo o ácido. Também a condução da destilação pode acarretar cachaça com acidez elevada e o reflexo natural é um produto final de pouca qualidade. Logo a concentração de ácido acético não foi influenciada de maneira direta pelas fontes nitrogenadas em suas diferentes concentrações (Tabela 12).

Tabela 13 – Resumo da análise de variância da concentração do 1-butanol nas amostras de cachaça com as fontes de variação.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>
Levedura	1	26,9 n.s.
Fonte de nitrogênio	2	217,4 *
Concentração	2	109,9 *
Levedura * fonte de nitrogênio	2	10,6 n.s.
Levedura * Concentração	2	17,6 n.s.
Fonte de Nitrogênio *	4	83,0 *
Concentração		
Resíduo	22	21,3

\* significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

A Figura 10 representa a interação entre as fontes de nitrogênio e as suas concentrações para o 1-butanol. A concentração de 1-butanol, que é um contaminante orgânico aumentou com o aumento da concentração de duas fontes nitrogenadas, o sulfato de amônio e o *pool* de aminoácidos. Já com o uso da peptona de caseína o 1-butanol teve seus valores reduzidos.

Tabela 14 – Resumo da análise de variância da concentração do 2-butanol nas amostras de cachaça com as fontes de variação.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Levedura	1	0,10 *
Fonte de nitrogênio	2	0,05 *
Concentração	2	0,28 *
Levedura * fonte de nitrogênio	2	0,29 *
Levedura * Concentração	2	0,01 *
Fonte de Nitrogênio * Concentração	4	0,03 n.s.
Resíduo	22	0,01

\* significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

A Figura 11 representa a interação entre as fontes de nitrogênio e as suas concentrações influenciando os valores de 2-butanol, que também é um contaminante orgânico. Somente o sulfato de amônio não influenciou um aumento nos valores do 2-butanol nas amostras de cachaça, com o uso desta fonte nitrogenada os valores de 2-butanol permaneceram praticamente constantes. Já a peptona de caseína e o *pool* de aminoácidos influenciaram um aumento nos valores do 2-butanol.

Tabela 15 – Médias e desvio padrão dos compostos ácido acético, 1-butanol e 2-butanol para as 2 linhagens de levedura e as diferentes concentrações de nitrogênio.

Leveduras e Concentrações e Fontes de N <sub>2</sub>	Ácido acético		1-Butanol		2-Butanol	
	Média (mg/L)	Desvio padrão	Média (mg/L)	Desvio padrão	Média (µg/L)	Desvio padrão
Saflager w-3470	764,5	541,6	4,8	6,2	4,8	6,2
Safbrew S-33	587,5	334,8	6,9	7,1	6,6	7,0
0 g/L	296,6	82,5	3,3	1,7	3,3	1,7
5 g/L	256,6	95,6	4,7	3,2	4,7	3,2
25g/L	242,6	120,8	9,1	10,3	9,1	10,3
Sulfato de amônio	501,2	168,8	10,5	9,4	10,5	9,4
Peptona de caseína	990,3	623,7	2,4	1,2	2,4	1,2
Pool de aminoácidos	536,7	269,1	4,2	3,1	4,2	3,1

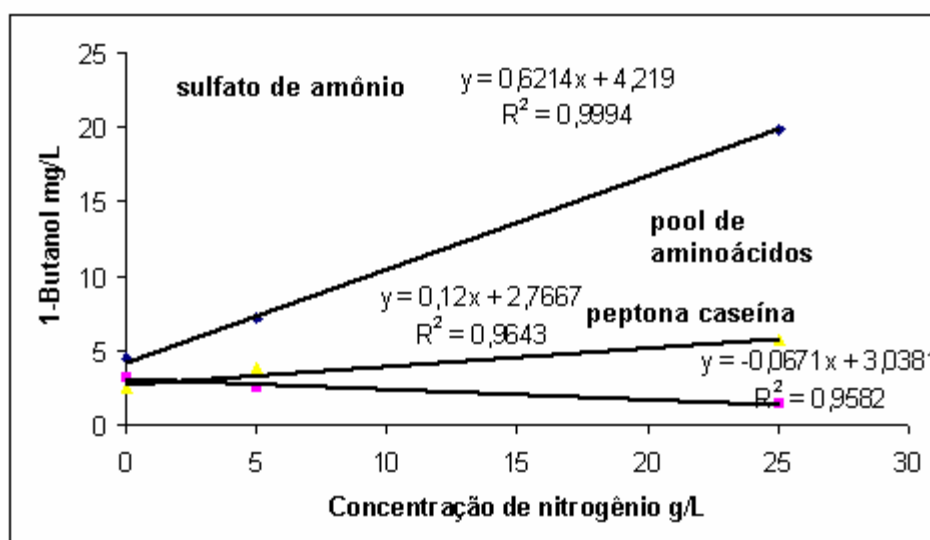
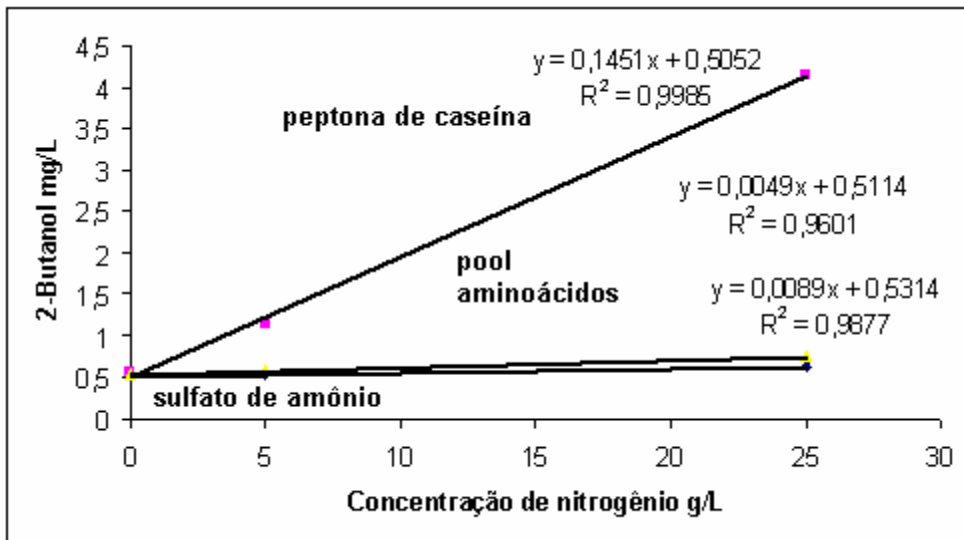


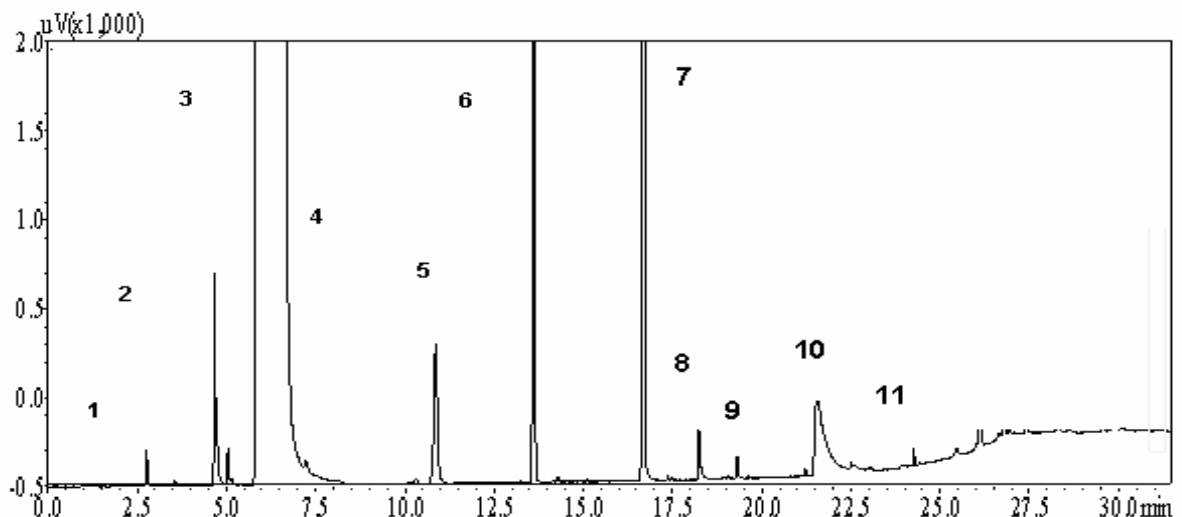
Figura 10 - Representação da interação entre as fontes de nitrogênio e suas concentrações em g/L para o 1-butanol.



**Figura 11 - Representação da interação entre as fontes de nitrogênio e suas concentrações em g/L para o 2-butanol.**

#### 4.5. Resultados das análises de compostos voláteis em cerveja por cromatografia gasosa

A Figura 1 representa um cromatograma típico das amostras de cerveja obtido nas condições cromatográficas previamente descritas.



**Figura 1 – Cromatograma típico das amostras de cerveja.**

**(1)** acetaldeído, **(2)** acetato de etila, **(3)** metanol, **(4)** etanol, **(5)** 1-propanol, **(6)** álcool isobutílico, **(7)** álcool isoamílico, **(8)** 1-butanol, **(9)** 2-butanol, **(10)** ácido acético, **(11)** carbamato de etila.

