UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
ENGENHARIA AGROINDUSTRIAL AGROQUÍMICA

ESTUDO DE DIFERENTES PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE CACHAÇA E INFLUÊNCIA NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO PRODUTO

Ronan Ribeiro Costa Junior

2016

ESTUDO DE DIFERENTES PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE CACHAÇA E INFLUÊNCIA NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO PRODUTO

Ronan Ribeiro Costa Junior

Projeto de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Rio Grande, como parte dos requisitos necessários à Graduação em Engenharia Agroindustrial Agroquímica.

Orientadora: Profª. Drª. Fernanda Arnhold Pagnussatt
Co-orientador: Profº. Drº. Carlos R. M. Peixoto

Santo Antônio da Patrulha

2016

RESUMO

A cachaça se destaca por ser uma bebida tipicamente brasileira, sendo a segunda bebida alcoólica mais consumida no país e o terceiro destilado mais consumido no mundo. O objetivo deste trabalho foi estudar um processo biotecnológico para a produção de cachaça. Para isso, o processo foi conduzido no modo descontínuo e descontínuo alimentado, onde três formas de recuperação do mosto fermentado foram avaliadas, bem como a cinética do processo e as características físico-químicas dos destilados obtidos. O processo biotecnológico foi dividido em três etapas: 1) preparo do meio de cultivo e da levedura, 2) fermentação propriamente dita e 3) recuperação e destilação da cachaça. A cinética foi acompanhada através das análises de concentração de substrato e etanol, que permitiu a determinação do rendimento, eficiência e produtividade de ambos os processos fermentativos. Após a realização das três formas de recuperação para o processo descontínuo e descontínuo alimentado, a forma de recuperação escolhida foi o uso de mosto fermentado sem decantação antes da destilação. O sistema descontínuo apresentou valores quanto à produção de álcool de 45,26 g/L de mosto, produtividade 2,06 g/L.h, fator de conversão de substrato em produto 0,41 g/g e eficiência de 80%. Para o sistema descontínuo alimentado, a produção de álcool foi de 47,83 g/L de mosto, produtividade 2,17 g/L.h, fator de conversão de substrato em produto 0,41 g/g e eficiência de 80%. Todas as amostras de cachaça analisadas apresentaram valores de acidez volátil, álcoois superiores e aldeídos dentro dos parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira. A partir dos resultados obtidos, foi possível identificar que o processo descontínuo alimentado sem decantação pode ser utilizado para a produção de cachaça em diferentes escalas de produção.

PALAVRA CHAVE: destilado, processo descontínuo, processo descontínuo alimentado, decantação, cinética.

ABSTRACT

"Cachaça" is a typical Brazilian drink, the second most consumed alcoholic beverage in the country and the third most consumed distillate in the world. The presente work had the aim of studying a biotechnological process for the production of "cachaça". For this, two different processes, the simple batch and fed batch system was conducted, where three ways of recovering the fermented were evaluated. The process kinetics and the physicochemical characteristics of the obtained distillates were also studied. The biotechnological process was divided into three stages: 1) preparation of the culture medium and yeast, 2) fermentation and 3) recovery and distillation of "cachaça". The kinetics was monitored through the analysis of substrate concentration and ethanol, which allowed the determination of yield, efficiency and productivity of both fermentation processes. After the three forms of recovery were carried out for the batch and fed batch system, the chosen form of recovery was the use of fermented must without decanting before distillation. The simple batch system showed values for alcohol production of 45.26 g/L of fermented must, productivity 2.06 g/L.h, substrate conversion factor in product 0.41 g/g and efficiency of 80%. For the fed batch system, alcohol production was 47.83 g/L of fermented must, productivity 2.17 g/L.h, substrate conversion factor in product 0.41 g/g and efficiency of 80%. All the samples of "cachaça" analyzed presented values of acidity, higher alcohol formation and aldehydes within the parameters established by the Brazilian legislation. From the results obtained, it was possible to identify that the discontinuous process fed without decantation can be used for the production of "cachaça" at different production scales.

Keywords: distillate, batch process, fed batch process, decantation, kinetics.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 7
2. OBJETIVOS 8
2.2 Objetivo geral 8
2.3 Objetivos específicos 8
3. REFERENCIAL TEÓRICO 9
3.1 Cachaça 9
3.1.1 Breve histórico 9
3.2.2 Classificação e mercado da cachaça 9
3.2 Produção da cachaça 10
3.2.1 Preparo do mosto 11
3.2.2 Preparo do inóculo 13
3.2.3 Fermentação 14
3.2.4 Bioquímica da fermentação 14
3.2.4.1 Fermentação descontínua 16
3.2.4.2 Fermentação descontínua alimentada 16
3.2.5 Cinética do processo fermentativo 17
3.2.6 Recuperação do produto – destilação 18
3.3 Características físico-químicas da cachaça 19
3.3.1 Teor alcoólico 21
3.3.2 Teor de cobre 21
3.3.3 Acidez volátil 21
3.3.4 Aldeídos, ésteres totais e álcoois superiores 22
3.3.5 Furfural 23
4. METODOLOGIA 24
4.1 Matéria-prima e reagentes 24
4.2 Procedimentos experimentais 24
4.2.1 Preparo do Mosto 24
4.2.2 Preparo do inóculo 25
4.2.3 Produção de etanol 25
4.3 Parâmetros cinéticos durante o processo fermentativo 26
4.3.1 Determinação da concentração de açúcares 26
4.3.2 Graduação alcoólica do mosto fermentado 26

4.3.3 Produção de etanol na fermentação 27
4.3.4 Fator de conversão de substrato em produto (rendimento do processo) 27
4.3.5 Eficiência da fermentação 28
4.3.6 Produtividade (Q) 28
4.4 Recuperação do Etanol 28
4.5 Destilação 29
4.6 Análises físico-químicas dos destilados 29
4.6.1 Determinação da acidez volátil 29
4.6.2 Determinação de ésteres totais e álcoois superiores 30
4.6.3 Determinação do grau alcoólico 30
4.7 Análise estatística 30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 30
5.1 Processo descontínuo e descontínuo alimentado usando biorreator de 2,5L 31
5.1.1 Processo de fermentação 32
5.1.2 Análises físico-químicas da cachaça 38
5.1.2.1 Influência das operações de recuperação do mosto no tempo de destilação 38
5.1.2.2 Obtenção do teor alcoólico 40
5.1.2.3 Concentração de álcoois superiores e ésteres totais 41
5.2 Processo descontínuo e descontínuo alimentado usando biorreator de 4 litros 44
5.2.1 Processo de fermentação 44
5.2.2 Análises físico-químicas da cachaça 48
5.2.2.1 Obtenção do teor alcoólico 49
5.2.2.2 Concentração de álcoois superiores e ésteres totais 49
5.2.2.3 Acidez volátil 50
6. CONCLUSÕES 52
REFERÊNCIAS 53

1 INTRODUÇÃO

A cachaça vem se destacando no setor de bebidas destiladas pela crescente melhoria na qualidade do produto final, que fez com que esta bebida se transformasse no terceiro destilado mais consumido no mundo. Antigamente, a cachaça era consumida por classes sociais de menor poder econômico e atualmente vem ganhando espaço no mercado interno e externo, pelo fato de que as classes econômicas mais elevadas estão se tornando apreciadoras da bebida. Este produto, tipicamente brasileiro é obtido através da destilação do mosto fermentado de caldo de cana-de-açúcar, com graduação alcoólica de 38 a 48% em volume, a 20 °C (BRASIL, 2005a).

O processo de fabricação de cachaça artesanal é simples. No entanto, a bebida necessita de novos estudos em sua cadeia produtiva, para que assim possam surgir técnicas alternativas de processamento e o aperfeiçoamento dos produtores artesanais, gerando um maior controle de qualidade e de padronização da bebida, conforme a legislação vigente (MIRANDA et al., 2007).

Segundo o Centro Brasileiro de Referência da Cachaça (CBRC), o Brasil possui 40.000 produtores, sendo que destes, 70% produzem cachaça de coluna ou industrial e 30%, cachaça de alambique ou artesanal. Deste percentual, apenas 1% de toda produção anual é voltada para a exportação (CBRC, 2012). Uma das regiões produtoras de cachaça artesanal no Brasil é o município de Santo Antônio da Patrulha – RS. De origem açoriana, os produtores rurais gradativamente foram solidificando a agricultura familiar e impulsionando a economia da região com o cultivo de cana-de-açúcar e seus derivados.

Durante toda a cadeia produtiva da bebida, vários fatores podem afetar a qualidade do produto final, como por exemplo: matéria-prima, micro-organismo (levedura), nutrientes, formas de condução do processo e boas práticas de fabricação (BPF). Além disso, por ser desenvolvida em todo o território brasileiro, deve ser levada em consideração a biodiversidade das regiões produtoras, fazendo com que a bebida tenha características distintas quanto ao aroma e sabor (LIMA, 2001b).

Dessa forma, a proposta do trabalho foi estudar diferentes formas de condução do processo fermentativo, visando o aumento da produtividade, melhorar a qualidade e

obter um produto dentro dos padrões de comercialização estabelecidos pela legislação brasileira. Além disso, espera-se contribuir com os produtores agroindustriais da região de Santo Antônio da Patrulha – RS, agregando valor ao produto final típico da região e fornecendo alternativas para a maior valorização desta bebida.

2. OBJETIVOS

2.2 Objetivo geral

Avaliar um processo biotecnológico para a produção de cachaça.

2.3 Objetivos específicos

- Estudar diferentes formas de condução do processo de fermentação, sendo eles: descontínuo e descontínuo alimentado;
- Avaliar a cinética de ambos os processos de fermentação e suas respectivas formas de recuperação após o processo fermentativo, sendo elas: sem decantação, com decantação e, com decantação e centrifugação.
- Identificar o perfil de compostos químicos e requisitos de qualidade nos destilados obtidos por diferentes processos biotecnológicos.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Cachaça

3.1.1 Breve histórico

A história da produção da aguardente no Brasil teve início no período de 1538-1545, e era obtida inicialmente através da fermentação espontânea da borra separada do processo de concentração da garapa (denominada *cachaza*), produzindo assim, um líquido com cheiro e sabor diferente. Este líquido, submetido à destilação em pequenos alambiques de barro, originou a bebida transparente e ardente, conhecida como aguardente (MUTTON; MUTTON, 2001).

3.1.2 Classificação e mercado da cachaça

A cachaça é definida como sendo uma bebida exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38% a 48% em volume a 20 ºC, obtida pelo processo de destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, com características sensoriais típicas, podendo ser adicionada até 6 g/L de açúcares. Quando a concentração de açúcar for superior a 6 g/L e inferior a 30 g/L, a bebida é denominada cachaça adoçada (BRASIL, 2005a).

Quanto ao envelhecimento, a bebida pode ser classificada de três formas distintas, sendo elas: cachaça envelhecida, *premium* e extra *premium*. A diferença entre as três classificações está no volume a ser envelhecido e no tempo em que a bebida é deixada em contato com o recipiente em que é armazenada. Para todas as três classificações, a bebida deve ser envelhecida e armazenada em recipiente de madeira, com capacidade máxima de 700 litros.

Para ser chamada de cachaça envelhecida e cachaça *premium* é preciso que o período de armazenamento não seja inferior a um ano e que seus volumes de envelhecimento sejam de, no mínimo, 50% para a cachaça envelhecida e de 100% para a cachaça *premium*. Já a cachaça extra *premium* é envelhecida por um período não inferior a três anos, com 100% de seu volume envelhecido (BRASIL, 2005a).

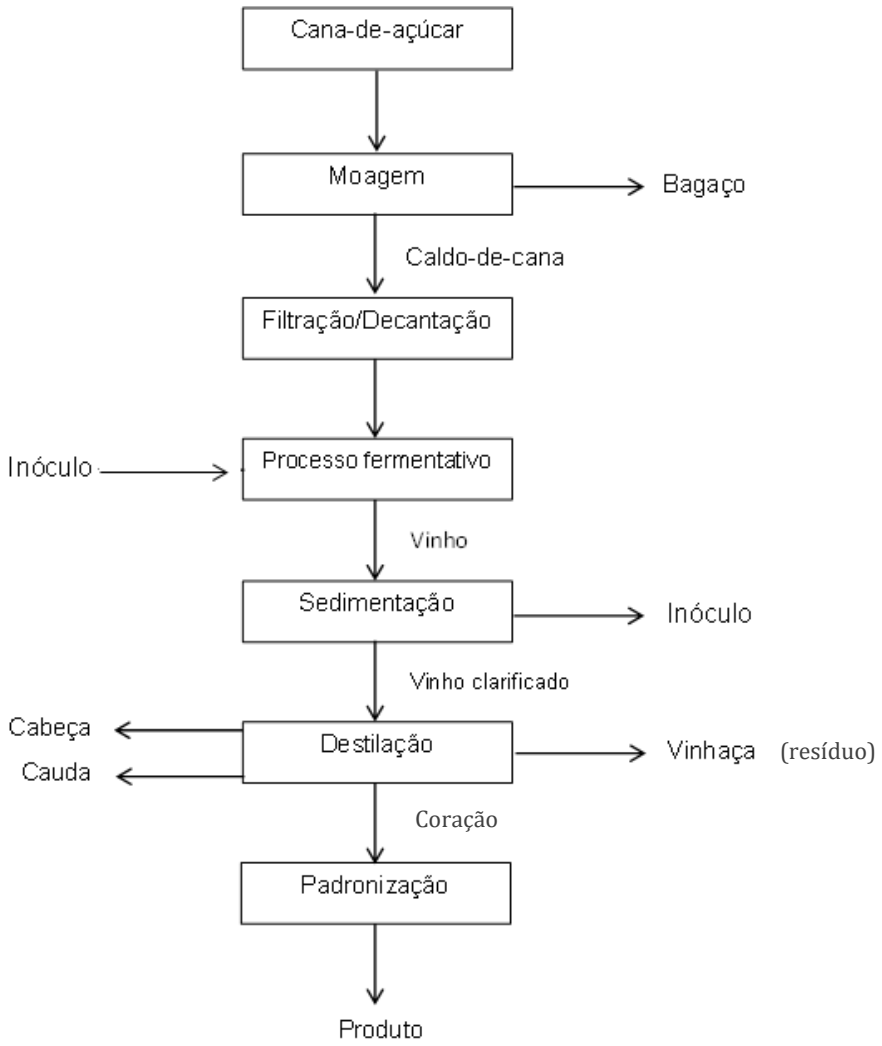
A cachaça vem se destacando a cada ano no mercado de bebidas alcoólicas, obtendo um crescimento internacional e um aumento de sua aceitabilidade pelas diversas classes sociais no Brasil. De acordo com a Associação Brasileira de Bebidas

(ABRABE, 2016), a cachaça é o terceiro maior destilado mais consumido no mundo e o segundo maior mercado de bebidas alcoólicas no Brasil, correspondendo a um volume de 50% do segmento no setor de destilado. No entanto, os produtores de cachaça artesanal, com mercado mais restrito, ainda precisam desenvolver alternativas para aumentar o valor agregado do produto desenvolvido ou criar um produto diferenciado, para que assim, possam competir com as grandes empresas produtoras desta bebida.