#### 4.5.1. Influência de duas linhagens de levedura e da adição nitrogenada na formação dos compostos acetato de etila, metanol e acetaldeído em cerveja

Tabela 1 - Resumo da análise de variância da concentração do acetato de etila nas amostras de cerveja com as fontes de variação.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Levedura	1	880,4 n.s.
Fonte de nitrogênio	1	243,1 n.s.
Concentração	2	765,9 n.s.
Levedura * Fonte de nitrogênio	1	1800,2 n.s.
Levedura * Concentração	2	928,3 n.s.
Fonte de nitrogênio *	2	1196,5 n.s.
Concentração		
Resíduo	14	904,3

\* significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Tabela 2 - Resumo da análise de variância da concentração do metanol nas amostras de cerveja com as fontes de variação.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Levedura	1	319,1 n.s.
Fonte de nitrogênio	1	105,4 n.s.
Concentração	2	132,4 n.s.
Levedura * Fonte de nitrogênio	1	9,7 n.s.
Levedura * Concentração	2	43,6 n.s.
Fonte de nitrogênio *	2	34,9 n.s.
Concentração		
Resíduo	14	54,7

\*significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Na formação de **acetato de etila** e de **metanol** em cerveja nem uma fonte de variação foi significativa (Tabelas 1 e 2 respectivamente). Os valores de média e desvio padrão destes compostos estão representados na Tabela 3.

Tabela 3 - Médias e desvio padrão dos compostos acetaldeído, acetato de etila e metanol para as 2 linhagens de levedura e as diferentes fontes e concentrações de nitrogênio em cerveja.

Leveduras e Concentrações e Fontes de N <sub>2</sub>	Acetaldeído		Acetato de etila		Metanol	
	Média (mg/L)	Desvio padrão	Média (mg/L)	Desvio padrão	Média (µg/L)	Desvio padrão
Saflager w-3470	426,0	47,1	18,1	11,4	9,8	0,4
Safbrew S-33	153,1	12,6	30,3	13,5	2,5	0,7
0 g/L	226,1	28,8	15,3	3,5	5,5	0,1
5 g/L	247,3	70,2	34,4	11,3	2,9	1,0
25g/L	429,4	34,8	21,3	13,7	10,9	1,9
Sulfato de amônio	226,5	34,7	20,3	10,7	8,6	1,1
Pool de aminoácidos	375,3	97,1	26,5	12,2	4,4	3,8

Tabela 4 - Resumo da análise de variância da concentração do acetaldeído nas amostras de cerveja com as fontes de variação.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Levedura	1	44360,3 *
Fonte de nitrogênio	1	132859,6 *
Concentração	2	99888,4 *
Levedura * Fonte de nitrogênio	1	131648,2 *
Levedura * Concentração	2	11489,6 n.s
Fonte de nitrogênio * Concentração	2	25343,0 n.s.
Resíduo	14	22977,1

\* significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Os valores de média e desvio padrão de **acetaldeído** nas amostras de cerveja estão representados na Tabela 3, o acetaldeído provém da descarboxilação do piruvato, durante a fermentação alcoólica. A sua formação depende da linhagem da levedura, do pH, das substâncias nitrogenadas presentes no mosto durante a fermentação e da temperatura. A interação entre as duas linhagens de levedura com as fontes de nitrogênio foi significativa (Tabela 4). A Tabela 5 representa o teste F para as linhagens de levedura, ocorreu uma maior formação de acetaldeído na baixa fermentação, ao nível de 5 % de probabilidade. A Tabela 6 representa o teste F para as duas fontes de nitrogênio utilizadas neste experimento, em que ocorreu uma maior formação de acetaldeído na adição do *pool* de aminoácidos, ao nível de 5 % de probabilidade.

Tabela 5 - Comparação das linhagens de levedura para o acetaldeído em cerveja.

<b>Linhagens de levedura</b>	<b>Médias (mg/L)</b>
Saflager (baixa fermentação)	426,0 <b>a</b>
Safbrew (alta fermentação)	153,1 <b>b</b>

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 6 - Comparação das diferentes fontes de nitrogênio para acetaldeído em cerveja.

<b>Fontes de nitrogênio</b>	<b>Médias (mg/L)</b>
<i>Pool</i> de aminoácidos	375,3 <b>a</b>
Sulfato de amônio	226,5 <b>b</b>

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

#### 4.5.2. Influência de duas linhagens de levedura e da adição nitrogenada na formação dos compostos 1-propanol, isobutílico e isoamílico em cerveja

Tabela 7 – Resumo da análise de variância da concentração do 1-propanol nas amostras de cerveja com as fontes de variação.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Levedura	1	44360,3 n.s.
Fonte de nitrogênio	1	132859,6 n.s.
Concentração	2	99888,4 n.s.
Levedura * Fonte de nitrogênio	1	131648,2 n.s.
Levedura * Concentração	2	11489,6 n.s.
Fonte de nitrogênio * Concentração	2	25343,0 *
Resíduo	14	67,2

\* significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Os valores de média e desvio padrão para o **1-propanol** estão representados na Tabela 10. O 1-propanol apresentou uma interação significativa, que foi entre a fonte nitrogenada e a sua concentração. A Figura 2 representa esta interação, em que foi observada uma maior formação do 1-propanol com o uso do sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, houve um aumento nos valores do 1-propanol com o aumento da concentração do sulfato de amônio.

Tabela 8 - Resumo da análise de variância da concentração do isobutílico nas amostras de cerveja com as fontes de variação.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Levedura	1	44360,3 n.s.
Fonte de nitrogênio	1	132859,6 n.s.
Concentração	2	99888,4 n.s.
Levedura * Fonte de nitrogênio	1	131648,2 *
Levedura * Concentração	2	11489,6 n.s.
Fonte de nitrogênio * Concentração	2	25343,0 *
Resíduo	14	35,7

\* significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Os valores de média e desvio padrão para o **álcool isobutílico** estão representados na Tabela 10. O álcool isobutílico apresentou duas interações significativas, uma delas foi a interação entre a fonte de nitrogênio com a levedura e a outra foi a da fonte de nitrogênio com a concentração. Da mesma forma que o 1-propanol, com o uso do sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, o valores do isobutílico aumentaram com o aumento da concentração do sulfato de amônio (Figura 3). Foi realizado um teste F para a comparação das leveduras, representado na Tabela 11. Foi observado que não houve diferença significativa entre as duas linhagens de levedura, ao nível de 5 % de probabilidade.

Tabela 9 - Resumo da análise de variância da concentração do isoamílico nas amostras de cerveja com as fontes de variação.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Levedura	1	17477,7 *
Fonte de nitrogênio	1	2289,5 n.s.
Concentração	2	82,9 n.s.
Levedura * Fonte de nitrogênio	1	101,5 n.s.
Levedura * Concentração	2	1326,0 n.s.
Fonte de nitrogênio *	2	1587,9 n.s.
Concentração		
Resíduo	14	574,1

\* significativo n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Os valores de média e desvio padrão para o **álcool isoamílico** estão representados na Tabela 10. Houve diferença entre as duas linhagens de levedura na concentração do álcool isoamílico nas amostras de cerveja. A concentração do álcool isoamílico foi maior com a levedura de alta fermentação pelo teste F, ao nível de 5 % de probabilidade (Tabela 12).

Tabela 10 - Médias e desvio padrão dos compostos 1-propanol, isobutílico e isoamílico para as 2 linhagens de levedura e as diferentes fontes e concentrações de nitrogênio em cerveja.

Leveduras e Concentrações e Fontes de N <sub>2</sub>	1-Propanol		Isobutílico		Isoamílico	
	Média (mg/L)	Desvio padrão	Média (mg/L)	Desvio padrão	Média (µg/L)	Desvio padrão
Saflager w-3470	18,9	11,4	16,9	8,7	70,5	29,4
Safbrew S-33	13,2	5,3	22,0	7,0	124,6	29,8
0 g/L	15,6	5,3	21,6	8,8	98,9	38,7
5 g/L	12,7	6,0	16,3	7,0	94,3	43,5
25g/L	20,7	13,6	19,9	8,9	92,8	42,9
Sulfato amônio	15,9	12,6	15,9	5,9	85,6	28,5
Pool de aminoácidos	16,8	4,8	22,5	9,2	105,1	48,2

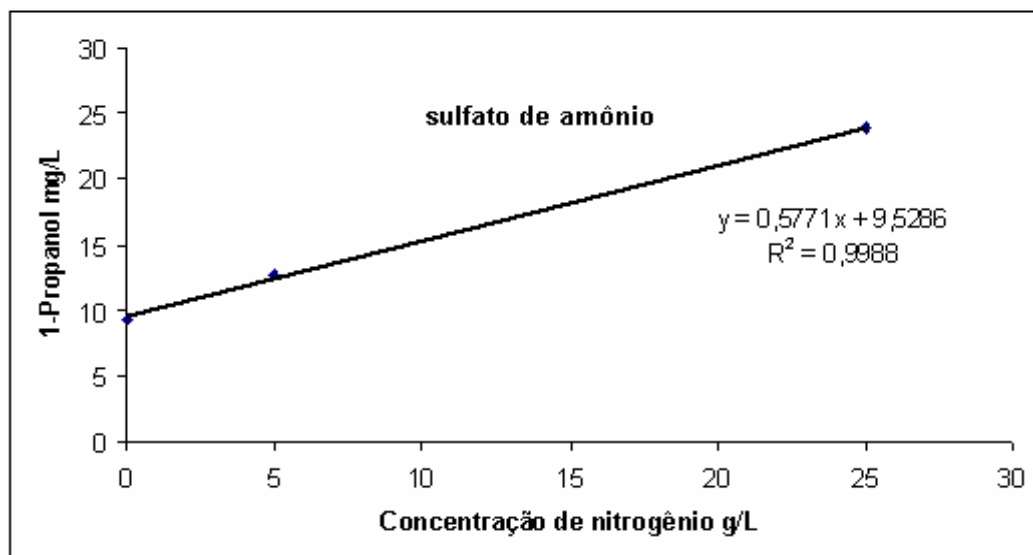
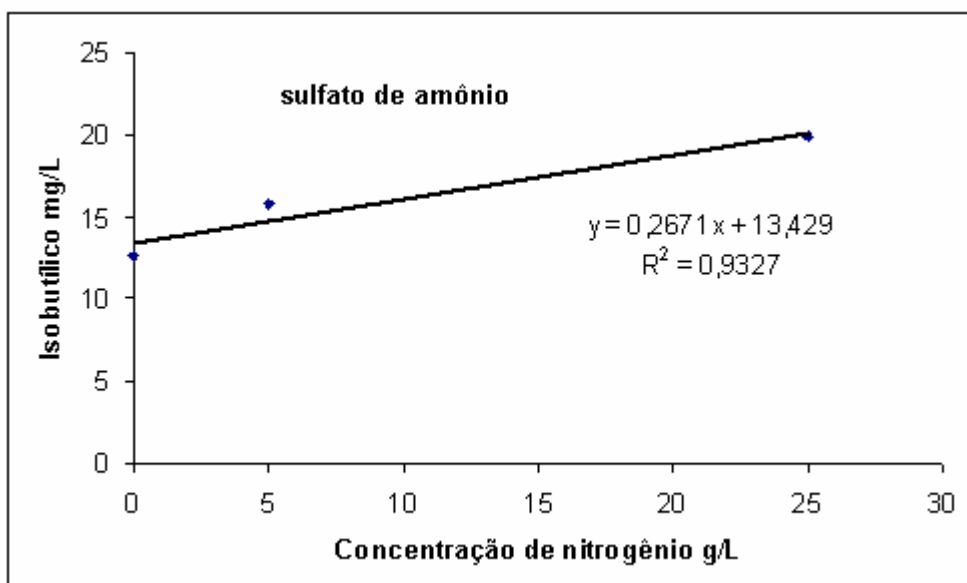


Figura 2 - Representação da variação do 1-propanol com a fonte de nitrogênio sulfato de amônio.



**Figura 3 - Representação da variação do álcool isobutílico com sulfato de amônio.**

Tabela 11 - Comparação das diferentes linhagens de levedura para o álcool isobutílico em cerveja.

<b>Linhagens de levedura</b>	<b>Médias (mg/L)</b>
Safbrew (alta fermentação)	22,046 <b>a</b>
Saflager (baixa fermentação)	16,883 <b>a</b>

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 12 - Comparação das diferentes linhagens de levedura para o álcool isoamílico em cerveja.

<b>Linhagens de levedura</b>	<b>Médias (mg/L)</b>
Safbrew (alta fermentação)	124,7 <b>a</b>
Saflager (baixa fermentação)	70,5 <b>b</b>

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

#### 4.5.3. Influência de duas linhagens de levedura e da adição nitrogenada na formação do ácido acético em cerveja

Os valores de média e desvio padrão do ácido acético estão representados na Tabela 13. Estes valores não foram influenciados por nenhuma fonte de variação testada neste experimento. O ácido acético é formado em consequência de má condição do mosto fermentado da cerveja devido a possíveis contaminações por bactérias acéticas que metabolizam o etanol produzindo o ácido.

Tabela 13 - Médias e desvio padrão dos compostos ácido acético para as 2 linhagens de levedura e as diferentes fontes e concentrações de nitrogênio em cerveja.

Leveduras e Concentrações e Fontes de N <sub>2</sub>	Ácido acético	
	Média (mg/L)	Desvio padrão
Saflager w-3470	123,3	72,2
Safbrew S-33	227,3	126,5
0 g/L	142,3	81,1
5 g/L	160,6	85,1
25g/L	210,0	156,2
Sulfato amônio	170,9	89,2
<i>Pool</i> de aminoácidos	171,0	134,7

#### 4.5.4. Influência de duas linhagens de levedura e da adição nitrogenada na formação do 1-butanol e do 2-butanol em cerveja

Tabela 14 - Resumo da análise de variância da concentração 1-butanol nas amostras de cerveja com as fontes de variação.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Levedura	1	0,18 n.s.
Fonte de nitrogênio	1	0,02 n.s.
Concentração	2	0,01 n.s.
Levedura * Fonte de nitrogênio	1	0,02 n.s.
Levedura * Concentração	2	0,05 n.s.
Fonte de nitrogênio * Concentração	2	0,01 n.s.
Resíduo	14	0,05

\* significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Tabela 15 - Resumo da análise de variância da concentração do 2-butanol nas amostras de cerveja com as fontes de variação.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Levedura	1	0,011 n.s.
Fonte de nitrogênio	1	0,001 n.s.
Concentração	2	0,014 n.s.
Levedura * Fonte de nitrogênio	1	0,001 n.s.
Levedura * Concentração	2	0,010 n.s.
Fonte de nitrogênio * Concentração	2	0,002 n.s.
Resíduo	14	0,01

\* significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Estes dois compostos encontram-se normalmente na cerveja em valores que variam de 0,4 mg/L a 0,6 mg/L. A Tabela 16 representa os valores de média e desvio padrão destes compostos que são indesejáveis nas bebidas alcoólicas e são considerados como contaminantes orgânicos. Eles não apresentaram relações significativas para as fontes de variação testadas neste experimento (Tabelas 14 e 15).

Tabela 16 - Médias e desvio padrão dos compostos 1-butanol e 2-butanol para as 2 linhagens de levedura e as diferentes fontes e concentrações de nitrogênio em cerveja.

Leveduras e Concentrações e Fontes de N <sub>2</sub>	1-butanol		2-butanol	
	Média (mg/L)	Desvio padrão	Média (µg/L)	Desvio padrão
Saflager w-3470	0,7	0,2	0,5	0,1
Safbrew S-33	0,6	0,2	0,6	0,1
0 g/L	0,7	0,2	0,5	0,1
5 g/L	0,6	0,2	0,6	0,1
25g/L	0,7	0,3	0,6	0,1
Sulfato amônio	0,7	0,2	0,5	0,1
Pool de aminoácidos	0,6	0,2	0,5	0,1

#### 4.5.5. Influência de duas linhagens de levedura e da adição nitrogenada na formação do carbamato de etila em cerveja

A Figura 4 representa um cromatograma típico do padrão do carbamato de etila encontrado nas amostras de cerveja.

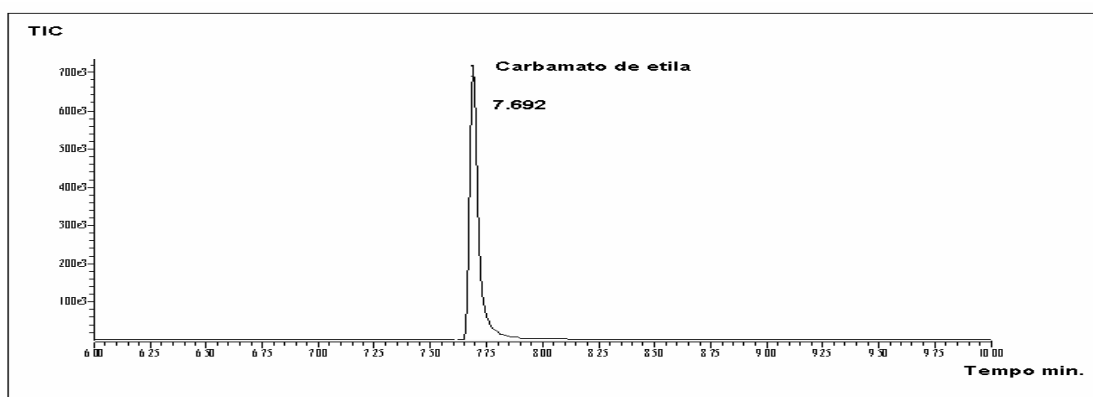


Figura 4 – Cromatograma típico do padrão externo do carbamato de etila usado na confirmação de sua presença em amostras de cerveja.

A presença do carbamato de etila nas amostras de cerveja foi confirmada em um cromatógrafo gasoso acoplado com espectrometria de massa. O método utilizado foi do padrão externo com monitoramento seletivo de íons (MSI), em que foram monitorados os íons m/z 62, 74 e 89.