3.2 Produção da cachaça

O processo de fabricação da cachaça é demonstrado no fluxograma apresentado na Figura 1 e descrito a seguir.

Figura 1. Fluxograma do processo de produção de cachaça.



3.2.1 Preparo do mosto

A matéria-prima utilizada no processo de obtenção da cachaça é a cana-de-açúcar. Ao passar por um processo de moagem, se obtém o caldo de cana, que quando destinado a um processo fermentativo dá-se o nome de mosto. A agroindústria canavieira do Brasil nas últimas décadas tem buscado inovações tecnológicas para o setor, objetivando aumentar a produção, a qualidade e minimizar os custos. Para isso, é necessária a seleção dentre as variedades existentes, buscando obter aquelas que possam ser utilizadas na produção de cachaça de alambique (ANDRADE et al., 2002).

A obtenção de um canavial com alta qualidade necessita de fatores que estão interligados, como: genética da planta (variedade); meio ambiente (clima); condições físicas, químicas e biológicas do solo; controle de pragas e doenças; sistema de colheita, carregamento e transporte; dando assim características distintas à matéria-prima e possibilitando a obtenção de uma matéria-prima adequada do ponto de vista tecnológico e econômico (MUTTON; MUTTON, 2010).

Após a colheita da cana, algumas operações são de extrema necessidade para o preparo do mosto. Segundo Lopes (2007), Mutton e Mutton (2010) e Lima (2001a), as operações são:

- ✓ Corte e transporte da cana – nas pequenas unidades, o corte normalmente é realizado manualmente, rente ao solo e os operadores devem utilizar EPIs (óculos de proteção, luvas, botas, perneira de proteção). Quanto ao seu transporte, a cana deve ser transportada até o setor de moagem o mais rápido possível, não ultrapassando 24 horas entre o corte e a moagem, pois a demora no transporte da cana cortada, principalmente nos períodos úmidos e quentes, intensifica a perda de açúcares, desfavorecendo o processo fermentativo;
- ✓ Recepção e armazenamento da cana – A moagem da matéria-prima deve ocorrer diariamente, com isso, a agroindústria deve ter o corte programado, em quantidade de acordo com a necessidade e capacidade de moagem e fermentação. Em relação às áreas de estocagem da matéria prima do engenho e de fermentação, estas devem ser cobertas, possuir piso impermeável e serem mantidas limpas, controlando a assepsia dos equipamentos, evitando o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis ao processo. É necessário que ocorra a lavagem com água abundante e com uma solução de hipoclorito de sódio (água sanitária) diluída em água a 0,02 até 0,5%;

- ✓ Preparo da cana para moagem – A matéria-prima destinada para a produção da cachaça deve estar limpa, retirando o máximo possível suas impurezas vegetais e minerais (poeira, terra e excesso de cera), objetivando uma maior eficiência de moagem e de fermentação;
- ✓ Moagem – A extração do caldo é uma das etapas mais importantes da cadeia produtiva da bebida, podendo alterar drasticamente o rendimento do processo. A cana-de-açúcar é constituída basicamente de caldo e fibras (casca e nós – contendo 15% de caldo, medula – contendo 85% de caldo), sendo que, o substrato (açúcar) é o fator mais desejável para a etapa de fermentação;
- ✓ Filtração – Etapa realizada para retirar as impurezas grosseiras do caldo, como terra e bagacilho, oriundos do processo de moagem;
- ✓ Decantação – Após a etapa de filtração, o caldo passa por um decantador, com o objetivo de retirar partículas leves (espumas e bagacilho, fuligens e outros) e pesadas (terra);
- ✓ Ajuste da concentração de açúcares (ºBrix) – O caldo agora denominado mosto, deve conter concentrações ideais de açúcares para o processo fermentativo, evitando o máximo à ocorrência de inibição da levedura, podendo acarretar uma baixa eficiência de conversão de substrato em produto e a formação de congêneres. Geralmente, a concentração de açúcares (°Brix) do mosto logo após a etapa de moagem é em torno de 14 a 22 °Brix. A fermentação ideal ocorre com mosto na concentração de açúcares entre 14 e 16°Brix. Dessa forma, mosto com teor de açúcar acima de 16 °Brix precisam ser diluídos com água, para garantir a estabilidade da levedura no meio fermentativo;
- ✓ Correções do mosto – A correção do mosto é de extrema importância para o meio fermentativo, obtendo-se um melhor desempenho do micro-organismo devido a sua nutrição adequada e consequentemente ocasionando uma maior eficiência de produtividade. A correção do mosto oferece à levedura condições de nutrição que normalmente não se encontram no caldo no seu estado natural, sendo estes fosfatos, sais de amônio e vitaminas. Além do ajuste da concentração de açúcares e da adição de nutrientes, adicionam-se também, antibióticos ou antissépticos para inibir o crescimento de bactérias contaminantes como dos gêneros *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Leuconostoc* e realiza-se o ajuste da temperatura. Outro fator importante é a correção do pH para a faixa entre 4 a 5, condições ótimas para o meio reacional. Após as correções necessárias, o mosto estará pronto para ser inoculado com levedura e posteriormente iniciar a produção de etanol.

3.2.2 Preparo do inóculo

A escolha da levedura adequada é um dos principais fatores a serem considerados durante o processo de fabricação de bebidas alcoólicas (PATARO et al, 2002). Segundo PATARO et al. (2000), na fabricação de aguardentes geralmente são utilizada as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo estas predominantes nas fermentações espontâneas. Essa levedura é considerada resistente a altas concentrações de etanol, elevadas temperaturas e baixos teores de pH; características necessárias durante o processo de produção da cachaça (MENDEZ et al., 2013).

A propagação da levedura, preparo do pé-de-cuba ou preparo do inóculo é de extrema importância para o desenvolvimento do processo fermentativo, tolerância aos constituintes presentes no meio, fator de conversão de substrato em produto e na produção de compostos desejáveis à bebida. É neste momento que inicia o crescimento celular do micro-organismo, caracterizando assim a fase de adaptação ao meio ou fase preliminar. Durante esse período de multiplicação celular, a alimentação do mosto deve ser lenta e com teores de açúcares (°Brix) menores, sendo esta, aumentada gradativamente até que seja atingido o volume suficiente para conduzir a fermentação de forma eficiente. Esse cuidado é necessário, pois a rápida adição do mosto e altos teores de açúcares poderão acarretar a inibição da levedura, levando a baixos rendimentos e o aparecimento de contaminantes no meio (MUTTON; MUTTON, 2010).

A escolha adequada da levedura depende diretamente das características do mosto quanto à composição de nutrientes, condições do processo e do produto que se deseja obter. Além destes aspectos, outros agentes devem ser avaliados também, como: O_2, temperatura, reação do meio, ação dos antissépticos e produtos formados durante o processo fermentativo (LIMA, 2001b).

Nas pequenas propriedades produtoras de aguardente, o processo fermentativo ocorre com o uso de micro-organismos selvagens, oriundos do próprio caldo de açúcar. Já as cachaçarias de médio e grande porte, utilizam leveduras de panificação encontradas no comércio sob forma úmida e prensada, ou seca e granulada (LIMA, 2001a). Atualmente, diversos trabalhos na área tem procurado encontrar linhagens mais apropriadas para a produção de cachaça, permitindo uma otimização do processo, aumento de sua capacidade de conversão de substrato em produto, aceleração de

multiplicação celular e melhoria da qualidade da bebida, principalmente em relação aos teores de acidez e concentrações de álcoois superiores, desejando-se produções específicas quanto ao perfil sensorial da cachaça (SOARES; SILVA; SCHWAN, 2011).

3.2.3 Fermentação

A fermentação é a principal etapa do processo de produção da cachaça, conduzida em biorreatores do tipo tanque e em diferentes formas de condução, sendo os mais utilizados nas agroindústrias o modo descontínuo ou descontínuo alimentado.

O substrato (sacarose) presente no mosto é transformado em etanol, CO_2 e outros produtos que são responsáveis pela qualidade do produto, através da ação de leveduras, podendo ser afetada por vários fatores como, por exemplo, químicos (açúcar, oxigênio, pH, minerais, vitaminas), físicos (temperatura, agitação) e biológicos (bactérias contaminantes e leveduras selvagens) (TONIATO, 2013).

O processo fermentativo é dividido em três etapas, sendo elas: fermentação preliminar; fermentação principal e fermentação complementar. Na fermentação preliminar, o consumo de substrato resulta na multiplicação da levedura, não tendo a produção de álcool, e liberação de CO_2, mas tem uma pequena elevação da temperatura. Nessa etapa é necessário estabelecer o tempo de adaptação da levedura ao meio (MUTTON; MUTTON, 2010; DE SOUZA; MONTEIRO, 2011).

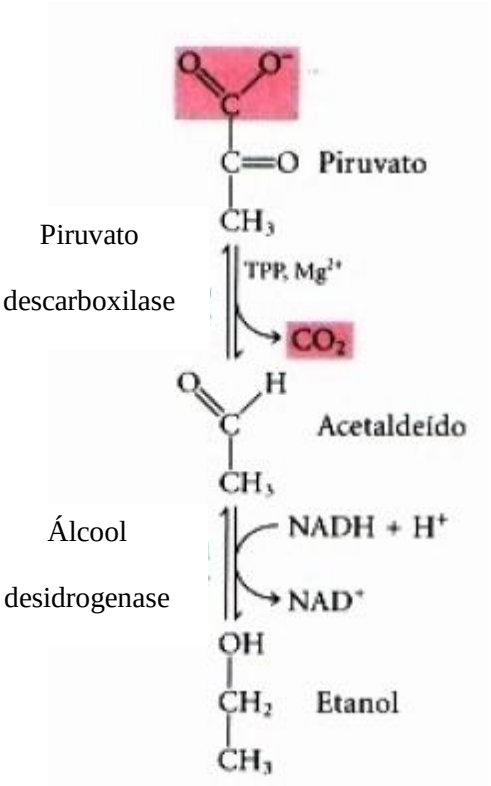
Durante a etapa principal, ocorre um grande aumento da produção de álcool, desprendimento de CO_2 e elevação rápida da temperatura e da concentração dos ácidos, tendo formação de espumas e diminuição da densidade do mosto, pela transformação dos substratos em álcool e outros compostos. Na última etapa, o substrato já está praticamente consumido, ocorrendo um aumento da acidez, redução do crescimento celular, da temperatura e do dióxido de carbono. Também ocorre decantação da levedura no biorreator e ao final do processo, é possível obter um vinho com composição entre 8 a 12% de álcool (DE SOUZA; MONTEIRO, 2011; SILVA, 2008).

3.2.4 Bioquímica da fermentação

A bioquímica da fermentação alcoólica é realizada através da ação de leveduras e outros micro-organismos, onde o substrato (glicose) é convertido em etanol e CO_2 em

condições anaeróbias. Através da via glicolítica, uma molécula de glicose é oxidada, dando origem a duas moléculas de piruvato. Após a realização dessa via metabólica comum a muitos organismos, uma das alternativas será a conversão do piruvato em etanol e CO_2 em um processo dividido em duas etapas, conforme a Figura 2 (NELSON; COX, 2011).

Figura 2. Conversão de piruvato em etanol



Fonte: NELSON; COX, 2011.

De uma forma simplificada, a primeira etapa é a transformação do piruvato em acetaldeído, onde o piruvato é descarboxilado por uma reação irreversível e catalisada pela piruvato-descarboxilase, enzima presente na levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), através de uma reação simples e que não envolve a oxidação do piruvato. Já na segunda etapa, o acetaldeído, pela ação da álcool-desidrogenase (presente em organismos que metabolizam etanol) é reduzido, dando origem a etanol e CO_2 (NELSON; COX, 2011). Dessa forma, é possível a obtenção do produto de interesse através de processos fermentativos submersos, que podem ser conduzidos de diferentes formas.

3.2.4.1 Fermentação descontínua

A fermentação descontínua, também conhecida por fermentação em batelada, vem sendo empregada desde a antiguidade como o modo de condução mais utilizado na obtenção de produtos biotecnológicos.

A forma de condução do processo consiste em incubar o micro-organismo juntamente com o mosto e seus demais nutrientes num dado instante de tempo inicial, permitindo que a fermentação ocorra sob condições ótimas. Durante o processo fermentativo, apenas é permitida a adição de oxigênio (no caso de processos aeróbicos), antiespumantes, ácidos ou bases para controle de pH. Caso não ocorra adição de soluções para o controle do processo, o volume no biorreator se mantem constante durante todo o processo (CARVALHO; SATO, 2001a). Ao final do processo, o mosto fermentado é retirado e o produto encaminhado para as etapas de recuperação e purificação.

A principal desvantagem da fermentação descontínua é o baixo rendimento, pelo fato de que todo o substrato é adicionado de uma vez; podendo inibir o micro-organismo ou desviar o metabolismo celular, formando produtos indesejáveis. Outro fator que deve ser considerado são os tempos mortos do processo, sendo estes, tempos de carga e descarga do biorreator e o período correspondente à lavagem e esterilização do mesmo (CARVALHO; SATO, 2001a).

Por outro lado, comparado com outros processos fermentativos, apresenta grandes vantagens, tais como: menores risco de contaminação, maior flexibilidade de operação e controle. Sendo assim, é o mais utilizado na indústria de alimentos (CARVALHO; SATO, 2001a).

3.2.4.2 Fermentação descontínua alimentada

O processo descontínuo alimentado é caracterizado como uma forma de condução no qual um ou mais nutrientes são fornecidos gradualmente ao biorreator durante o cultivo, mas os produtos permanecem até o final da fermentação. Sua vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo, sendo assim, a adição de mosto pode ser realizada de forma contínua ou intermitente. A variação de volume no biorreator pode ocorrer ou não, dependendo da concentração de substrato e da taxa de evaporação do sistema (CARVALHO; SATO, 2001b).

Esse processo permite o controle da concentração de substrato, diminuindo o efeito inibitório causado pelo excesso de concentração de açúcar. Isso pode ser controlado pela vazão de alimentação de substrato ao sistema, o que permite a adição do mesmo nos momentos mais propícios da fermentação (LESSMANN, 1993).

Devido ao controle da concentração de substrato, o metabolismo microbiano pode ser deslocado para uma determinada via metabólica, ocasionando um aumento de um produto específico. Após a fase de enchimento no biorreator, o processo passa a ter as mesmas características do processo descontínuo clássico, não havendo entrada ou saída de fluido do biorreator. O processo termina no instante em que a massa de produto no biorreator permanece constante, ou seja, entra em equilíbrio (CARVALHO; SATO, 2001b).

Segundo Almeida (1960), algumas vantagens podem ser descritas durante o processo descontínuo alimentado, tais como:

- ✓ Economia de açúcar devido a um menor crescimento celular e consequentemente um aumento do rendimento em etanol;
- ✓ Eliminação de contaminantes pela centrifugação do mosto fermentado (separação da levedura);
- ✓ Eliminação da necessidade de cultura pura no preparo do inóculo, prática exigida no processo descontínuo clássico, diminuindo a complexidade das operações na condução do processo.