Tabela 17 - Resumo da análise de variância da concentração do carbamato de etila nas amostras de cerveja com as fontes de variação.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Levedura	1	2,2 n.s.
Fonte de nitrogênio	1	1,1 n.s.
Concentração	2	1,7 n.s.
Levedura * Fonte de nitrogênio	1	0,5 n.s.
Levedura * Concentração	2	3,9 n.s.
Fonte de nitrogênio * Concentração	2	1,6 n.s.
Resíduo	14	2,4

\* significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

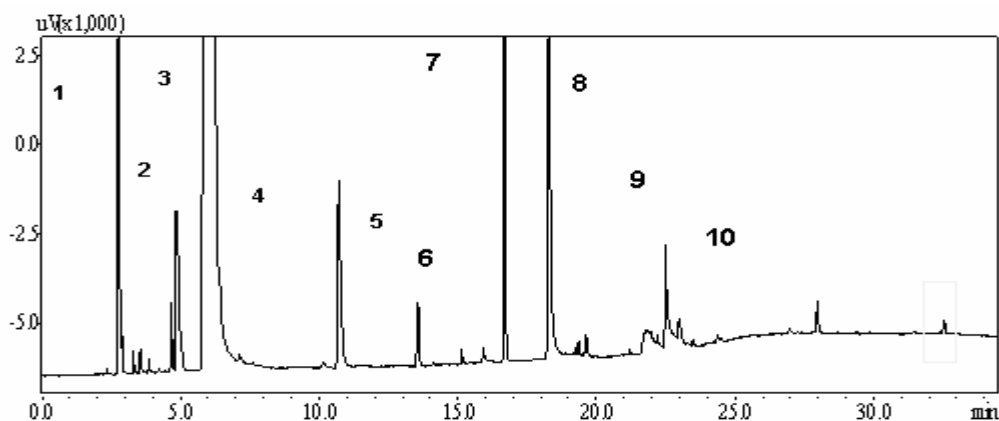
O carbamato de etila pode ser formado no mosto de cerveja devido a uma reação entre o fosfato de carabamila com o etanol produzido pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*; este fosfato de carabamila é gerado a partir da síntese de fontes nitrogenadas como o sulfato de amônio e certos aminoácidos como a arginina. Os valores encontrados de média e desvio padrão do carbamato de etila estão representados na Tabela 18. Os valores da levedura de baixa fermentação foram superiores aos valores encontrados pela levedura de alta fermentação. Os valores encontrados foram elevados, estão acima dos valores permitidos pela legislação (30 µg/L de amostra).

Tabela 18 – Médias e desvio padrão do composto carbamato de etila para as 2 linhagens de levedura e as diferentes fontes e concentrações de nitrogênio na cerveja.

Leveduras e Concentrações e Fontes de N <sub>2</sub>	Carbamato de Etila	
	Média (µg/L)	Desvio padrão
Saflager w-3470	41,4	1,4
Safbrew S-33	15,3	0,6
0 g/L	38,9	1,7
5 g/L	46,2	1,4
25g/L	47,6	1,3
Sulfato amônio	42,1	1,4
Pool de aminoácidos	46,4	1,6

#### 4.6. Resultados das análises de compostos voláteis em vinho por cromatografia gasosa

A Figura 1 representa um cromatograma típico das amostras de vinho obtido nas condições cromatográficas previamente descritas.



**Figura 1 – Cromatograma típico das amostras de vinho.**

(1) acetaldeído, (2) acetato de etila, (3) metanol, (4) etanol, (5) 1-propanol, (6) 1-butanol, (7) isobutílico, (8) isoamílico, (9) ácido acético (10) carbamato de etila.

#### 4.6.1. Influência de duas linhagens de levedura e da adição nitrogenada na formação do acetaldeído e do acetato de etila em vinho

Tabela 1 - Resumo da análise de variância da concentração do acetato de etila nas amostras de vinho com as fontes de variação.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Levedura	1	2154743,3 n.s.
Concentração	2	5652452,3 n.s.
Levedura * Concentração	2	318780,7 n.s.
Resíduo	6	6530,2

\*significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Tabela 2 - Resumo da análise de variância da concentração do acetaldeído nas amostras de vinho com as fontes de variação.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Levedura	1	10235,5 n.s.
Concentração	2	5369,9 n.s.
Levedura * Concentração	2	5182,4 n.s.
Resíduo	6	20090,1

\* significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Nestes compostos nem uma fonte de variação foi significativa (Tabelas 1 e 2, respectivamente). Os valores de média e desvio padrão destes compostos estão representados na Tabela 3.

Tabela 3 – Médias e desvio padrão dos compostos acetaldeído e acetato de etila para as 2 linhagens de levedura e as diferentes concentrações de sulfato de amônio em vinho.

Leveduras e Concentrações de N <sub>2</sub>	Acetaldeído		Acetato de etila	
	Média (mg/L)	Desvio padrão	Média (mg/L)	Desvio padrão
Saflager w- 3470	1690,4	54,7	95,1	9,4
Safbrew S-33	2537,9	55,4	36,7	8,6
0 g/L	1287,6	13,4	37,5	9,8
5 g/L	1578,5	30,6	52,9	8,6
25g/L	3776,5	24,9	107,3	7,9

#### 4.6.2. Influência de duas linhagens de levedura e da adição nitrogenada na formação do metanol e do ácido acético em vinho

Tabela 4 - Resumo da análise de variância da concentração do metanol nas amostras de vinho com as fontes de variação.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Levedura	1	18045,6 n.s.
Concentração	2	31651,7 n.s.
Levedura * Concentração	2	2553,1 n.s.
Resíduo	6	6601,9

\*significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Os valores do metanol nas amostras de vinho não foram influenciados por nenhuma das fontes de variação (Tabela 4). Os valores de média e desvio padrão do metanol e do ácido acético estão representados na Tabela 5.

Tabela 5 – Médias e desvio padrão dos compostos metanol, ácido acético para as 2 linhagens de levedura e as diferentes concentrações de sulfato de amônio em vinho.

Leveduras e Concentrações de N <sub>2</sub>	Metanol		Ácido acético	
	Média (mg/L)	Desvio padrão	Média (mg/L)	Desvio padrão
Saflager w-3470	176,6	52,3	124,1	6,8
Safbrev S-33	99,1	39,9	106,9	2,4
0 g/L	53,2	3,7	134,9	2,9
5 g/L	93,3	16,9	111,0	0,4
25g/L	267,0	20,2	100,6	6,2

#### 4.6.3. Influência de duas linhagens de levedura e da adição nitrogenada na formação dos compostos 1-propanol, isobutílico e isoamílico no vinho

Tabela 6 - Resumo da análise de variância da concentração do 1- propanol nas amostras de vinho com as fontes de variação.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Levedura	1	8,6 n.s.
Concentração	2	116,2 *
Levedura * Concentração	2	0,4 n.s.
Resíduo	6	2,0

\* significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

No composto **1- propanol** a concentração da fonte de nitrogênio (sulfato de amônio) foi significativa (Tabela 6). Os valores de média e desvio padrão deste composto estão representados na Tabela 9. Ocorreu uma maior formação do 1-propanol com o aumento das concentrações de sulfato de amônio (Figura 2).

Tabela 7- Resumo da análise de variância da concentração do álcool isobutílico nas amostras de vinho com as fontes de variação.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Levedura	1	149,8 *
Concentração	2	483,6 *
Levedura * Concentração	2	15,0 n.s.
Resíduo	6	9,8

\* significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Os valores do **álcool isobutílico** nas amostras de vinho foram influenciados pela linhagem de levedura e pela concentração do sulfato de amônio. Ocorreu um aumento nos valores do isobutílico com o aumento da concentração do sulfato de amônio, representado pela Figura 3. A linhagem de levedura de alta fermentação foi responsável pela produção das concentrações mais levadas do álcool isobutílico nas amostras de vinho (Tabela 10). A produção destes álcoois durante a fermentação alcoólica é influenciada principalmente pelas condições do meio, entre elas, a concentração de açúcares, o pH, o

conteúdo e a fonte de nitrogênio disponível, a temperatura de fermentação, a aeração e a linhagem de levedura.

A interação entre as linhagens de levedura e a concentração de sulfato de amônio influenciou de maneira significativa a produção de **álcool isoamílico** (Tabela 8).

Tabela 8- Resumo da análise de variância da concentração do álcool isoamílico nas amostras de vinho com as fontes de variação.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>
Levedura	1	7342,9 *
Concentração	2	4957,5 *
Levedura * Concentração	2	9390,1 *
Resíduo	6	711,7

\* significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Os valores de média e desvio padrão do álcool isoamílico estão representados na Tabela 9. Houve um aumento nos valores do isoamílico na presença da levedura de baixa fermentação, com o aumento na concentração do sulfato de amônio (Figura 4).

Tabela 9 - Médias e desvio padrão dos compostos 1-propanol, isobutílico e isoamílico para as 2 linhagens de levedura e as diferentes concentrações de sulfato de amônio (fonte de nitrogênio) em vinho.

<b>Leveduras e Concentrações de N<sub>2</sub></b>	<b>1-propanol</b>		<b>Isobutílico</b>		<b>Isoamílico</b>	
	Média (mg/L)	Desvio padrão	Média (mg/L)	Desvio padrão	Média (mg/L)	Desvio padrão
Saflager w-3470	16,5	4,8	30,9	11,0	134,1	8,7
Safbrew S-33	14,8	9,1	23,9	9,4	183,5	4,9
0 g/L	11,3	1,1	19,4	2,8	185,8	2,7
5 g/L	13,8	1,5	22,9	5,7	119,0	1,5
25g/L	21,7	1,9	39,9	6,2	171,6	2,7

Tabela 10 - Comparação das diferentes linhagens de levedura para o álcool isobutílico no vinho.