3.2.5 Cinética do processo fermentativo

Com a realização de estudos cinéticos é possível quantificar vários fatores importantes do sistema de cultivo em função do tempo de fermentação, tais como: consumo de substrato, taxa de formação de produto, taxa de crescimento celular, teor alcoólico do mosto fermentado e eficiência. Além disso, contribui para um maior entendimento da influência de fatores externos como, por exemplo: pH, temperatura e inibidores no meio fermentativo, sobre as velocidades de transformação e nos fatores de conversão (FERREIRA, 2003; HISS, 2001).

O acompanhamento do processo fermentativo é de extrema importância para que se possa compreender melhor a cinética e posteriormente poder determinar o rendimento, eficiência e produtividade de cada processo a ser estudado. A taxa de

crescimento celular é analisada através do método de contagem dos quadrantes e a concentração de açúcar durante o processo fermentativo é quantificada através do método 3,5 dinitrosalicílico (3,5 DNS) (MILLER, 1959).

3.2.6 Recuperação do produto – destilação

Após a fermentação o mosto passa a ser chamado de vinho de caldo-de-cana, tendo em sua composição compostos como líquidos (90% de água, 6 a 10% de álcool e 1 a 3% de componentes provenientes de fermentações secundárias ou contaminantes), gases (ar e dióxido de carbono), dissolvidos em pequena proporção, e sólidos (açúcares não fermentados, sais minerais e compostos nitrogenados). Essa mistura, após a decantação e filtração, é destinada para a recuperação do produto desejado, por meio de uma operação unitária conhecida como destilação. Neste processo de destilação, o vinho por efeito de aquecimento direto, passa para a fase gasosa e, em seguida, volta ao estado líquido por meio de resfriamento (LIMA, 2001a).

O processo de destilação é realizado em alambiques, que podem ser de cobre ou aço inoxidável. Para as cachaçarias artesanais, o alambique de cobre é o mais utilizado, podendo ser construído de diferentes formas e arranjos, proporcionando diversas características ao destilado e diferenciando-os de um para outro, quanto ao sabor e aroma. Durante o processo de destilação, os parâmetros pressão, temperatura e graduação alcoólica devem ser cuidadosamente monitorados, pois estes fatores podem influenciar na dinâmica de evaporação dos compostos presente no mosto fermentado (SORATTO; VARVAKIS; HORII, 2007).

Deve-se considerar que o alambique de cobre além de operar como um destilador, também auxilia na formação de componentes relacionados ao aroma e sabor da cachaça, em virtudes de reações dentro do próprio alambique (MUTTON; MUTTON, 2010).

O produto obtido da destilação é uma mistura composta por álcool, água e uma fração de impurezas voláteis conhecidas como produtos secundários ou congêneres, sendo estes: álcoois superiores, aldeídos, ésteres, ácidos e furfural (LIMA, 2001b; YOKOYA, 1995).

A qualidade do destilado obtido está diretamente ligada à composição qualitativa dos constituintes presentes em mínimas quantidades, tendo assim, uma mistura com

proporções adequadas dos compostos, proporcionando aroma e sabor típico da cachaça (MUTTON; MUTTON, 2010). Outros fatores que influenciam na característica da bebida são a presença de leveduras no vinho fermentado durante a destilação, velocidade de operação e o fato de realizar ou não a separação das frações (cabeça e cauda) do destilado final (LÉAUTÉ, 1990; MAIA, 1994).

Os pequenos e médios produtores de cachaça no Brasil realizam o processo de destilação em alambique de cobre simples, gerando diferentes frações de destilados, que são divididas em: cabeça, coração e cauda (MUTTON; MUTTON, 2010).

- ✓ Cabeça: é o destilado recolhido no primeiro instante da destilação, com graduação alcoólica de 65 – 70% (v/v) e que representa em torno de 5 – 10% do volume teórico total de aguardente a ser obtida. Essa fração é rica em ésteres, aldeídos, acetaldeídos, metanol e acetato de etila.
- ✓ Coração: destilado desejável para a bebida, que representa em torno de 80% do destilado obtido e com graduação alcoólica em torno de 45 – 50% (v/v). Essa fração é rica em etanol, álcoois superiores, ácidos voláteis e compostos secundários formados na fermentação ou no alambique.
- ✓ Cauda: conhecida como água-fraca, é a ultima fração a ser obtida na destilação, correspondendo cerca de 10% (v/v) do volume total do destilado, composta por produtos menos voláteis que o etanol e rica em constituintes indesejáveis, como furfural, ácido acético, álcoois superiores, sendo coletada a partir da graduação alcoólica de 38%.

Para um maior rendimento de álcool desejável, recomenda-se misturar as frações cabeça e cauda ao novo vinho a ser destilado, possibilitando reações entre os compostos de cada fração com o álcool presente no vinho, obtendo assim, componentes aromáticos importantes para a qualidade da bebida (MUTTON; MUTTON, 2010).

3.3 Características físico-químicas da cachaça

Com a crescente demanda por produtos com altas qualidades e dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira, nos últimos anos houve a necessidade de se aprimorar os padrões de qualidade por meio de análises físico-químicas, para que se possa obter um controle rigoroso no processo de recuperação do produto final (OSHITA et al., 2003).

A Instrução Normativa n° 13, de 29 de junho de 2005, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estabelece a composição química da cachaça e seus requisitos de qualidade, suas definições, classificações, controle, aditivos, contaminantes e higiene (BRASIL, 2005a).

Na Tabela 1 estão apresentados os principais parâmetros e seus respectivos limites estipulados pela legislação brasileira. Em função da influência destes compostos sobre a qualidade da bebida, o intuito de estipular estes parâmetros é aumentar o controle quanto à presença de contaminantes, e como consequência, melhorar a qualidade e proteger a saúde pública do consumidor.

Tabela 1 – Limites estabelecidos pela legislação brasileira para alguns parâmetros físico-químicos para aguardentes e cachaça.

Componentes	Unidade	Limites	
		Mínimo	Máximo
Cobre	mg/L	...	5
Carbamato de etila	µg/L	...	150
Acidez volátil	mg/100 mL álcool anidro	...	150
Ésteres, em acetato de etila	mg/100 mL álcool anidro	...	200
Aldeídos totais, em acetaldeído	mg/100 mL álcool anidro	...	30
Álcoois superiores (álcool propílico, isobutílico e isoamílico	mg/100 mL álcool anidro	...	360
Furfural	mg/100 mL álcool anidro	...	5
Metanol	mg/100 mL álcool anidro	...	20
Acroleína	mg/100 mL álcool anidro	...	5
Sacarose (açúcar refinado, cristal, invertido ou glicose)	g/L	...	6
Extrato seco	g/L	...	6
Graduação alcoólica de aguardente	% álcool etílico a 20°C	38	54
Graduação alcoólica de cachaça	% álcool etílico a 20°C	38	48
Partículas em suspensão (resíduos sólidos)		Ausentes	Ausentes

Fonte: Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (2005).

3.3.1 Teor alcoólico

O teor alcoólico é um dos principais fatores analisado em bebidas alcoólicas, para que se possa obter a classificação específica de cada produto, conforme a legislação brasileira. Uma das formas de verificar o valor relativo ao teor alcoólico da cachaça é através do método densimétrico, princípio no qual se baseia na separação do álcool por destilação da amostra e posteriormente sua quantificação, de acordo com a densidade relativa do destilado a 20 °C, sendo obtido através da leitura na tabela de grau alcoólico real (Densidade específica x Grau alcoólico), sendo expressa em %vol a 20 °C (BRASIL, 2005b).

3.3.2 Teor de cobre

O cobre é um metal muito importante na saúde humana, estando presente em todos os fluidos e tecidos humanos, sendo necessário para os processos metabólicos do corpo. Segundo a legislação brasileira, o limite máximo de cobre estabelecido pelo MAPA (2005) é de 5 mg/L , concentração na qual, o cobre não é tóxico e além de tudo realça o aroma e sabor da bebida (CANTÃO, 2006).

A contaminação do cobre na cachaça está diretamente ligada com a etapa de recuperação do produto, pois o processo de destilação é realizado em alambiques de cobre, onde o metal, ao se oxidar, fica coberto por uma camada esverdeada (azinhavre) composta por [$CuCO_3Cu(OH)_2$], sendo esta, dissolvida e arrastada pelos vapores alcoólicos ácidos durante a etapa de destilação e consequentemente, contaminando o produto final (BOZA; HORII, 2000).

O método utilizado para quantificar a concentração de cobre é o de espectrofotometria de absorção atômica com chama de ar/acetileno oxidante utilizando lâmpada de cátodo oco de cobre, com a bebida destilada desalcoolizada, segundo o método da adição padrão (BRASIL, 2005b).

3.3.3 Acidez volátil

A acidez volátil presente na cachaça é um parâmetro diretamente ligado à qualidade sensorial da bebida, sendo indesejável em grandes quantidades. A sua formação durante o processo está diretamente ligada à etapa de fermentação, pois uma

fermentação em condições não adequadas proporciona um grande aumento na formação de ácidos no mosto fermentado. Fatores como: tipo de levedura; temperatura; tempo de fermentação e manejo do mosto (contaminantes), podem afetar a fermentação e elevar a formação de compostos secundários (CARDOSO, 2001). Outros dois fatores estão diretamente ligados ao aumento da acidez, sendo eles: aeração do mosto e o tempo de espera entre o término da fermentação e o inicio da destilação, pois a presença de oxigênio pode ocasionar a proliferação de bactérias acéticas ao meio fermentativo, onde parte do etanol é transformado em ácido acético, e como consequência, ocorre a elevação da acidez do meio e redução do rendimento de etanol. Sendo assim, ao final do processo fermentativo, a destilação deve iniciar o mais rápido possível, evitando-se uma grande concentração da acidez e a desvalorização do produto final (CARDOSO, 2001; CANTÃO, 2006).

O método para a quantificação da concentração dos ácidos voláteis é por titulação por arrase de vapor d'água (BRASIL, 2005b).

3.3.4 Aldeídos, ésteres totais e álcoois superiores

A natureza dos compostos secundários (aldeídos, ésteres e álcoois superiores) presentes em grande parte de bebidas destiladas está diretamente ligada em relação à composição da matéria-prima, fermentação, destilação e envelhecimento do produto, proporcionando características distintas de uma bebida para outra (MAIA, 1994).

O principal aldeído formado durante a fermentação é o acetaldeído, estando presente nas primeiras horas da fermentação e diminuindo ao final do processo, pois tem uma grande tendência em sofrer oxidação e se transformar em ácido acético. A presença deste interferente é um indicativo da ocorrência de contaminação por bactérias acéticas, que acabam utilizando etanol como substrato para a produção de ácido acético. Consequentemente, o destilado obtido apresentará teores elevados de acidez, refletindo em um produto de baixa qualidade (MAIA, 1994; MIRANDA, 2005).

Os ésteres, por serem compostos voláteis e aromáticos, são um dos principais compostos responsáveis pelo aroma da bebida, diferentes entre si quanto ao aroma e sabor e oriundos das reações entre álcoois e ácidos carboxílicos. Quanto menor for o peso molecular do álcool envolvido na reação, maior será sua presença sensorial na bebida (CHANG, 1994; MONTEIRO, 2010). Dentre os ésteres presentes em bebidas

destiladas, o que se encontra em maior proporção é o acetato de etila, tendo como característica um aroma frutado (MAIA, 1994).

Quanto aos álcoois superiores, estes contribuem diretamente nas características sensoriais da cachaça, oriundos do metabolismo dos aminoácidos através das leveduras. Quanto maior for a quantidade de carbono na sua estrutura, maior será a mudança quanto ao aroma, formando assim, álcoois oleosos e com aromas característicos de flores, sendo indesejáveis na bebida em quantidades excessivas (MAIA, 1994). Para que se possa obter uma cachaça com alta qualidade, a proporção de álcoois superiores deve ser proporcional à quantidade de ésteres, formando assim buquês de aromas desejáveis ao produto final (SOUZA; LLISTÓ, 1978).

A quantificação destes compostos secundários é realizada por cromatografia gasosa (BRASIL, 2005b).

3.3.5 Furfural

O furfural e o hidroximetilfurfural são aldeídos indesejáveis oriundos da própria cana-de-açúcar, pois quando sua colheita é sucedida da queima da folhagem, acarreta a desidratação de açúcares (pentoses e hexoses) livres no caldo ou no bagaço (MAIA, 1994). Outro fator interferente no aumento da formação destes compostos é a presença de concentração de açúcares na etapa de destilação, principalmente em alambiques aquecido a fogo direto, desta forma, ressalta a importância da etapa da fermentação, para que ocorra a transformação de todos os açúcares presentes no mosto em etanol (MASSON, 2005). Sua quantificação é realizada por espectrofotometria (BRASIL, 2005b).

4 METODOLOGIA

A produção da cachaça no presente trabalho foi dividida em duas etapas, onde no primeiro momento foi realizado um estudo em escala laboratorial de 2,5 litros e posteriormente um estudo em biorreatores de 4,0 litros. Sendo assim, foram elaboradas com a mesma formulação, variando a forma de condução do processo, o volume de escala a ser estudado e a forma de recuperação do etanol após o processo fermentativo, sendo estes: sem decantação, com decantação e, com decantação e centrifugação.

4.1 Matéria-prima e reagentes

O caldo de cana-de-açúcar foi fornecido por um produtor da região de Santo Antônio da Patrulha – RS.

Os reagentes utilizados durante o processo fermentativo foram sulfato de zinco heptahidratado P.A. (Alphatec), sulfato de manganês monohidratado (Synth), superfosfato triplo granulado (Yara Brasil Fertilizantes S.A), fubá de milho e fermento biológico prensado resfriado (Fleischmann) contendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

4.2 Procedimentos experimentais

4.2.1 Preparo do Mosto

O caldo de cana-de-açúcar foi filtrado por meio de uma peneira de malha fina com diâmetro de 20 cm antes da correção do pH, que deverá estar na faixa de 4 a 5 (MUTTON; MUTTON, 2010). Posteriormente, foi diluído com água destilada em frações, para obtenção da concentração de sólidos solúveis de 5 °Brix, 7 °Brix e 10 °Brix, utilizados na etapa de preparo do inóculo.

Para a etapa de produção da cachaça, o caldo de cana apresentou uma concentração de sólidos solúveis de 14 °Brix. Além disso, o mosto foi adicionado de: 0,5 g/L de sulfato de zinco, 0,2 g/L de sulfato de manganês, 0,5 g/L de superfosfato triplo e 5 g/L de fubá de milho (PEIXOTO et al., 2016).

4.2.2 Preparo do inóculo

A propagação do micro-organismo foi realizada em dois momentos, sendo o primeiro realizado para fermentações em escala de 2,5 litros e o segundo momento para fermentações em escala de 4 litros. Procedimento no qual foi realizado nos próprios biorreatores para o processo fermentativo, sendo estes erlenmeyers com capacidade de volume de 5 litros.

Para o processo em escala de 2,5 litros, o preparo do inóculo foi realizado com a adição de 50 mL de caldo de açúcar diluído a 5 °Brix em 50 gramas de fermento biológico prensado resfriado, deixando a mistura em banho-maria a 30 °C por aproximadamente 30 minutos, em biorreator do tipo erlenmeyer, até ser observado o crescimento exponencial da levedura.

Em seguida foi adicionado 100 mL de caldo de açúcar a 7 °Brix, deixando-o pelo tempo de 30 minutos para que ocorresse a multiplicação celular. Posteriormente, foi realizada a adição de 150 mL do caldo a 10 °Brix, deixando-o pelos mesmos 30 minutos. Todo o procedimento de preparo do inóculo foi realizado sob temperatura controlada de 30 ºC, com aeração natural, com duração estimada de 1 h e 30 min (MUTTON; MUTTON, 2010).

Já para os processos em escala de 4 litros, os procedimentos do preparo do inóculo foram os mesmo realizados para as fermentações de 2,5 litros, mudando apenas a proporção de levedura e a dosagens de volumes a serem usados. Sendo assim, foi utilizado 80 gramas de fermento fresco prensado (levedura) e os volumes de substrato adicionados em cada etapa: 80 mL a 5 °Brix, 160 mL a 7 °Brix e 240 mL a 10 °Brix.

4.2.3 Produção de etanol

Após as etapas de preparo do inóculo e do mosto, foi possível iniciar a produção de etanol utilizando o processo fermentativo submerso conduzido no modo descontínuo ou descontínuo alimentado em escalas de 2,5 e 4 litros. Para ambos os processos, as fermentações ocorreram em biorreatores do tipo erlenmeyer com capacidade de volume de 5 litros, sem agitação mecânica e com o acompanhamento da temperatura em banho-maria à 30 °C.

Para a condução do processo no modo descontínuo, o inóculo foi colocado no biorreator em conjunto com o volume total de mosto, no teor de sólidos solúveis de 14

°Brix, procedimento realizado para as escalas de 2,5 e 4 litros. O biorreator foi mantido aberto durante 30 minutos, permitindo a adaptação da levedura às condições experimentais. Em seguida, o biorreator foi fechado, iniciando assim a conversão dos açúcares diretamente fermentescíveis em etanol.

Para a produção de cachaça no modo descontínuo alimentado, o inóculo foi colocado no biorreator e o mosto foi adicionado de forma intermitente, a cada 30 min, sendo que, para o processo em escala de 2,5 litros, cada alimentação continha um volume de 500 mL e, para o processo em escala de 4 litros cada alimentação continha um volume de 800 mL, totalizando um tempo de enchimento dos biorreatores de 5 horas (BORGES, 2008). Após esse período, o processo passou a ser conduzido de forma descontínua.

O decréscimo do teor do °Brix (concentração de açúcares) foi acompanhado com leituras realizadas a cada duas horas com o auxílio de um refratômetro digital para ambos os processos fermentativos e suas respectivas escalas de produção. Sendo assim, o processo fermentativo foi finalizado quando não houve o decaimento do °Brix, obtendo-se assim, o vinho ou mosto fermentado.

Foram realizadas análises dos vinhos obtidos após os processos descontínuo e descontínuo alimentado, quanto à concentração de substrato e de etanol, que permitiu a determinação do rendimento, eficiência e produtividade de cada processo, identificando assim qual a melhor forma de condução do processo fermentativo para a produção de cachaça.

4.3 Parâmetros cinéticos durante o processo fermentativo

4.3.1 Determinação da concentração de açúcares

O consumo de glicose foi acompanhado através do decaimento do teor de sólidos solúveis °Brix, sendo medido através de um refratômetro digital.

4.3.2 Graduação alcoólica do mosto fermentado

O teor alcoólico do mosto fermentado foi calculado através da equação 1 (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2008).

$$E = \frac{(Bi - Bf) \times 4}{7{,}4} \quad (1)$$

onde:

Bi = Brix inicial (°Brix)

Bf = Brix final (°Brix)

4.3.3 Produção de etanol na fermentação

A produção de etanol na fermentação foi calculada através da equação 2 (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2008).

$$P = V \times \rho \quad (2)$$

onde:

V = volume formado de álcool no mosto fermentado (1 °GL = 10 mL de álcool/litro de vinho);

ρ = 0,79 g/mL densidade do álcool.

4.3.4 Fator de conversão de substrato em produto (rendimento do processo)

O fator de conversão de substrato em produto foi calculado através da equação 3 (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2008).

$$Y(p/s) = \frac{Pf - Pi}{Si - Sf} \quad (3)$$

onde:

Pf = concentração final de etanol [g/L]

Pi = concentração inicial de etanol [g/L]

Sf = concentração final de açúcares [g/L]

Si = concentração inicial de açúcares [g/L]

4.3.5 Eficiência da fermentação

A eficiência da fermentação foi calculada com base no rendimento obtido durante os experimentos e o rendimento teórico de Gay-Lussac, de acordo com a equação 4.

$$E = \frac{Y(p/s)}{Y(teórico)} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

Y(p/s) teórico corresponde a 0,511 g de etanol/g de glicose

4.3.6 Produtividade (Q)

A produtividade foi calculada conforme a equação 3 (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2008).

$$Q = \frac{Pf - Pi}{t} \quad (3)$$

Onde:

Pf = concentração final de etanol [g/L]

Pi = concentração inicial de etanol [g/L]

t = tempo total de fermentação [h]

4.4 Recuperação do Etanol

Para ambos os processos fermentativos (descontínuo e descontínuo alimentado) foram realizadas a etapas de recuperação do etanol no vinho após a fermentação. Foram realizados ensaios de três formas distintas, sendo elas: sem decantação, com decantação sob temperatura refrigerada a 6 °C por um tempo de 12 horas e com decantação sob temperatura refrigerada a 6 °C por um tempo de 12 horas seguido da operação de centrifugação a 5000 rpm por um tempo de 5 minutos. Sendo assim, para cada forma de condução do processo, três produtos foram recuperados de diferentes maneiras, sendo

submetidos ao processo de destilação, etapa também conhecida como purificação do bioproduto (etanol).

4.5 Destilação

Após a realização do processo fermentativo submerso e suas etapas de recuperação de etanol, foi realizada a etapa de destilação do produto obtido durante a condução descontínua ou descontínua alimentada. A destilação foi realizada em um sistema composto por: balão de fundo redondo de 5 litros, condensador e manta para aquecimento. Após a montagem do sistema de destilação, como: passagem do mosto fermentado para o balão de fundo redondo, conexão do condensador, mangueiras para circulação de água, termômetro para o acompanhamento da temperatura durante a operação de destilação e aquecimento da manta, iniciou-se a etapa de destilação e esperou-se que o sistema alcançasse o nível de trabalho.

Durante a destilação, o processo foi dividido em três etapas, para a obtenção das frações cabeça, coração e cauda. Essas frações representam cerca de 10%, 80% e 10%, respectivamente, do volume teórico total do produto (MUTTON; MUTTON, 2010). Cada etapa foi separada através da pesagem de frações distintas em tempos diferentes no decorrer da destilação. Para cada fração foram determinadas as massas específicas para obter a quantidade de etanol (BRASIL, 2005b).

4.6 Análises físico-químicas dos destilados

4.6. 1 Determinação da acidez volátil

A acidez volátil foi determinada através do método de titulação dos ácidos voláteis extraídos das amostras por arraste de vapor d’água (BRASIL, 2005b).

4.6.2 Determinação de ésteres totais e álcoois superiores

As análises ésteres totais e álcoois superiores foram realizadas utilizando um cromatógrafo gasoso GC-FID Clarus 400 Perkin Elmer com autosampler, equipado com uma coluna empacotada SGE BP-20 (WAX) 30 x 0.25 mm x 0,25 um e um detector de ionização de chama (FID). Como gás de arraste foi utilizado hidrogênio, com vazão de 1,5 mL/min. A temperatura do injetor e do detector foi de 220 °C. A programação da temperatura da coluna foi com rampa de 10 °C/min até 160 °C, durante 15 min. A curva de calibração foi construída em triplicata e antes da injeção da amostra, foi adicionado padrão interno. A concentração de cada componente foi determinada com base nos fatores de resposta obtidos durante a calibração, efetuada em condições cromatográficas idênticas às seguidas na análise da amostra (BRASIL, 2005b).

4.6.3 Determinação do grau alcoólico

O grau alcoólico foi determinado pelo método densimétrico (BRASIL, 2005b), baseado na separação do álcool por destilação da amostra e sua posterior quantificação de acordo com a densidade relativa do destilado, a 20 ºC. Dessa forma, o grau alcoólico foi obtido através da leitura na tabela de grau alcoólico real (Densidade x Grau alcoólico), sendo expressa em %vol a 20 °C.

4.7 Análise estatística

Os resultados obtidos referentes às amostras estudadas durante o processo fermentativo descontínuo e descontínuo alimentado foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação de médias ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, diferentes formas de condução do processo foram estudadas visando melhorar a produtividade e a qualidade da cachaça. Além disso, algumas formas de recuperação do produto foram investigadas, bem como a cinética de cada processo fermentativo e as características físico-químicas do produto final. O trabalho foi dividido em duas etapas, onde no primeiro momento foi realizado um estudo em

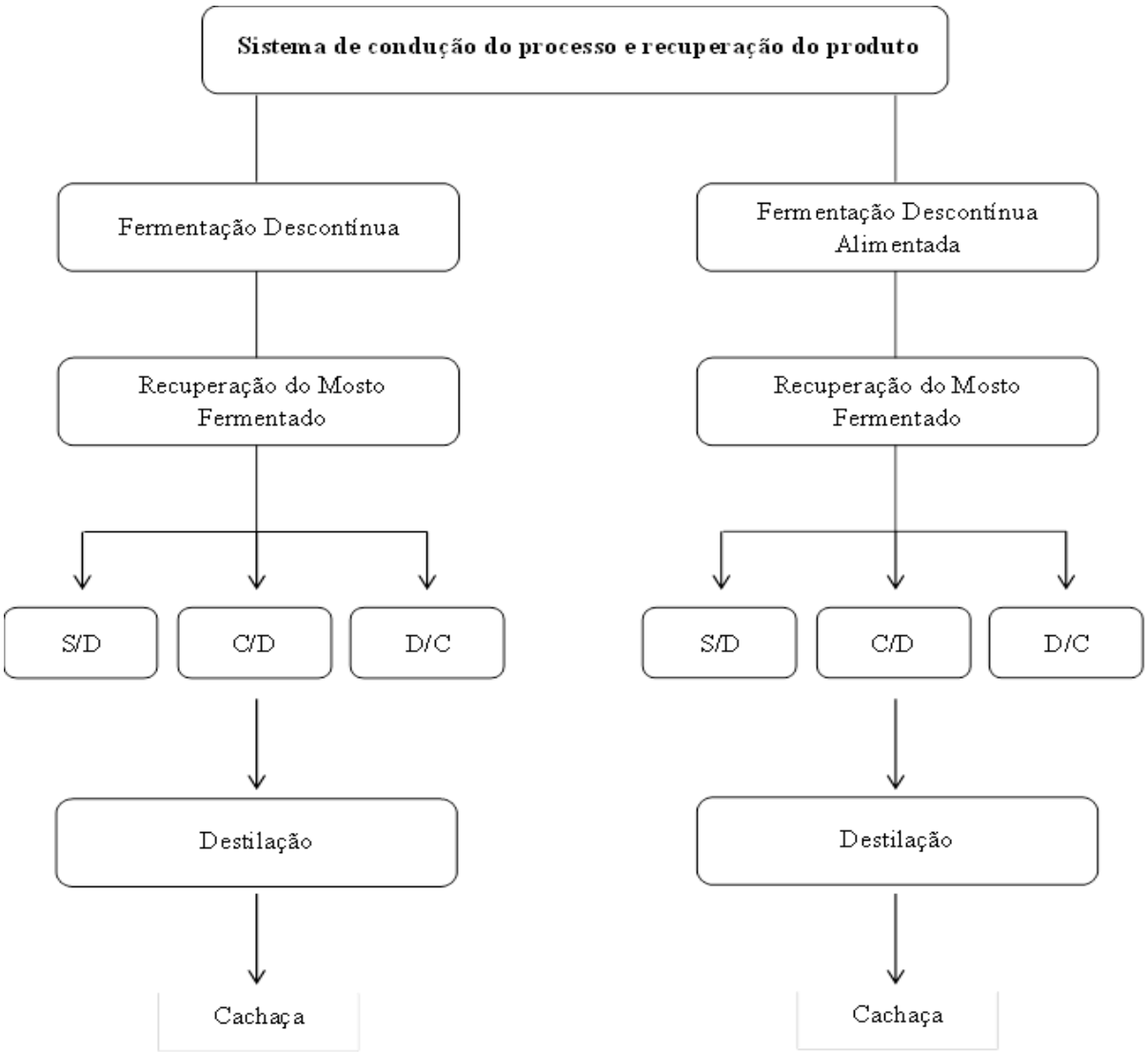
escala laboratorial com biorreator de 2,5 litros e posteriormente um estudo em biorreator de 4,0 litros.

A matéria prima obtida por um produtor da região de Santo Antônio da Patrulha apresentou uma concentração de sólidos solúveis de 21 °Brix e pH de 5,5. Esses valores são condizentes com a literatura para cana madura, com valores de pH entre 5,4 a 5,8 e concentração de sólidos solúveis superior a 18 °Brix (LIMA, 1999). Nestas condições, foi possível iniciar o processo fermentativo.

5.1 Processo descontínuo e descontínuo alimentado usando biorreator de 2,5L

A cachaça produzida no presente trabalho foi elaborada com a mesma formulação para ambas as formas de condução do processo (descontínuo e descontínuo alimentado). Após o encerramento do processo fermentativo, a recuperação do mosto fermentado foi objeto de estudo. No total, foram estudadas 3 diferentes maneiras de obter o mosto fermentado: sem decantação, com decantação, com decantação e centrifugação. Dessa forma, 3 mostos fermentados foram levados para a etapa de recuperação, conhecida como destilação, tanto para a condução no modo descontínuo, quanto no modo descontínuo alimentado (Figura 3).

Figura 3. Fluxograma de condução fermentativa e formas de recuperação do produto.



Legenda: S/D – Sem decantação; C/D – Com decantação**;** D/C – Com decantação e centrifugação.

5.1.1 Processo de fermentação

A fermentação descontínua e a fermentação descontínua alimentada foram realizadas durante 22 horas, onde os parâmetros: teor de sólidos solúveis (ºBrix), teor alcoólico (ºGL), produção (g/L vinho), produtividade (g/L.h), fator de conversão de substrato em produto (YP/S) e eficiência da fermentação (E*) foram avaliados para as três diferentes formas de recuperação do bioproduto: sem decantação (Biorreator 1), com decantação (Biorreator 2) e com decantação e centrifugação (Biorreator 3). Cada produto obtido do seu respectivo biorreator foi analisado quanto aos parâmetros físico-

químicos, o que permitiu determinar a qualidade da bebida, conforme estabelece a legislação brasileira.

Tabela 2 – Cinética da fermentação para o processo descontínuo em escala de 2,5 litros.