Linhagens de levedura	Médias (mg/L)
Safbrew (alta fermentação)	30,9 a
Saflager (baixa fermentação)	23,9 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

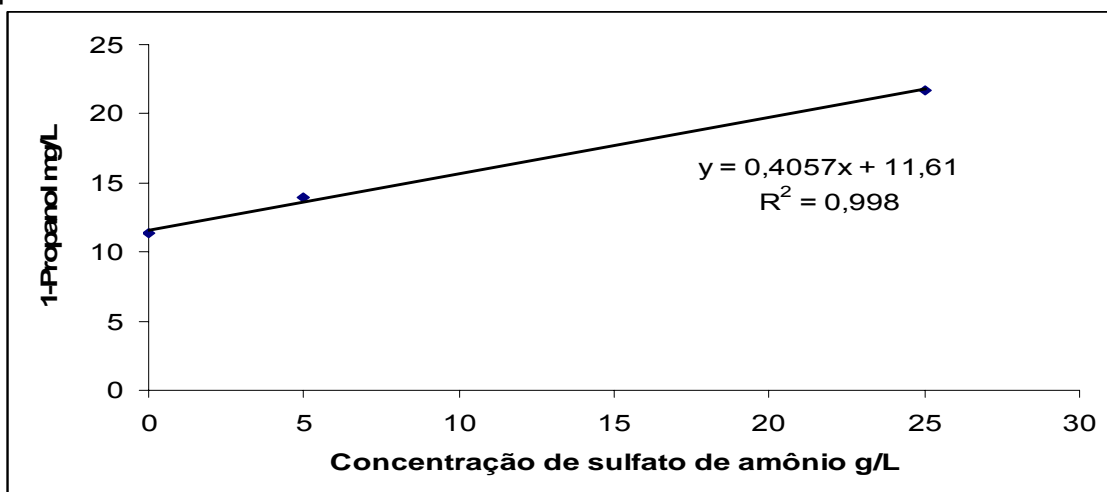


Figura 2 - Representação da concentração de 1-propanol em diferentes concentrações de sulfato de amônio.

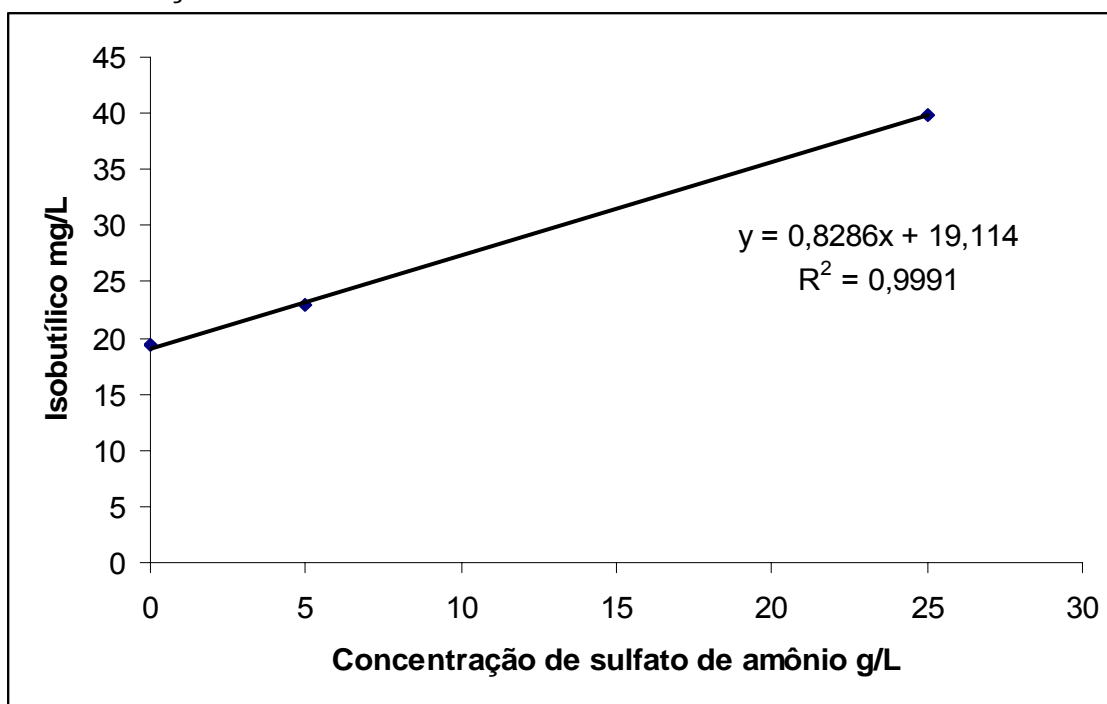
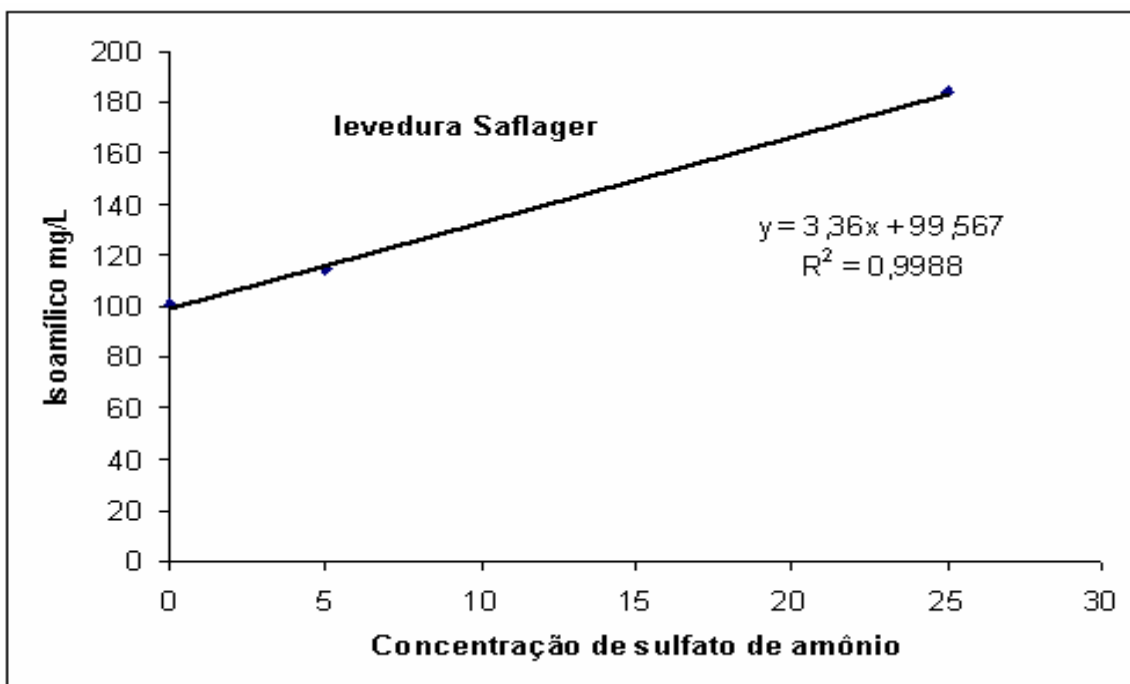


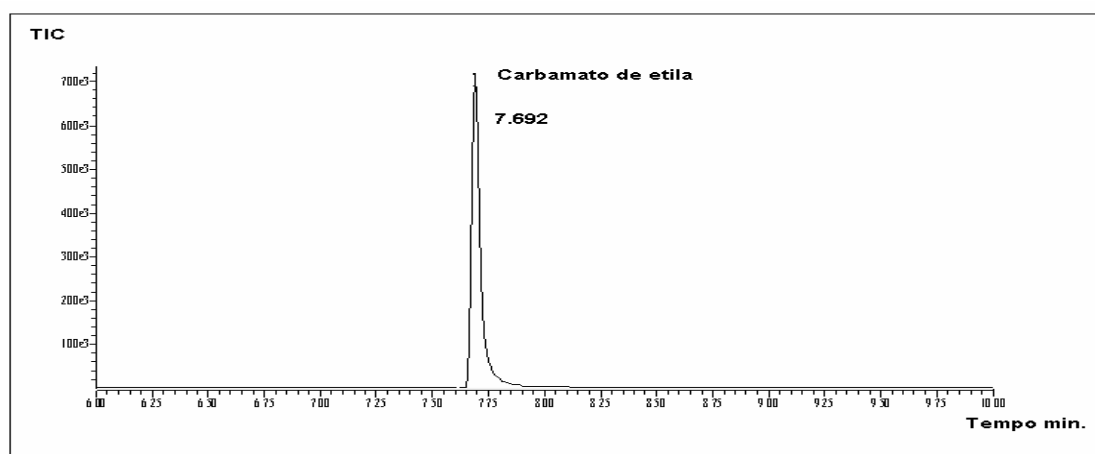
Figura 3- Representação da concentração do álcool isobutílico em diferentes concentrações de sulfato de amônio.



**Figura 4-** Representação da concentração de álcool isoamílico em diferentes concentrações de sulfato de amônio com a levedura Saflager.

#### 4.6.4. Influência de duas linhagens de levedura e da adição nitrogenada na formação do carbamato de etila em vinho

A Figura 5 representa um cromatograma típico do padrão do carbamato de etila encontrado nas amostras de vinho.