Sistema Descontínuo			
	Biorreator 1	**Biorreator 2**	**Biorreator 3**
°Brix inicial	14	14	14
°Brix final	3,5	3,4	3,5
E (°GL)	5,68	5,73	5,68
P(g/L vinho)	44,84	45,26	44,84
Q(g/L.h)	2,04	2,06	2,04
Y (P/S)	0,41	0,41	0,41
Eficiência	80,2	80,17	80,20

*Biorreator: 1 sistema sem decantação, Biorreator 2: sistema com decantação e Biorreator 3: sistema com decantação e centrifugação.

Tabela 3 – Cinética da fermentação para o processo descontínuo alimentado em escala de 2,5 litros.

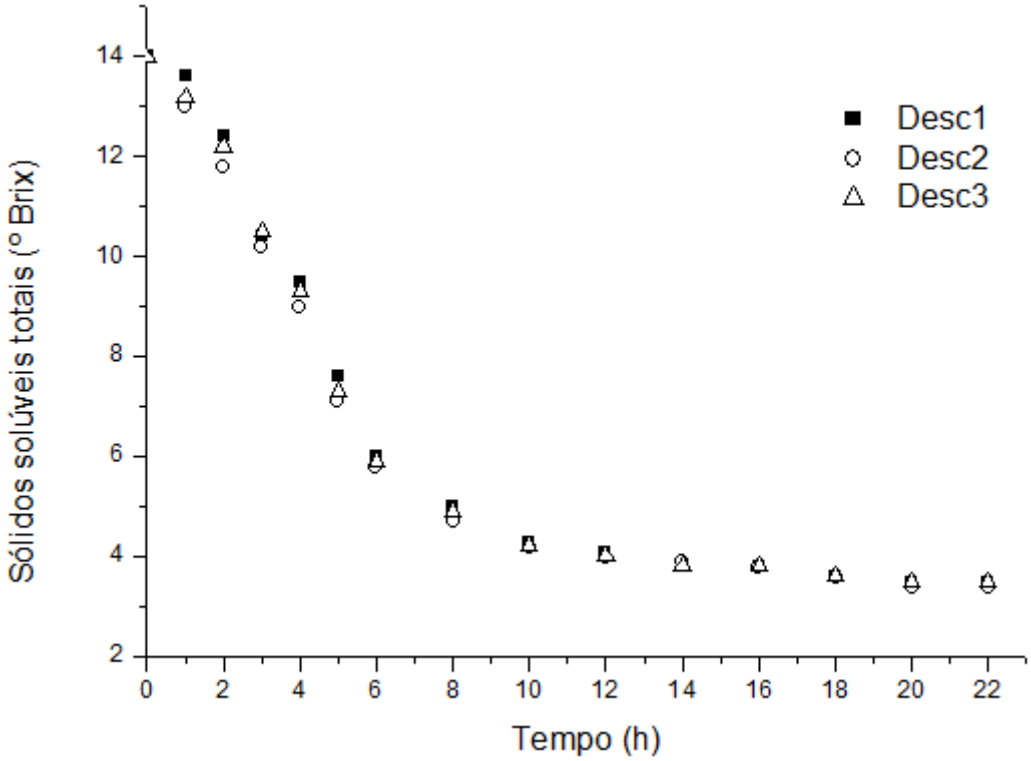
Sistema Descontínuo Alimentado			
	Biorreator 1	**Biorreator 2**	**Biorreator 3**
°Brix inicial	14	14	14
°Brix final	2,5	2,8	3
E (°GL)	6,22	6,05	5,95
P(g/L vinho)	49,11	47,83	46,97
Q(g/L.h)	2,23	2,17	2,14
Y (P/S)	0,408	0,409	0,409
Eficiência	80,0	80,0	80,0

*Biorreator 1 sistema sem decantação, Biorreator 2 sistema com decantação e Biorreator 3 sistema com decantação e centrifugação.

O consumo de açúcares presente no mosto foi acompanhado até que ocorresse o equilíbrio do teor de sólidos solúveis (°Brix) no processo, sendo que, ao final da fermentação o sistema descontínuo apresentou valor médio de 3,5 °Brix, enquanto que o sistema descontínuo alimentado 2,8 °Brix. Ao observar as Figuras 4 e 5, percebeu-se que, para o sistema descontínuo alimentado, o teor de sólidos solúveis permaneceu praticamente constante nas 5 primeiras horas, variando em média de 10,6 a 9,2 °Brix sendo este o tempo de enchimento do biorreator. Para o sistema descontínuo, neste mesmo intervalo de tempo, houve um decaimento em média do °Brix de 13,3 para 7,3 °Brix. Acredita-se que essa diferença no comportamento da concentração dos açúcares (°Brix) entre os processos deve-se pelo fato de que no processo descontínuo alimentado, durante o intervalo de tempo de enchimento do biorreator, a adição de substrato presente no mosto foi realizada de maneira gradual, fazendo com que a adaptação e o desenvolvimento preliminar do micro-organismo ocorressem de forma gradativa e

menos turbulenta. Consequentemente, proporcionou um menor consumo de substrato (açúcar) quando comparado com o sistema descontínuo (GUIDINI, 2013).

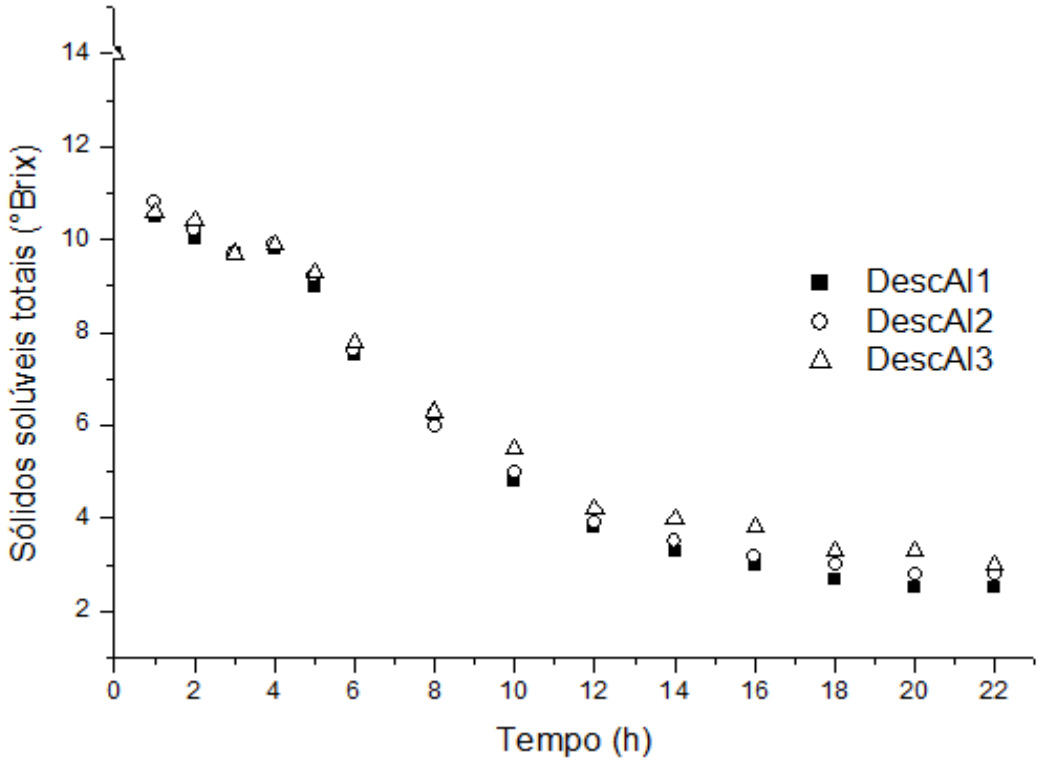
Figura 4- Acompanhamento do °Brix durante toda a fermentação para o processo descontínuo de 2,5L.



Legenda: Desc1 – Sem decantação; Desc2 – Com decantação**;** Desc3 – Com decantação e centrifugação.

Segundo Lima (1999), espera-se que a fermentação alcoólica se estabilize em um período de 24 a 36 horas. Entretanto, esse comportamento não foi observado nesse estudo, pois em ambos os processos o tempo de fermentação foi de 22 horas. Acredita-se que a utilização de um mosto mais diluído e a suplementação de nutrientes como o sulfato de zinco, sulfato de manganês, superfosfato triplo e fubá de milho (PEIXOTO et al., 2016), contribuíram para que o micro-organismo conseguisse realizar a transformação do substrato em produto de uma maneira mais eficiente, fazendo com que o tempo de fermentação fosse menor. Cabe destacar que essa redução do tempo de fermentação não prejudicou a qualidade do produto final, que será discutida mais adiante nesse trabalho, no item 5.1.2.

Figura 5 - Acompanhamento do °Brix durante toda a fermentação para o processo descontínuo alimentado de 2,5L.



Legenda: DescAl1 – Sem decantação; DescAl2 – Com decantação**;** DescAl3 – Com decantação e centrifugação.

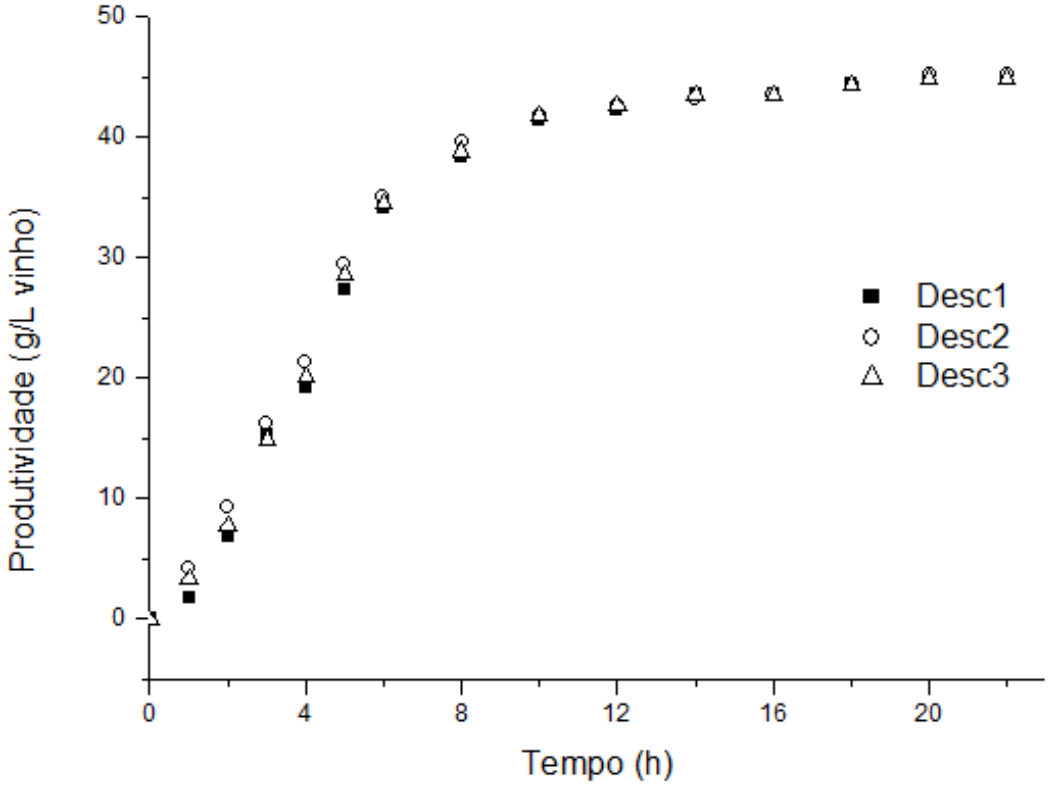
Conforme as Figuras 6 e 7, o sistema descontínuo alimentado apresentou uma produção de etanol maior que o sistema descontínuo, isso se deve ao fato de que a alta concentração de substrato presente no início da fermentação descontínua pode ter ocasionado uma inibição da levedura. Esse comportamento era esperado porque já se sabe que a utilização de biorreatores em sistema descontínuo alimentado ameniza a inibição da levedura e a repressão catabólica da reação pela menor concentração de substrato no meio, levando a rendimentos mais elevados, quando comparado ao modo descontínuo (CRUZ, 20015).

Ambos os sistema de condução de fermentação (descontínuo e descontínuo alimentado) apresentaram em média uma conversão de substrato em produto de 0,41g/g, sendo esse valor inferior ao valor máximo teórico de 0,511g/g e aos encontrados por Lima e Marcondes (2002) e Lima, Basso e Amorim (2001) de 0,46g/g para fermentações industriais. Entretanto, esses resultados ficaram bem próximos aos de outros autores, como Andrietta e Stupiello (1990) que encontraram valor igual a 0,445 g/g ao estudarem a fermentação alcoólica do caldo de cana e Ribeiro e Horri (1999) que

encontraram um fator de conversão de 0,44 g/g para sistema descontínuo utilizando levedura isolada de fermento prensado comercial. Já Guidini (2013) obteve um fator de conversão de 0,46 g/g para o processo descontínuo alimentado, em um tempo de enchimento do biorreator de 6 horas.

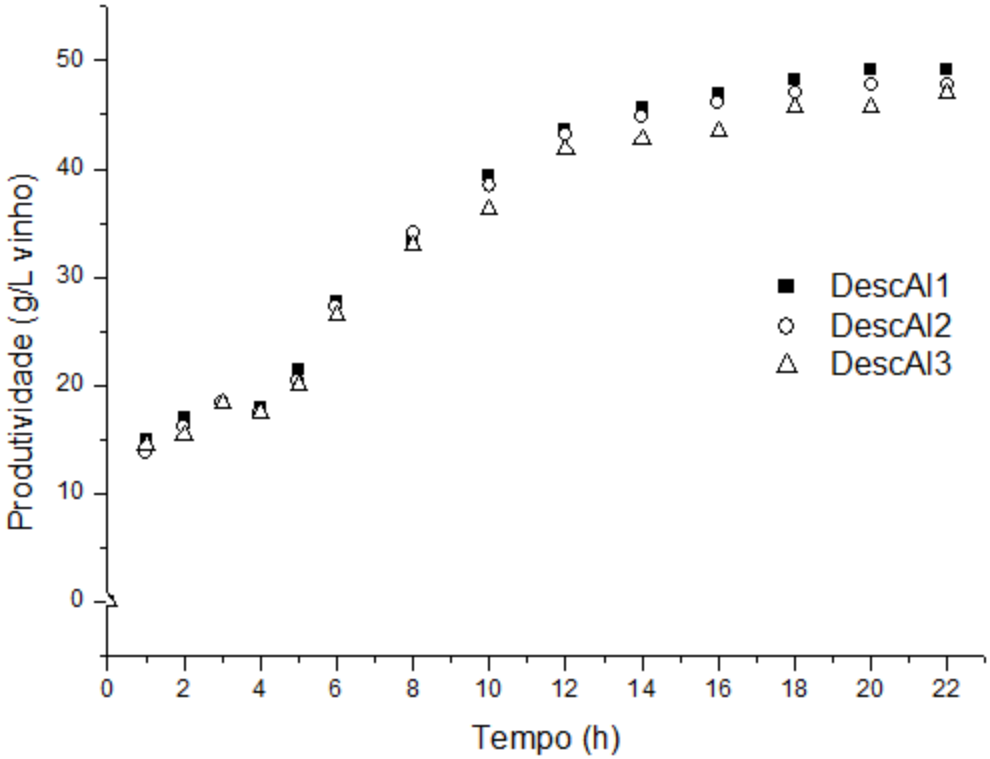
Essa diferença entre os valores de fator de conversão de substrato em produto disponíveis na literatura tem relação direta com a forma com que cada processo foi conduzido e a formulação de cada mosto quanto a sua suplementação, o que permite a obtenção de uma taxa de conversão de substrato em produto diferente para cada processo. Cabe ressaltar também, que para o processo descontínuo alimentado o tempo de enchimento do biorreator pode influenciar diretamente a cinética de fermentação.

Figura 6 - Produção de álcool durante a fermentação descontínua de 2,5L.



Legenda: Desc1 – Sem decantação; Desc2 – Com decantação**;** Desc3 – Com decantação e centrifugação.

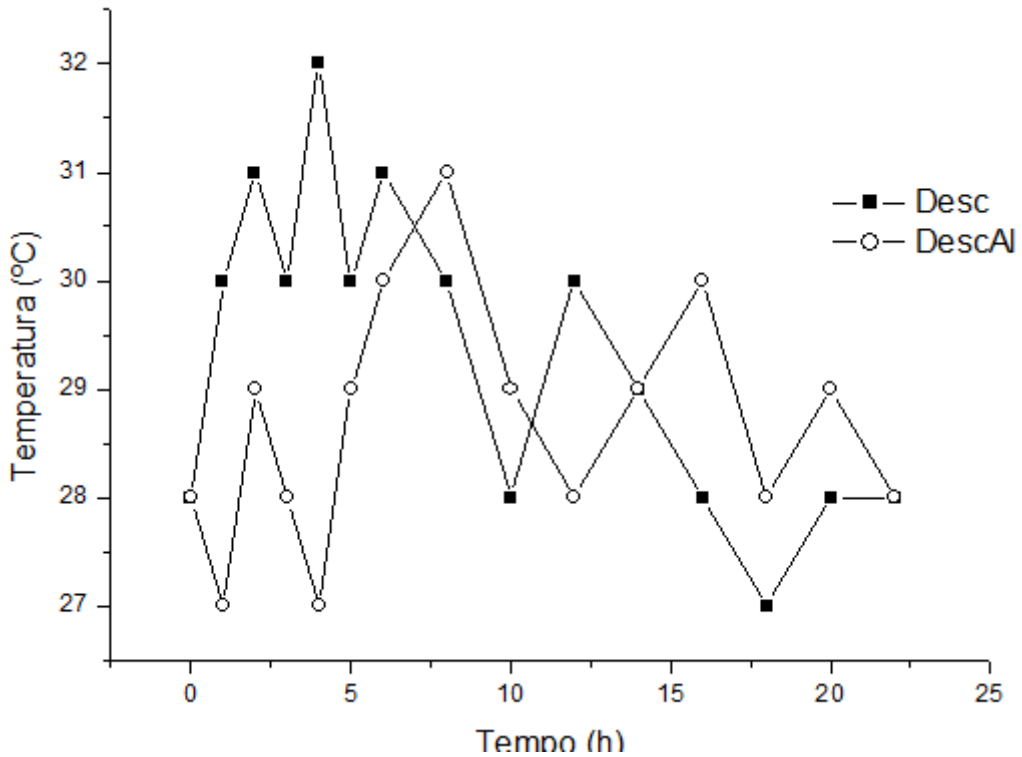
Figura 7 - Produção de álcool durante a fermentação descontínua alimentada de 2,5L.



Legenda: DescAl1 – Sem decantação; DescAl2 – Com decantação**;** DescAl3 – Com decantação e centrifugação.

A temperatura do processo fermentativo foi acompanhada e ocorreram algumas variações para ambas as formas de condução (Figura 8). Mesmo existindo essas variações durante o processo, a faixa de temperatura permaneceu próxima aos valores considerados como sendo adequados para fermentações alcoólicas, que são entre 25 a 35 °C (LIMA, 2001a; CARDOSO, 2006). Segundo Ribeiro (2006), a temperatura ideal para a multiplicação celular do micro-organismo está entre 28 e 30 °C, pois temperaturas baixas diminuem a atividade da levedura e temperaturas elevadas favorecem o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis para o processo, como as bactérias, causando baixos rendimentos em produto.

Figura 8 - Comportamento da temperatura para o processo descontínuo e descontínuo alimentado.



Legenda: Desc – Processo descontínuo; DescAl – Processo descontínuo alimentado.

Nas cinco primeiras horas, o processo descontínuo alimentado apresentou menores variações na temperatura do que o processo descontínuo. Acredita-se que esse comportamento ocorreu devido à alta carga de açúcares contida no processo descontínuo, causando um "stress" ao micro-organismo na fase preliminar de multiplicação celular, levando a uma "turbulência" maior no meio fermentativo quando comparada com o sistema descontínuo alimentado, aumentando a energia do mosto e consequentemente aumentando a temperatura do processo (MUTTON; MUTTON, 2010).

5.1.2 Análises físico-químicas da cachaça

5.1.2.1 Influência das operações de recuperação do mosto no tempo de destilação

A partir da obtenção do mosto fermentado recuperado de diferentes formas para o sistema descontínuo e descontínuo alimentado, foi possível realizar a destilação em

destilador simples de bancada. Ficou evidente que as diferentes formas de recuperação empregadas influenciaram diretamente no tempo gasto de destilação, pois nos biorreatores 1 (sem decantação) o tempo de destilação foi de aproximadamente quatro horas, já nos biorreatores 2 (com decantação) obteve-se um tempo de destilação em torno de três horas e, nos biorreatores 3 (com decantação e centrifugação) o tempo de destilação foi de duas horas e trinta minutos. À medida que os processos de recuperação utilizados foram mais eficazes na remoção de partículas em suspenção, verificou-se uma redução no tempo de destilação. Do ponto de vista de economia de energia para a destilação, esse fator é importante. Mas é necessário avaliar também as variações nas características físico-químicas e as alterações sensoriais que isso pode causar ao produto.

Analisando economicamente esse decaimento do tempo necessário para a obtenção do etanol, as etapas de decantação seguida de centrifugação seriam bastante viáveis para o produtor, pois teria uma redução de aproximadamente uma hora e trinta minutos de funcionamento energético de operação unitária do equipamento. Mas pensando na qualidade da bebida, a composição de álcoois superiores foi superior quando comparada ao processo de recuperação do produto sem decantação. Sabe-se que quanto mais rápida for à destilação, maior será a dificuldade para realizar o fracionamento da bebida em cabeça, coração e cauda, e consequentemente levará uma composição de coração inadequada para o processo, visto que essa é a fração de maior interesse na produção de cachaças.

O fracionamento da cachaça foi realizado no decorrer da operação unitária de destilação. Os resultados obtidos no presente trabalho apresentaram características um pouco diferentes quando comparado com a literatura. Para o sistema descontínuo, as porcentagens encontradas foram de 21% para a fração cabeça, 57% para a fração coração e 22% para o fracionamento da cauda; já para o sistema descontínuo alimentado, este apresentou em média uma composição de 19,4% para a fração cabeça, 56% para o coração e 24,6% para o fracionamento da cauda. Acredita-se que essa diferença do fracionamento entre a literatura e os resultados obtidos, deve-se pelo fato da dificuldade de destilação em sistemas em pequena escala e, também pelo fato de uma possível maior formação de compostos secundários durante o processo fermentativo, tais como: metanol, ésteres, aldeídos, compostos fenólicos e ácidos orgânicos, presentes nas frações cabeça e cauda (CARDOSO, 2001).

5.1.2.2 Obtenção do teor alcoólico

O teor alcoólico da fração coração (Tabela 4) entre os processos foi diferente, sendo que, no modo descontínuo obteve-se em média um teor alcoólico de 47,3 °GL e já no descontínuo alimentado o valor foi de 42 °GL. Mesmo com essa diferença, as bebidas destiladas obtidas estiveram dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira, sendo estes para cachaça de 38 a 48 °GL (Brasil, 2005a).

Acredita-se que essa diferença entre o teor alcoólico tenha acontecido pela variação dos volumes de destilado obtido em cada fração e pelo fato de uma formação maior de compostos (álcoois superiores) na fração coração durante a fermentação descontínua, o que fez com que a graduação alcoólica fosse maior quando comparada com o descontínuo alimentado, conforme as Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Teores alcoólicos (°GL) encontrados para os processos descontínuo e descontínuo alimentado em escala de 2,5 litros.

Descontínuo	**Frações dos destilados**		
Biorreatores	Cabeça	Coração	Cauda
1	69	47	16
2	70	48	33
3	62	47	21
Descontínuo Alimentado	**Frações dos destilados**		
Biorreatores	Cabeça	Coração	Cauda
1	62	42	15
2	63	42	15
3	62	43	14

Tabela 5 – Volumes (mL) encontrados para as frações (cabeça, coração e cauda) para o processo descontínuo.

Descontínuo	**Frações dos destilados**		
Biorreatores	Cabeça	Coração	Cauda
1	100	270	95
2	110	250	85
3	90	280	130
Descontínuo Alimentado	**Frações dos destilados**		
Biorreatores	Cabeça	Coração	Cauda
1	110	300	140
2	100	290	150
3	100	300	110

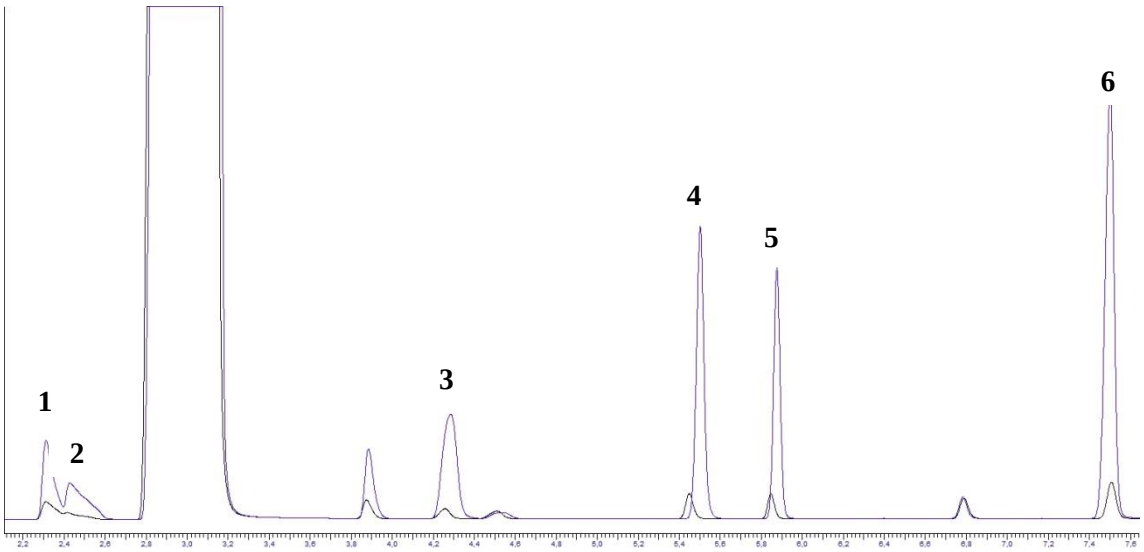
5.1.2.3 Concentração de álcoois superiores e ésteres totais

Segundo Cleto e Mutton (2004), a concentração de álcoois superiores formada no mosto fermentado é influenciada pela composição do meio, quanto a concentração de açúcar, pH, concentração e tipo de fonte de nitrogênio, temperatura, grau de aeração durante a fermentação, linhagem da levedura e concentração de aminoácidos, principalmente a leucina. Para Janzantti (2004), a formação de álcoois superiores está diretamente ligada ao tempo de fermentação, pois um processo mais demorado resulta em maiores concentrações de álcoois superiores, pois sabe-se que sua síntese é estimulada pelo oxigênio e está relacionada com o crescimento da levedura. Sendo assim, a síntese de álcoois superiores não está relacionada com as etapas de decantação e centrifugação.

Com base nos resultados analisados (Tabelas 6 e 7), comprovou-se que a cachaça apresentou uniformidade durante a produção, garantindo uma bebida padronizada, onde a maior concentração de álcoois superiores para o sistema descontínuo foi de 46,92 mg/100 mL de álcool anidro (biorreator 2) e, já para o sistema descontínuo alimentado foi de 186,55 mg/100 mL de álcool anidro. Sendo assim, a cachaça apresentou-se em conformidade com os padrões estabelecidos pela legislação brasileira tendo como valor máximo para concentrações de álcool superiores de 360 mg/100 mL de álcool anidro (BRASIL, 2005a). Quanto à concentração de aldeídos, ésteres, metanol, 2-butanol e álcool alélico, estes não estiveram presente na bebida, mesmo assim, apresentaram dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira, pois estes compostos não contêm uma composição mínima no produto (BRASIL, 2005).

Os compostos que foram avaliados por cromatografia a gás foram: acetato de etila, metanol, 2-butanol, 2-metil-1-propanol, álcool alélico, 4-metil-1-pentanol, 2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol. A partir dessas análises realizadas para as frações coração, foi possível verificar se a cachaça produzida estava dentro dos padrões de identidade e qualidade da bebida (Brasil, 2005b). A Figura 9 representa a análise cromatográfica de uma amostra de cachaça produzida no modo descontínuo e dos respectivos padrões, que possibilitam uma comparação entre as áreas do pico. O cromatograma da cachaça produzida no modo descontínuo alimentado possui as mesmas características (dados não apresentados).

Figura 9. Cromatogramas dos padrões e de uma amostra de cachaça produzida no modo descontínuo.



Legenda: Compostos avaliados - 1: acetato de etila (tempo de retenção de 2,3 min); 2: metanol (tempo de retenção de 2,4 min); 2-butanol (tempo de retenção de 4,2 min); 2-metil-1-propanol (tempo de retenção de 5,6 min); álcool alélico (tempo de retenção de 6,0 min); 4-metil-1-pentanol (tempo de retenção de 6,8 min); 2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol (tempo de retenção de 7,5 min). Picos menores representam os compostos quantificados nos padrões. Picos maiores representam os compostos quantificados na amostra.

Em ambos os processos de condução de fermentação, não foi detectada a presença de acetato de etila, metanol, 2-butanol, e álcool alélico na fração coração. Já a quantidade de álcoois superiores, para ambos os processos, foi quantificada em concentração mais elevada nos biorreatores 2 e 3, quando comparado com o biorreator 1, onde a técnica de recuperação utilizada foi mais simples. Acredita-se que esse aumento na concentração de álcoois superiores nos biorreatores 2 e 3 deve-se pelas etapas de recuperação do produto adotadas após o término da fermentação, onde no biorreator 2 ocorreu a decantação e no biorreator 3 ocorreu a decantação e posteriormente a centrifugação do mosto fermentado.