**Figura 5 -** Cromatograma típico do padrão externo do carbamato de etila usado na confirmação de sua presença nas amostras de vinho.

A presença do carbamato de etila nas amostras de vinho foi confirmada em um cromatógrafo gasoso acoplado com espectrometria de massa. O método utilizado foi o do padrão externo com monitoramento seletivo de íons (MSI) em que foram monitorados os íons m/z 62, 74 e 89.

Tabela 11 - Resumo da análise de variância da concentração do carbamato de etila nas amostras de vinho com as fontes de variação.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Levedura	1	371,6 n.s.
Concentração	2	1045,7 *
Levedura * Concentração	2	49,9 n.s.
Resíduo	6	135,5

\* significativo n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Os valores de **carbamato de etila** (média e desvio padrão) encontrados no vinho encontram-se na Tabela 12. A concentração do sulfato de amônio influenciou de maneira significativa a sua formação (Tabela 11). Os valores do carbamato de etila aumentaram com o aumento da concentração da fonte de nitrogênio (Figura 5). A adição de sulfato de amônio em concentrações elevadas em reação com o etanol induziu uma maior formação do carbamato de etila, o sulfato de amônio é um agente precursor na formação do carbamato de etila em bebidas alcoólicas. Nas amostras de vinho analisadas neste experimento a levedura de baixa fermentação produziu um valor superior ao da de alta fermentação, em média estes valores foram superiores aos valores permitidos pela legislação (30µg/L de amostra).

Tabela 12 – Médias e desvio padrão do carbamato de etila para as 2 linhagens de levedura e as diferentes concentrações de sulfato de amônio (fonte de nitrogênio) no vinho

Leveduras e Concentrações de N <sub>2</sub>	Carbamato de etila	
	Média (µg/L)	Desvio padrão
Saflager w-3470	45,0	4,5
Safbrew S-33	33,9	9,7
0 g/L	25,0	6,8
5 g/L	36,5	4,4
25g/L	56,9	3,1

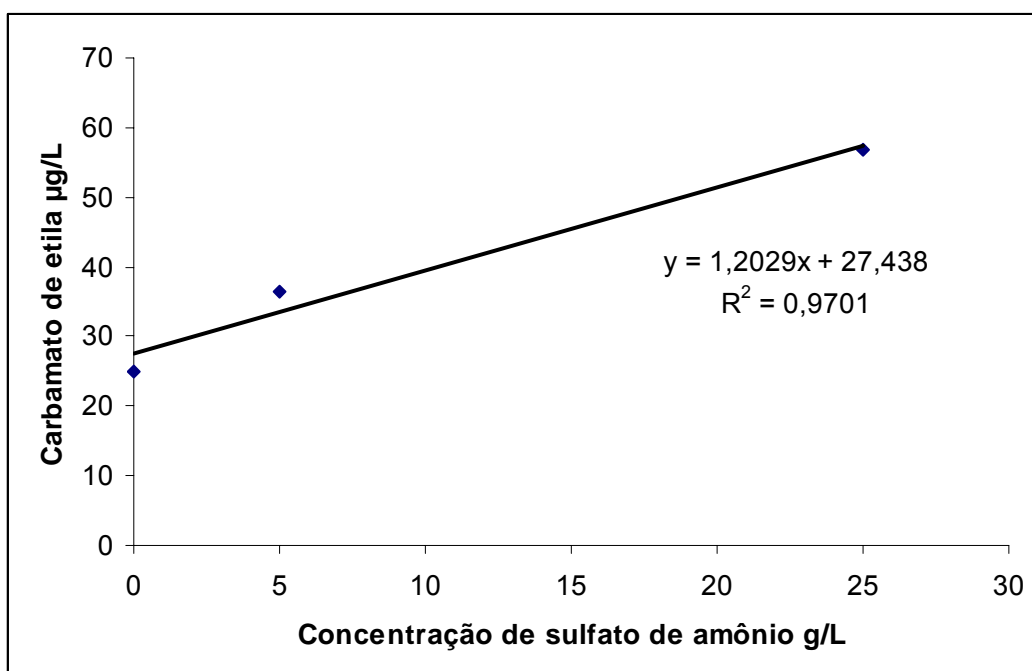


Figura 5 - Representação da concentração do carbamato de etila em diferentes concentrações de sulfato de amônio.

#### 4.6.5. Influência de duas linhagens de levedura e da adição nitrogenada na formação do 1-butanol em vinho

Tabela 13 - Resumo da análise de variância da concentração do 1-butanol nas amostras de vinho com as fontes de variação.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Levedura	1	3,8 *
Concentração	2	2,4 *
Levedura * Concentração	2	0,6 *
Resíduo	6	0,1

\* significativo e n.s. não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Os valores de média e desvio padrão de 1-butanol encontrados nas amostras de vinho estão representados na Tabela 14. A interação entre as linhagens de levedura e as concentrações de sulfato de amônio foi significativa para os valores de 1-butanol (Tabela 13). As duas linhagens de levedura produziram um aumento nos valores do 1-butanol, com o aumento das concentrações do sulfato de amônio, sendo que na linhagem de alta fermentação, os valores de 1-butanol foram superiores. Estes valores estão representados na Figura 6. O 1-butanol é um contaminante orgânico em vinho e sua presença é indesejável, sobretudo em valores elevados como os encontrados nas amostras deste experimento na presença da levedura de alta fermentação.

Tabela 14 – Médias e desvio padrão do 1-butanol para as 2 linhagens de levedura e as diferentes concentrações de sulfato de amônio (fonte de nitrogênio) no vinho

Leveduras e Concentrações de N <sub>2</sub>	1-Butanol	
	Média (mg/L)	Desvio padrão
Saflager w-3470	0,9	0,4
Safbrew S-33	2,1	1,0
0 g/L	0,8	1,5
5 g/L	1,5	0,9
25g/L	2,3	0,1

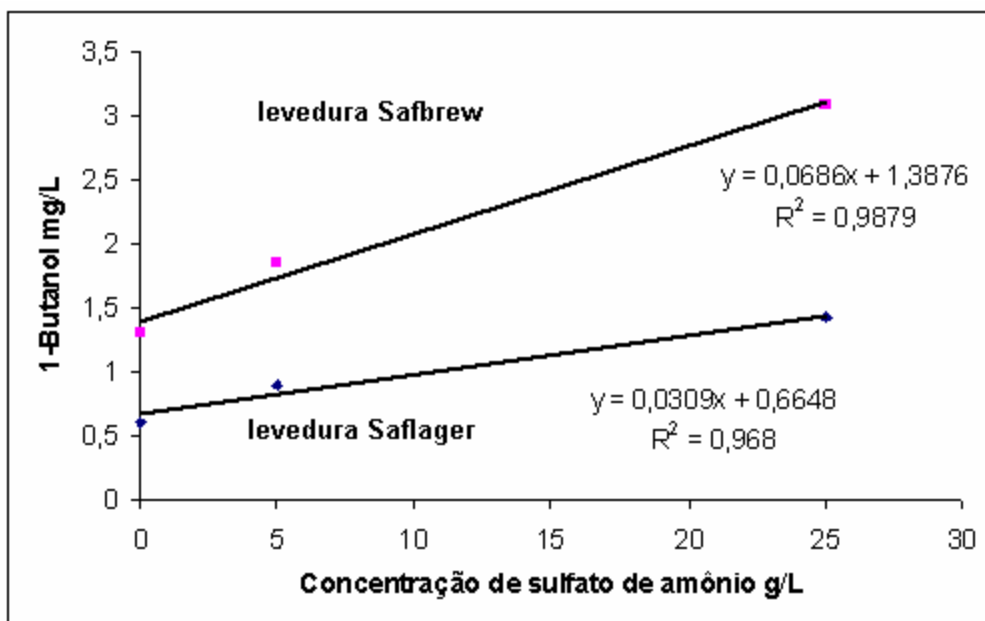


Figura 6 - Representação da concentração do 1-butanol em diferentes concentrações de sulfato de amônio com as leveduras Saflager e Safbrew.

## 5. CONCLUSÕES

O maior rendimento da fermentação alcoólica, estimado pela maior produção de etanol por consumo de substrato foi obtido pela linhagem de levedura de baixa fermentação na fonte de nitrogênio sulfato de amônio, na concentração de 5 g/L, nos mostos de cachaça, cerveja e vinho. As faixas médias de concentração final de etanol nos mostos foram 7,7 °GL em cachaça, 4,8 °GL em cerveja e 14,6 °GL em vinho.

Com relação à produção de compostos voláteis e contaminantes orgânicos nas amostras de cachaça, os álcoois superiores, 1-propanol, álcool isobutílico e álcool isoamílico tiveram comportamentos diferentes para as duas linhagens de levedura, para as três fontes de nitrogênio e para as três concentrações de nitrogênio. A adição de 5 g/L das fontes nitrogenadas já foi suficiente para elevar muito as concentrações dos álcoois superiores nas amostras. Com a adição de 5 g/L e 25 g/L das fontes nitrogenadas os valores de carbamato de etila foram superiores aos limites permitidos pela legislação. A linhagem de levedura de alta fermentação influenciou uma maior produção de carbamato de etila. O sulfato de amônio foi a fonte nitrogenada responsável pela maior concentração do carbamato de etila nas amostras de cachaça.