Mesmo tendo essa elevação da concentração de álcoois superiores, todas as amostras analisadas estiveram dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira, onde o valor máximo é de 360 mg/ 100mL de álcool anidro, sendo que a amostra que obteve a maior concentração foi no biorreator 3 do sistema descontínuo alimentado, com valor de 186,55 mg/ 100mL de álcool anidro. Segundo Vargas e Glória (1995) e Mutton e Mutton (2010), os teores de álcoois superiores podem ser controlados através do uso de um mosto adequado (substrato e suplementação), leveduras apropriadas, controle do tempo de fermentação e o recolhimento das frações do destilado no ponto certo.

Para Bosqueiro (2010), altas concentrações de álcoois superiores na fração coração são ruins para a bebida, levando a uma baixa qualidade sensorial. Segundo o mesmo autor, para evitar concentrações excessivas na cachaça, durante a etapa de destilação deve-se recolher um volume maior na fração cabeça. Maia e Campelo (2005) apontam alguns cuidados a serem feitos durante a fermentação para diminuir concentrações elevadas de álcoois superiores no mosto, tais como: reduzir o contato da levedura com o oxigênio, manter o pH do mosto sempre acima de 4,0 e controlar a temperatura durante o processo de fermentação entre 28 °C a 32 °C.

Tabela 6 - Resultados de ésteres totais e álcoois superiores para o sistema descontínuo (valores em mg/100mL de álcool anidro).

	Sistema Descontínuo			
Composto	**Bio 1**	**Bio 2**	**Bio 3**	**MAPA**
Acetato de etila	-	-	-	
Metanol	-	-	-	
2-butanol	-	-	-	
Álcool alélico	-	-	-	
Álcoois isobutílicos (2-metil-1-propanol, 1 e 3-metil-1-butanol)	29,54±0,157[c]	46,92±0,007[a]	38,27±0,04[b]	Máximo: 360

Tabela 7 - Resultados de ésteres totais e álcoois superiores para o sistema descontínuo alimentado (valores em mg/100mL de álcool anidro).

	Sistema Descontínuo Alimentado			
Composto	**Bio 1**	**Bio 2**	**Bio 3**	**MAPA**
Acetato de etila	-	-	-	
Metanol	-	-	-	
2-butanol	-	-	-	
Álcool alélico	-	-	-	
Álcoois isobutílicos (2-metil-1-propanol, 1 e 3-metil-1-butanol)	27,62±0,025[c]	41,91±0,008[b]	186,55±0,024[a]	Máximo 360

A partir dos resultados cinéticos e de caracterização da cachaça produzida com diferentes formas de recuperação do mosto fermentado, foi possível definir as etapas posteriores do trabalho. A escala de produção da cachaça foi ampliada para 4 litros de mosto, com o processo conduzido no modo descontínuo e descontínuo alimentado, não realizando decantação antes da destilação, visto que a recuperação do mosto fermentado sem decantação e centrifugação na escala de 2,5 litros apresentou concentrações menores de álcoois superiores. Dessa forma, a facilidade de operação na cadeia produtiva também foi levada em consideração, visto que os parâmetros avaliados foram

pertinentes e dentro dos valores estabelecidos pela legislação para todas as recuperações estudadas.

5.2 Processo descontínuo e descontínuo alimentado usando biorreator de 4 litros.

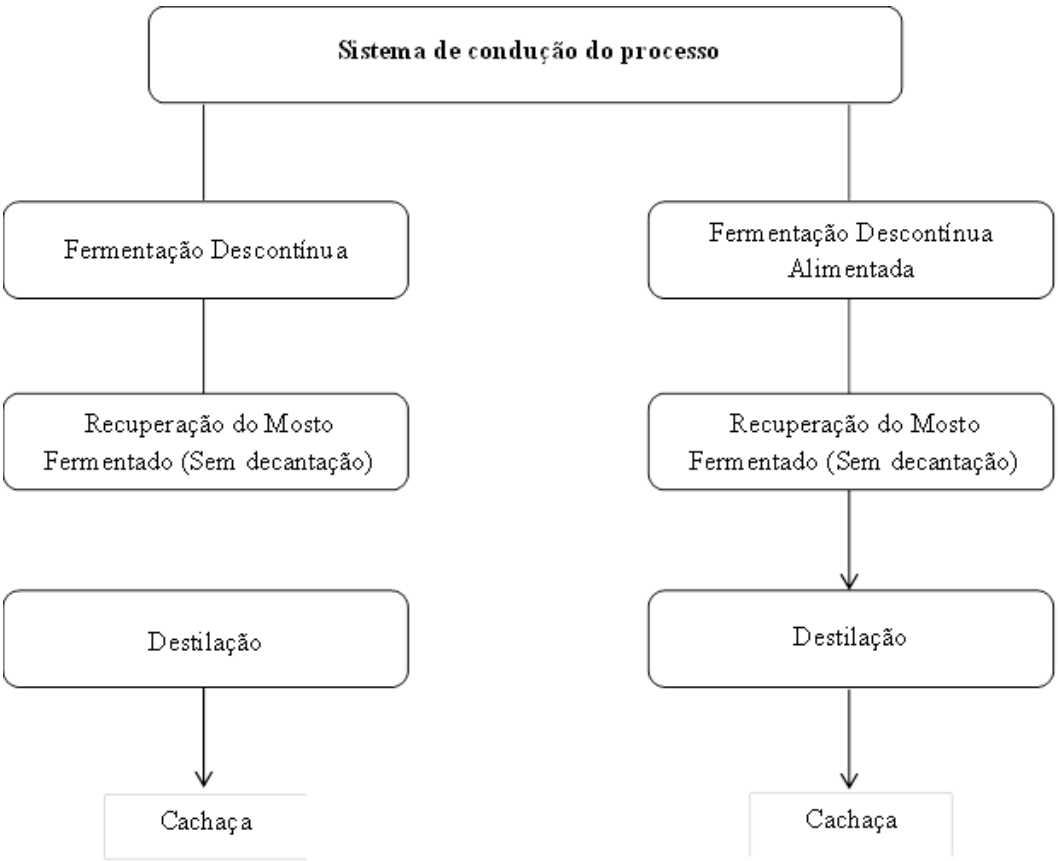
5.2.1 Processo de fermentação

A ampliação de escala foi realizada para um volume de 4 litros de mosto em dois biorreatores; o primeiro operando no sistema descontínuo e o segundo no descontínuo alimentado conforme a Figura 10. O tempo de duração para ambos os processos foi igual ao tempo de fermentação dos experimentos realizados em escala de 2,5 litros, sendo de 22 horas. Os parâmetros: teor de sólidos solúveis (ºBrix), teor alcoólico (ºGL), produção (g/L mosto), produtividade (g/L.h), fator de conversão de substrato em produto (YP/S) e eficiência da fermentação foram avaliados após a operação de recuperação do bioproduto (sem decantação do mosto fermentado) e são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Cinética da fermentação para o processo descontínuo e descontínuo alimentado.

Variáveis	**Biorreator Descontínuo**	**Biorreator Desc. Alimentada**
°Brix inicial	14	14
°Brix final	3,4	2,8
E (°GL)	5,73	6,05
P(g/L mosto)	45,26	47,83
Q(g/L.h)	2,06	2,17
Y (P/S)	0,41	0,41
E*	80,2	80,0

Figura 10. Fluxograma de condução fermentativa para biorreatores de 4 litros.



Fonte: Autor

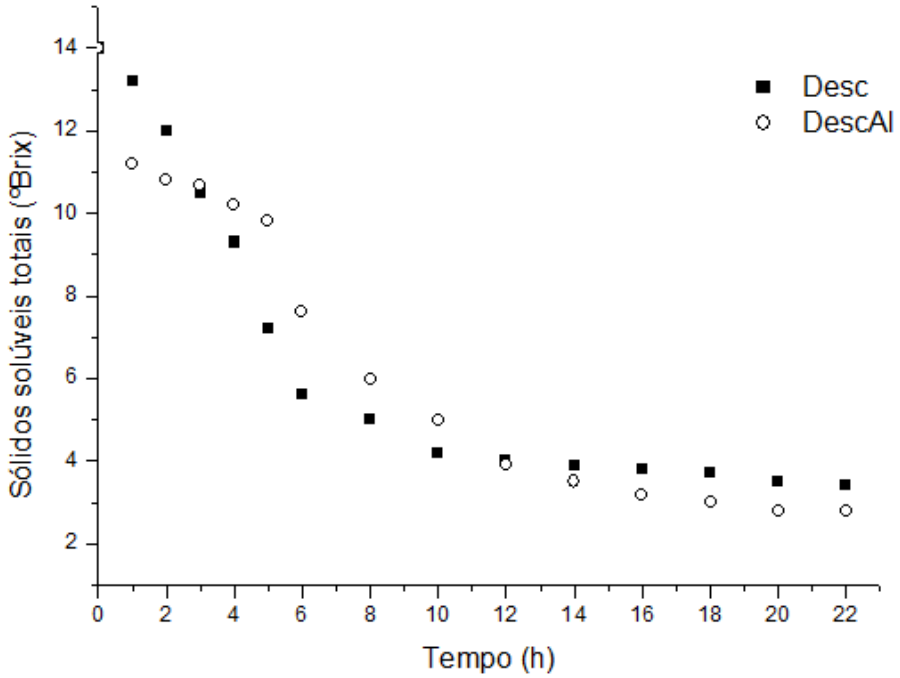
O consumo de açúcares presente no mosto para ambos os processos tiveram aproximadamente o mesmo comportamento do que as amostras apresentadas para as cachaças produzidas em escala de 2,5 litros. A variação do teor de sólidos solúveis (°Brix) durante toda a fermentação para o sistema descontínuo foi de 14 a 3,4 °Brix. Já para o processo descontínuo alimentado o teor de sólidos solúveis ao final da fermentação foi de 14 para 2,8 °Brix. Ao observar a Figura 11, percebeu-se que, para o sistema descontínuo alimentado, o teor de sólidos solúveis permaneceu praticamente constante nas 5 primeiras horas, ocorrendo um leve decaimento de 11,2 a 9,8 °Brix sendo este o tempo de enchimento do biorreator. Para o sistema descontínuo, neste mesmo intervalo de tempo, houve um decaimento do °Brix de 13,2 para 7,5 °Brix, tendo assim um consumo maior de substrato.

Com a ampliação de escala, pode-se comprovar que a adição de substrato quando realizada de maneira gradual torna a adaptação e o desenvolvimento preliminar

do micro-organismo mais apropriada, pelo fato de ser realizada de forma gradativa e menos agressiva quando comparado com o processo descontínuo.

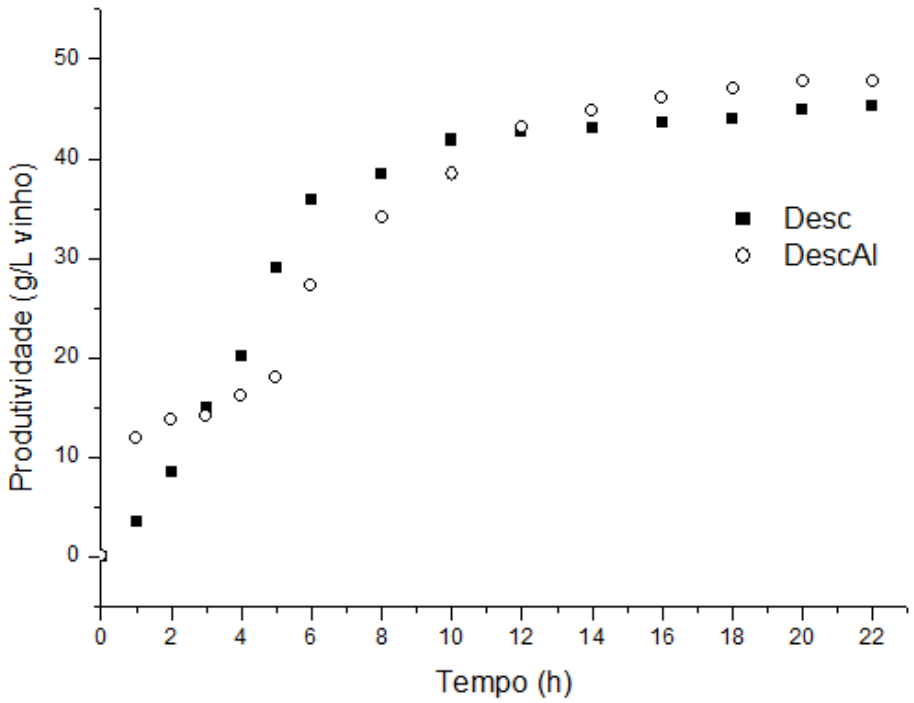
A produção de etanol durante a fermentação permitiu obter resultados semelhantes aos da escala anterior, sendo que, em média os valores encontrados para o processo em escala de 4 litros foram de 45,26 g/L de vinho para o sistema descontínuo e 47,83 g/L para o sistema descontínuo alimentado. Ao analisar a Figura 12, pode-se observar que a produção de etanol no sistema descontínuo foi maior nas 5 primeiras horas quando comparado com o descontínuo alimentado, onde este se manteve praticamente constante no mesmo intervalo de tempo. Isso indica que o consumo de substrato (sacarose) para o sistema descontínuo alimentado foi menor quando comparado com o sistema descontínuo e, como consequência, ocasionou uma taxa menor de produção de etanol (GUIDINI, 2013).

Figura 11 - Acompanhamento do °Brix durante toda a fermentação para o processo descontínuo e descontínuo alimentado de 4L.



Legenda: Desc – Processo descontínuo; DescAl – Processo descontínuo alimentado.

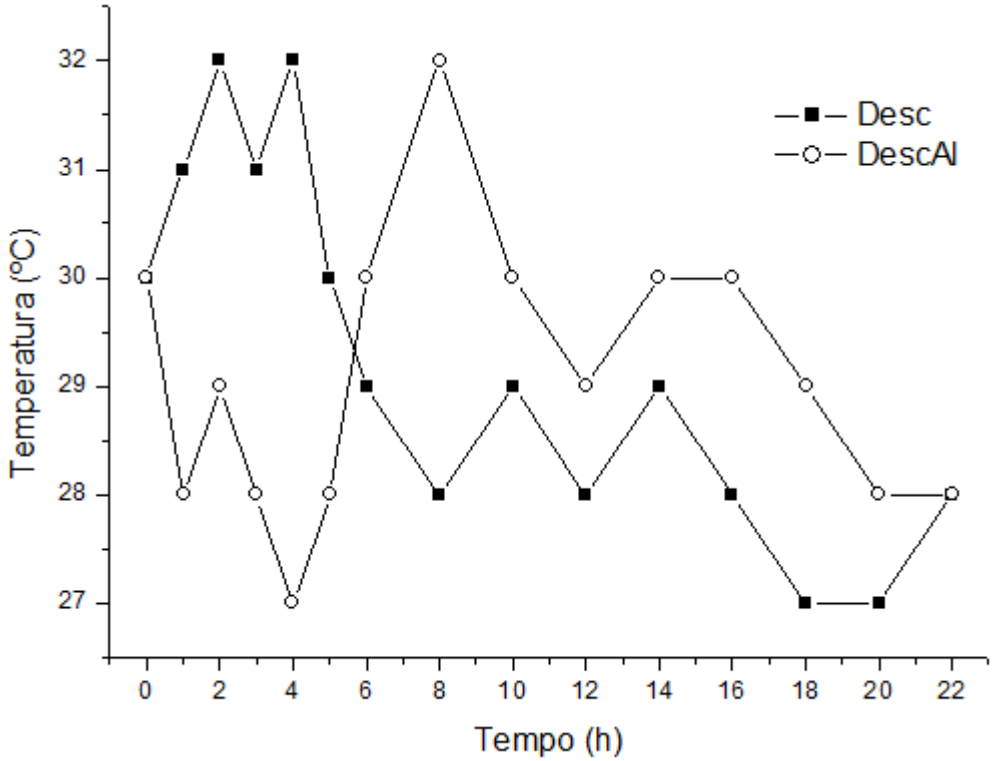
Figura 12 – Produção de álcool durante a fermentação descontínua e descontínua alimentada de 4L.