Nas amostras de cerveja os compostos 1-propanol e álcool isobutílico tiveram seus valores elevados com a adição do sulfato de amônio. Já o álcool isoamílico atingiu valores mais elevados com a adição do *pool* de aminoácidos. A levedura de alta fermentação induziu maior produção de álcool isobutílico e de álcool isoamílico. Já a levedura de baixa fermentação induziu uma maior produção de 1-propanol. As concentrações de carbamato de etila nas amostras de cerveja foram muito superiores na baixa fermentação com valores de 41,0 µg/L de amostra, valor acima do estipulado pela legislação de 30,0 µg/L de amostra. Já na alta fermentação estes valores foram em média bem menores (15,3 µg/L de amostra). A fonte de nitrogênio fornecida pelo *pool* de aminoácidos gerou uma maior produção de carbamato de etila do que o sulfato de amônio nas amostras de cerveja.

Nas amostras de vinho, o 1-propanol e o álcool isobutílico tiveram seus valores elevados com o aumento da concentração do sulfato de amônio. Os

valores do álcool isoamílico foram superiores na alta fermentação, porém não foi influenciado pelo aumento da concentração da fonte nitrogenada (sulfato de amônio). Os valores de carbamato de etila nas amostras de vinho aumentaram com o aumento da concentração da fonte nitrogenada (sulfato de amônio). A média de carbamato de etila na concentração de 5 g/L de sulfato de amônio foi de 36,5 µg/L de amostra e na concentração de 25 g/L de sulfato de amônio foi de 56,9 µg/L de amostra, valores estes superiores aos admitidos em vinhos 30,0 µg/L de amostra. A levedura de baixa fermentação induziu uma maior formação do carbamato de etila, com média de 45,0 µg/L de amostra; já a levedura de alta fermentação induziu a produção de um valor menor, com média de 33,9 µg/L de amostra.

Os valores do carbamato de etila aumentaram com o aumento das fontes nitrogenadas nas amostras de cachaça, cerveja e vinho. Nas amostras de cerveja e vinho os valores mais elevados de carbamato de etila foram formados durante a baixa fermentação, enquanto que nas amostras de cachaça estes valores foram superiores na alta fermentação.

A etapa de fermentação para a produção de bebidas alcoólicas é de fundamental importância. Ficou evidente que a produção dos compostos responsáveis pelo aroma e sabor das bebidas é influenciada pela linhagem da levedura, pela concentração e fonte nitrogenada eventualmente utilizada para enriquecimento do meio. O controle de todas as variáveis do processo de fermentação alcoólica é necessário para a produção de bebidas alcoólicas de alta qualidade e seguras para o consumo.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRABE. A cachaça. Texto retirado do site: <http://www.abrabe.org.br/cachaca.php> acesso em 31/01/2006.

ANDRIETTA, S. R.; MIGLIARI, P. C.; ANDRIETTA, M. G. S. Classificação das cepas de levedura de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa. STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos, v. 17, n. 5, p. 54-59, 1999.

AQUARONE, E.; LIMA, U.A; BORZANI, W. - BIOTECNOLOGIA Alimentos e bebidas produzidos por fermentação Ed. EDGARD BLUCHER Ltda. São Paulo, Vol. 5, p. 59, 2001.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists ( method 920.47) Arlington: A.O.A.C., chapter 26 p.6, 1995.

AYLOTT, R.; COCHRANE, 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. 96, 213-221, 1990.

BATTAGLIA, R.; CONACHER, H.B.S.; PAGE, B.D. Ethyl carbamate (urethane) in alcoholic beverages and foods: review. Food Addit. Contam. 7(4), 477-496, 1990.

BASSO, L. C. ; ALVES, D. M. G. ;AMORIM, H. V. ; Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo. In: AMORIM, H. V. Processos de produção de álcool: controle e monitoramento. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, cap. 4, p.38-85, 1996.

BASSO, L. C. ; OLIVEIRA, A. J. ; ORELLI, V. F. S. M. ; CAMPOS, A. A. ; GALLO, C. R. ; AMORIM, H. V. Dominância de leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliadas pela técnica de cariotipagem. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 5, 1993, Águas de São Pedro. Anais. Piracicaba: STAB, p. 245-250, 1993.

BENASSI, M. de T. Metodologia analítica para avaliação de parâmetros físico-químicos e sensoriais de qualidade em vinhos Riesling Itálico nacionais. (Tese – Doutorado em Ciência de Alimentos) - UNICAMP, 1997. 150p. Campinas, 1997.

BOIDO E., LORET A., MEDINA K., FARIFLA L., CRRAU F., VEMINI G., DELACASSA E. J. Agric. Food Chem. 51- 5408-5433, 2003.

BOSCOLO, M. Caramelo e carbamato de etila em aguardente de cana: ocorrência e quantificação. Tese (doutor em química analítica) IQSC – Instituto de Química de São Carlos. 100 p, São Carlos, 2002.

BOULTON, R.B.; SINGLETON, V.L.; BISSON, L.F.; KUNKEE, R.E. Principles and practices of winemaking. 604,1996.

BRASIL, Decreto nº 4851, de 02 de outubro de 2003. Altera dispositivos do Regulamento aprovado pelo Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial, Brasília, 03 outubro 2003. Seção 1.

BRASIL, Instrução Normativa nº13, de 29 de junho de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial, Brasília, 30 de junho de 2005. Seção 1.

BRASIL, Leis, Decretos, etc, Portaria nº76, de 27 de nov. 86, do Ministério da Agricultura. Diário Oficial, Brasília, 03-12-86. Seção 1, p. 181.

BRASIL, Portaria n° 228 de 25 de outubro de 1988. Diário Oficial (República Federativa do Brasil). Brasília, v.126, n.207, p.20946-20950, 31 de out.1988. Seção1, pt.1.

BURDOCK, G.A; Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients. 4 ed. CRC Press. 2003.

BUTZKE, C.E.; BISSON, L.F. Ethyl carbamate, preventative action ,annual. UC Davis; Disponível em: <http://www.envtox.ucdavis.edu/cebs/TOXINS/urethane.htm>. Acesso em: 05 de maio de 2003.

CARDOSO, M. das G. Produção de aguardente de cana-de açúcar. 264p, Lavras: Ed. UFLA, 2001.

CARDOSO, M.G.; CAMPOS, G.A.; SILVA, R.A.; SANTOS, C.D.; PINTO, A.P.S.; SILVA, C.F.; Cachaça: Qualidade e Produção. Boletim Agropecuário da Universidade Federal de Lavras, Lavras, sem data.

COOK, R.; MCCAIG, N.; MCMILLAN, J. M. B.; LUMSDEN, W. B.; J. Ethyl carbamate in alcoholic beverages. Inst. Brew. 96, 233, 1990.

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. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.

DENNIS, M. J.; MASSEY, R.C.; GINN, R.; PARKER, I.; CREWS, C.; ZIMMERLI, B.; ZOLLER, O.; RHYN, P.; OSBORNE, B. The effect of azodicarbonamide concentrations on ethyl carbamate concentrations in bread and toast. Food Addit. Contam. 14, 95-100, 1997.

DENNIS, M. J.; HOWARTH, N.; MASSEY, R.C.; PARKER, I.; SCOTTER, M.; STARTIN, J. R. Method for the analysis of ethyl carbamate in alcoholic beverages by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.* 369, 193-198, 1986.

DOMINGUEZ, V. E. L. ; NELSON, D. L. ; MAIA, A. B. R. ; Influência do fubá e do farelo de arroz sobre a formação de produtos secundários da fermentação alcoólica. *STAB*, Piracicaba, v.15, n.4, p.28-31, 1997.

DUTRA, S. V. ; DAUDT, E. C. ; SOUZA, M. Aminoácidos livres e uréia durante a fermentação de mosto de chardonnay com diferentes leveduras. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* v.19, n.2, Campinas maio/ago. 1999.

EHRHARDT, P.; SASSEN. H. Fermentação. Vassouras: SENAI-dr/rj, 37, 1995.

FERREIRA, V.; AZANAR, M.; LÓPEZ, R.; CACHO, J. Quantitative Gás Chromatography – Olfatometry Carried Out. Different Dilutions Of Na Extract Key Qualitaty Spanish Aged Red Wines. *J. Agric. Chem.* 49, 4818-4824, 2001.

FICAGNA, E.; Influência Do Tempo De Maceração Na Composição Química Do Fermentado E Do Destilado De Pêssego [*Prunus persica* (L) Batsch], Cv. Chiripá. 2005, Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

FIELD, K.J.; LANG, C.M. Hazards of urethane (ethyl carbamate): a review of literature. *Lab. Anim.* 22, 3, 255-262, 1988.

FLAMINI R. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols.; 22(4): 218. *Mass Spec. Rev.* 2003.

GIUDICI, P. ; ZAMBONELLI, C. ; KUNKEE, R. E. Increased production of n-propanol in wine by yeast strains having an impaired ability to form hydrogen sulfide. *American Journal of Enology and Viticulture*, n.44, v.1p.17-21, 1993.

GOMES, J. C., Análise de alimentos, Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, DTA, 204 p, 2006.

GUTIERREZ, L. E. Produção de álcoois superiores por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação alcoólica. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v.50, n.3, p.464-472, 1993.

HENSCHKE, P. A. ;JIRANEK V. Yeast – Metabolism of nitrogen compounds. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. FLEET, G. H. ed. Suíça: Hardwood Academic Publishers, 510p, 1994.

Jerônimo, E. M. O Nitrogênio na fermentação alcoólica e sua influência na qualidade da cachaça. 2004. 119 p. Tese (doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

LAWRENCE, J. F.; Page, B. D.; Conacher, H. B. S.; *Adv. Environ. Sci. Technol.* 23-457, 1990.

LAUGEL, P.; BINDER, F.; GRIMM, P. Il carbamato d'etile nelle acquaviti di frutta. *Tecnol. Aliment.* 11(2), 33-38, 1988.

LELIS, V. G. Ocorrência de carbamato de etila e sua formação em cachaça de alambique e em aguardente de cana-de-açúcar. 2006. 66p. Tese (mestrado) – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFV, Viçosa, 2006.

LEHTONEN, M. ; JOUNELA-ERIKSSON, P. Volatile and non-volatile compounds in the flavor of alcoholic beverages. In: PIGGOTT, J. R. *Flavor of distilled beverages: Origin and Development*. Flórida: Verlag chemie International Inc. p. 64-78, 1983.

LIMA, U. de A. Aguardente In: AQUARONE, E. ; LIMA, U. de A.. ; BORZANI, W. Alimentos e bebidas produzidos por fermentação. São Paulo: Edgar Blucher, (Série Biotecnologia 5). 227p, 1983.

LONA, A.A. – Vinhos: degustação, elaboração e serviço. – 2ª edição – Ed. Porto Alegre – Porto Alegre, 1998.

MAMEDE, M.E.O; PASTORE, G.M.; Avaliação Da Produção Dos Compostos Majoritários da Fermentação De Mosto De Uva Por Leveduras isoladas Da Região Da “Serra Gaúcha” (Rs). Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 24(3): 453-458, 2004.

MANFROI, L.; Avaliação do processo fermentativo e da composição de vinho Merlot elaborado com diferentes espécies de *Saccharomyces*, *Oenococcus* e *Lactobacillus*. Tese de doutorado da Universidade Federal de Viçosa - UFV, 119p, 2002.

MACKENZIE, W.M.; CLYNE, H.; MACDONALD, L.S. Ethyl carbamate in grain based spirits. J. Inst. Brew. 96, 223-232, 1990.

MATSUDO, T.; AOKI, T.; ABE, K.; FUKUTA, N.; HIGUCHI, T .; SASAKI, M.; UCHIDA, K. Determination of ethyl carbamate in soy sauce and its possible precursor. J. Agric. Food Chem. 41 (3), 352-35, 1993.

MIRANDA, M.B.; Avaliação Físico-Química de Cachaças Comerciais e Estudo da Influência da Irradiação Sobre a Qualidade da Bebida em Tonéis de Carvalho. 2005, tese (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MORAIS, P. B.; C. A., LINARDI, V. R. ; PATARO, C. ; MAIA, A. B. R. A. Short communication: characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of brazilian sugar-cane

aguardente. Word Journal of Microbiology e Biotechnology, Oxford, v. 13, p. 241-243, 1997.

MORRIS, J.R.; MAIN, G.; THRELFALL, R. Fermentations: Problems, solutions and prevention>. Acesso em: 05 de maio de 2003.

MULLER, C.J.; FUGELSANG K.C. 3a, 6a-dimethylglycoluril, the product of the interaction of urea and diacetyl, as a source of post-bottling ethyl carbamate in Wines. Viticulture and Enology Research Center, May, 1996.

NAGATO, L.A.A.F. Análise de uretana em bebidas alcoólicas fermento-destiladas. São Paulo. Dissertação (mestre em tecnologia de alimentos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas. USP. 84p, 1995.

NAGATO, L. A. F., SILVA, O.A., YONAMINE, M.,PENTEADO, M. De V.C. Quantitation of ethyl carbamate (EC) by gas chromatography and mass spectrometric detection in distilled spirits. Alimentaria, Madrid, n. 311, p. 31-36, 2003.

NOUT, M.J.R. Fermented foods and food safety. Food Res. Int. 27, 291-298, 1994.

NYKANEN, L. NYKANEN, I. Rum flavor. In: PIGGOTT, J. R. Flavour of distilled beverages: Origin and Development. Flórida: Verlag Chemie International, INC., , p. 49-63, 1983.

OLIVEIRA, C.R.; GARÍGLIO, H.A.A.; RIBEIRO, M.M.; ALVARENGA, M.S.P.; MAIA, F.X.; Cachaça de Alambique – Manual de Boas Práticas Ambientais e de Produção. Convênio de Cooperação Técnica-SEAPA/SEMAD/AMPAQ/FEAM/IMA, 2005.

OLIVEIRA, E. S. Fermentação Alcoólica: produção industrial de etanol. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia/UFMG (Apostila). 24p, 1993.

OLIVEIRA, A. J. ; GALLO, C. R. ; ALCARDE, V. E. ; GODOY, A. ; AMORIM, H.V. In:AMORIN, H. V. Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar. Piracicaba: ESALQ/USP.22-24, 1996.

OUGH, C.S. Ethylcarbamate in fermented beverages and foods. I. Naturally occurring ethylcarbamate. J. Agric. Food Chem, 24, 323-328, 1976.

OUGH, C.S. Ethylcarbamate in fermented beverages and foods.II. Possible formation of ethylcarbamate from diethyl dicarbonate addition to Wine. . J. Agric. Food Chem, 24, 328-331, 1976.

PATARO, C. ; GOMES, F.C. O. ; ARAÚJO, R. A. C. ; ROSA, C. A. ; SCHWAN, R. F. ; CAMPOS, C. R. ; CLARET, A. S. ; CASTRO, H. A. de. Utilização de Leveduras selecionadas na fabricação de cachaça de alambique. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 37-43, 2002.

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. Tecnol. Aliment. 21(1), 179-182, 2001.

POTTER, N.H.; HOTCHKISS, J.H. – Ciencia de los Alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza, 1999.

PRIST, F.G.; CAMPBELL, I. Brewing microbiology. Segunda edição. London: Chapman & Hall. 306p, 1996.

REINOLD, M. R. Manual prático de cervejaria. São Paulo, 1 ed., 214p,1997.

RIBEIRO, F. J. ; LOPES, J. J. ; FERRARI, S. E. Complementação de nitrogênio de forma contínua no processo de fermentação alcoólica. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, v.1, n. 105, p. 26-30, 1987.

RIFFKIN, H.L.; WILSON, R.; BRINGHURST, T.A. The possible involvement of  $\text{Cu}^{++}$  peptide/protein complexes in the formation of ethyl carbamate. J. Inst Brew. 95 (2), 121-122, 1989.

SCHLATTER, J.; LUTZ, W. K. The carcinogenic potencial of ethyl carbamate. Food Chem. Toxicol.,205 p, 1990

SEBRAE. Estudo de Viabilidade Econômica – Simulação da Produção de 60 Mil Litros de Cachaça por Safra. Belo Horizonte, 2005.

SILVA, C. A. B. Produção de aguardente de cana. Viçosa: Fundação Arthur Bernades – FUNARBE, 36 p. (Série perfis Agroindustriais 4).1995.

SUOMALAINEN, H. ; LEHTONEN , M. The production of aroma compounds by yeast. Journal of the Institute of Brewing, London, n.85, p.149-156, 1979.

TEGMO-LARSSON, I.M.; SPITTLER, T.D. Inhibition by wine of tumorigenesis induced by ethyl carbamate formation in wine during storage. J. Food Sci. 55, 4, 1166-1167, 1169, 1990.

TERSCHURE, E. G., van RIEL, N. A. W., VERRIPS, C. T. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Rev., v.24, p. 67-83, 2000.

TEGMO-LARSSON, I.M.; SPITTLER, T.D. Inhibition by wine of tumorigenesis induced by ethyl carbamate formation in wine during storage. J. Food Sci. 55, 4, 1166-1167, 1169, 1990.

USSEGLIO-TOMASSET, L. Química enológica. Quarta edição. Madrid: Ediciones Mundi Prensa, 400p, 1998.

VARNAN, A.H.; SUTHERLAND, J.P. Acribia AS: Bebidas – Tecnología, química y microbiología. Espana: Spáin,. p.417-465, 1997.

VASCONCELOS, J. N. Influência da complementação de nutrientes nitrogenados e fosfatados sobre o processo de fermentação alcoólica industrial. Brasil Açucareiro, v.4,5 e 6, n. 105, p.41-48, 1987.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. A taxonomic key for the genus Saccharomyces. System. Appl. Microbiol., v. 16, n. 1, p. 113-119, 1993.

VOGT, E.; JKOB, L.; LEMPERLE, E.; WEISS, E. El vino: obtención, elaboración y análisis. Zaragoza: Edtoria ACRIBIA. 294p,1984.

YOKOTA, S.R.C.; Qualidade Sensorial e Físico-Química de Cachaças Envelhecidas em Recipientes de Carvalho e de Algumas Madeiras Brasileiras. Tese, 2002 (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

ZIETMAN, A.; VILJOEN, M.; VUUREN, H. Preventing ethyl carbamate formation in wine. Disponível em: <<http://www.wyhbber.co.za/recentarticles>>. Acesso em: 20 de março de 2003.

ZIMMERLO, B.; SCHLATTER, J. Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assesment. Mutation Res. Genetic Toxicol. 259, 325-350, 1991.