Legenda: Desc – Processo descontínuo; DescAl – Processo descontínuo alimentado.

Quanto ao fator de conversão de substrato em produto (Yp/s), os resultados obtidos em escala de 4 litros foram os mesmos encontrados para o sistema de 2,5 litros, sendo estes de 0,41 g/g, levando a uma eficiência de fermentação de aproximadamente 80% para ambos os processos fermentativos. Esses valores foram iguais aos encontrados por Carvalho, Canilha e Silva (2008), que obtiveram uma eficiência de fermentação de 80,4 % e um fator de conversão de substrato em produto de 0,41 g/g para fermentação de mosto de caldo-de-cana para produção de cachaça. Ribeiro (2016) encontrou resultado de 70, 7% para fermento natural e 80,2% utilizando levedura CA-11. Para ambos os resultados, a fermentação ocorreu em mosto de caldo-de-cana, com processo conduzido em batelada alimentada e com tempo de enchimento de 2 horas. Sendo assim, os valores encontrados no presente trabalho se mostraram pertinentes quando comparados com outros autores.

Figura 13 – Comportamento da temperatura para o processo descontínuo e descontínuo alimentado.



Legenda: Desc – Processo descontínuo; DescAl – Processo descontínuo alimentado.

A temperatura durante a fermentação foi acompanhada em banho-maria a 30 °C, sendo que, durante o processo ocorreram algumas variações no comportamento da temperatura conforme a Figura 13. Mesmo ocorrendo essas variações durante o processo, a faixa de temperatura permaneceu próxima aos valores considerados como adequados para fermentações alcoólicas, que são entre 25 a 35 °C (LIMA, 2001a; CARDOSO, 2006).

5.2.2 Análises físico-químicas da cachaça

A partir da obtenção do mosto fermentado, este foi levado diretamente para a operação unitária de destilação, não ocorrendo às etapas de decantação e centrifugação. O tempo gasto para a destilação foi de aproximadamente 4 horas e 30 minutos, bem próximos ao encontrado para o sistema em escala de 2,5 litros que foi de 4 horas. Acredita-se que esse aumento de 30 minutos na destilação foi pelo fato do aumento do volume do mosto fermentado de 1,5 litros no equipamento.

5.2.2.1 Obtenção do Teor alcoólico

O teor alcoólico da fração coração entre os processos foi diferente, sendo que, no modo descontínuo obteve-se um teor alcoólico de 42 °GL e já no modo descontínuo alimentado o valor foi de 43 °GL. Acredita-se que isso tenha acontecido pela variação dos volumes de destilado obtido em cada fração e pelo fato de uma formação maior de compostos (álcoois superiores) na fração coração durante a fermentação descontínua alimentada, o que fez com que a graduação alcoólica fosse maior quando comparada com o descontínuo, conforme a Tabela 9.

Tabela 9 – Teor alcoólico (°GL) para os processos descontínuo e descontínuo alimentado.

	Frações dos destilados		
Biorreatores	**Cabeça**	**Coração**	**Cauda**
Descontínuo	60	42	15
Desc. Alimentado	62	43	15

Tabela 10 – Resultados encontrados para volumes (mL) de cada fração para os processos descontínuo e descontínuo alimentado.

	Frações dos destilados		
Biorreatores	**Cabeça**	**Coração**	**Cauda**
Descontínuo	150	450	180
Desc. Alimentado	160	480	190

5.2.2.2 Concentração de álcoois superiores e ésteres totais

As análises de ésteres totais e álcoois superiores realizadas para a fração coração estão apresentadas na Tabela 11, onde em ambos os processos de condução de fermentação, não foi detectada a presença de metanol, 2-butanol e álcool alélico na fração coração. Já a quantidade de álcoois superiores para o processo descontínuo alimentado foi maior do que o valor encontrado para o processo descontínuo.

Mesmo tendo essa diferença na concentração de álcoois superiores, as duas amostras analisadas estão dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira, onde o limite máximo é de 360 mg/ 100mL de álcool anidro (BRASIL, 2005a).

Tabela 11 - Resultados ésteres totais e álcoois superiores para o sistema descontínuo e descontínuo alimentado (valores em mg/100mL de álcool anidro).

Composto	Batelada	Batelada Alimentada	Limites MAPA
Acetato de etila	-	0,53±0,311	Max: 200
Metanol	-	-	
2-butanol	-	-	
Álcool alélico	-	-	
Álcoois isobutílicos (2-metil-1-propanol, 1 e 3-metil-1-butanol)	15,35±0,86[b]	33,71±0,342[a]	Max: 360

Quanto ao acetato de etila, este é o principal éster encontrado na cachaça, sendo formado através da reação entre pequenas quantidades de etanol e ácido acético, provenientes do processo de fermentação. Em pequenas quantidades na cachaça, apresenta aroma agradável de frutas; no entanto, em grandes quantidades, pode proporcionar à bebida um sabor indesejável e enjoativo (CANUTO, 2013).

O acetato de etila apresentou uma pequena composição no processo descontínuo alimentado, sendo este de 0,53 mg/100mL de álcool anidro. Ribeiro (2016) encontrou uma composição de 37,16 mg/100mL de álcool anidro para mosto de caldo-de-cana clarificado, 32,75 mg/100mL de álcool anidro para mosto não clarificado, utilizando levedura natural em ambos os processos, 9,15 mg/100mL de álcool anidro para mosto clarificado e 20,3 mg/100mL de álcool anidro para mosto de caldo-de-cana não clarificado, ambos utilizando levedura selecionada *S. cerevisiae* CA-11. Como pode ser observado, a composição de acetato de etila no presente trabalho foi bem inferior ao encontrado por Ribeiro (2016), mas todas dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira.

Acredita-se que essa inferioridade quando comparada com os resultados encontrados por Ribeiro (2016), deve-se ao fato de que o acetato de etila apresenta uma baixa temperatura de ebulição (74,3 °C) e por estar presente em sua maior composição na fração cabeça, pode ter ocorrido perdas deste composto durante o fracionamento na destilação, levando a uma baixa concentração no produto final.

5.2.2.3 Acidez volátil

Outro parâmetro analisado foi a acidez volátil (Tabela 12). Sendo indesejável em grandes quantidades na cachaça, está ligado diretamente à qualidade sensorial da

bebida. Para os dois processos avaliados, ambos se apresentaram dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira, tendo como composição máxima estipulada pelo MAPA de 150 mg/100 mL álcool anidro.

Tabela 12 – Resultados de acidez volátil para os processos descontínuo e descontínuo alimentado (expressos em mg/100 mL de álcool anidro).

Fração	**Processo**	
	Descontínuo	Descontínuo Alimentado
Cabeça	21,432±0,0077[e]	17,241±0,0093[f]
Coração	28,385±0,0130[d]	27,537±0,0068[c]
Cauda	87,341±0,0057[b]	116,383±0,0066[a]

Segundo Cardoso (2001), a acidez volátil pode ser formada através de contaminação de micro-organismos como bactérias acéticas. Segundo este autor, para minimizar a ocorrência da acidez volátil é necessário o controle de alguns fatores durante a fermentação, como: cultura de levedura a ser utilizada, pureza da fermentação, tempo e temperatura da fermentação, manejo adequado do mosto e higienização. De acordo com Bizelli, Ribeiro e Novaes (2000), uma alta concentração de acidez volátil pode ser ocasionada por uma má fermentação ou higienização inadequada do alambique, podendo ser reduzida através de uma bidestilação, que nada mais é realizar duas destilações sucessivas.

A forma de condução do processo não influenciou diretamente a formação de acidez volátil, pois, os resultados para ambos os processos ficaram bem próximos. O aumento da acidez volátil foi gradativo conforme o fracionamento ocorrido na destilação, onde no sistema descontínuo obteve-se uma composição de 21,43 mg/100 mL de álcool anidro na fração cabeça chegando ao fim da destilação com uma composição de 87,34 mg/100 mL de álcool anidro na fração cauda. Já no processo descontínuo alimentado, este apresentou uma composição de 17,24 mg/100 mL de álcool anidro na fração cabeça e de 116,38 mg/100 mL de álcool anidro na fração cauda.

Este mesmo comportamento foi observado por Bosqueiro (2010), pois o ácido acético, principal responsável pela composição da acidez volátil, tem um comportamento hidrofílico, interagindo fortemente com a água e fracamente com o etanol. Sendo assim, a maior composição da acidez volátil foi obtida no final do processo de destilação, na fração cauda, quando a água está presente em maior

quantidade. Pode-se levar em consideração também que condições adequadas de fermentação proporcionam menores riscos de contaminação de micro-organismos, como as bactérias acéticas, e consequentemente levam a menores concentrações da acidez volátil no meio (CARDOSO, 2001).

6 CONCLUSÕES

A cachaça produzida no presente trabalho atendeu as especificações de qualidade estabelecidas pela legislação brasileira para ambos os processos estudados.

A cinética da fermentação dos processos permitiu obter resultados próximos para as duas formas de condução estudadas quanto à produção de álcool, fator de conversão de substrato em produto e eficiência de fermentação. No entanto, o sistema descontínuo alimentado apresentou uma produtividade de etanol maior em ambas as escalas de produção, sendo elas: 2,18 g/L.h (escala de 2,5 litros) e 2,17 g/L.h (escala de 4 litros).

Ao avaliar as formas de recuperação de etanol após o processo fermentativo, não foi verificada diferença em relação à qualidade do produto final. Em função da facilidade de operação, a forma de recuperação escolhida foi o uso de mosto fermentado sem decantação antes da destilação.

Todas as amostras de cachaça analisadas apresentaram valores de acidez volátil, álcoois superiores e aldeídos dentro dos parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira.

De maneira geral, o processo descontínuo alimentado foi a forma de condução indicada para produção da cachaça em escala industrial, em função das características cinéticas do processo e físico-químicas do destilado.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.R. **Processo de recuperação de levedura ou processo Melle-Boinot.** In: Semana da Fermentação Alcoólica, Anais, p.254-262, Piracicaba, 1960.

ANDRADE, L. A. B.; ANJOS, I. A.; FIGUEIREDO, P. A. M.; QUINTELA, A. C. R. **Utilização de variedades selecionadas de cana-de-açúcar na produção de cachaça de alambique**. Informe Agropecuário, EPAMIG, v. 23, n. 217, p. 33-36, 2002.
ANDRIETTA, S. R.; STUPIELLO, J. P. **Simulação e modelagem para processo de fermentação alcoólica (II) contínua**. Stab Açúcar, Álcool e subprodutos, Piracicaba, v. 9, p. 45-51, set./dez. 1990.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; **Biotecnologia Industrial** – Biotecnologia na produção de alimentos. v.4, São Paulo: Blücher, 2011. 523 p.

BIZELLI, L. C.; RIBEIRO, C. A. F; NOVAES, F. V. **Dupla destilação da aguardente de cana: teores de acidez total e de cobre**. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 623-627, 2000.

BORGES, P. C. S. **Otimização dinâmica da fermentação alcoólica no processo em batelada alimentada**. 2008. 162 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

BOSQUEIRO, A. C. **Composição química da aguardente de cana-de-açúcar ao longo do processo de dupla destilação em alambique simples.** 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP, 2010.

BOZA, Y.; HORII, J. Influência do grau alcoólico e da acidez do destilado sobre o teor de cobre na aguardente**. Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas. v.20, n.3, p.279-284, 2000.

BRASIL. Decreto n. 2.314, de 4 de setembro de 1997. Regulamenta a lei n° 8.918 de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 5 set. 1997.

BRASIL. Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005, dispõe sobre regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 29 jun. 2005a.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), **Instrução Normativa n. 24 de 08 de setembro de 2005**. Aprova o Manual operacional de bebidas e vinagres. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 20 set. 2005b.

CARDOSO, M.G. **Produção de aguardente de cana**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006. p.203-232.

CANTÃO, F. O. **Análises físico-químicas e avaliação da presença do Cobre em aguardentes de cana por aluminossilicatos,** 2006. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Lavras. Programa de Pós-graduação em Agronomia, Lavras, MG, 2006.

CLETO, F. V. G.; MUTTON M. J. R. **Rendimento e composição das aguardentes de cana, laranja e uva com utilização de lecitina no processo fermentativo**. Ciência agrotécnica, Lavras, v. 28, n.3, p. 577-584, 2004.

CANUTO, M. H. **Influência de alguns parâmetros na produção de cachaça: linhagem de levedura, temperatura de fermentação e corte do destilado.** 2013. 119 f. Tese (Doutorado Ciências) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

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

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. **Fermentação Descontínua.** In: Schmidell, Willibaldo et al. (coord). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blucher, p. 193-204. (Biotecnologia Industrial; v. 2), 2001a.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. **Fermentação Descontínua Alimentada.** In: Schmidell, Willibaldo et al. (coord). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blucher, p. 205-2018. (Biotecnologia Industrial; v. 2), 2001b.
CHANG, R. **Química.** 5 ed. Lisboa: McGraw-Hill 1994.

CRUZ, M. L. **Avaliação das condições de processo na resistência da levedura ao teor final de etanol na fermentação alcoólica.** 2015. 100 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia "Faculdade de Engenharia Química", Uberlândia, MG, 2015.

DE SOUZA, J. L. ; MONTEIRO, R. A. **Fatores interferentes na fermentação alcoólica para a produção de etanol**. p. 100–107, 2011.

FERREIRA, R. M. **Modelagem e Simulação de Biorreatores Tipo Torre Operando com Leveduras Auto-imobilizáveis para Produção de Etanol**, 2003. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP, 2003.

FONTAN, R. DA C. I. et al. Cinética da fermentação alcoólica na elaboração de vinho de melancia. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 203–210, 2011.

GUIDINI, C. Z. **Fermentação alcoólica em batelada alimentada empregando *Saccharomyces cerevisiae* de características floculantes.** 2013. 148 f. Tese

(Doutorado – Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2013.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.R (Coord.) **Biotecnologia Industrial**. v.2, São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 93-122p.

JANZANTTI, N.S. **Compostos voláteis e qualidade de sabor da cachaça.** 2004. 193 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, 2004.

LÉAUTÉ, R. Distillation in alembic. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 41, p. 90-103, 1990.

LESSMANN, W.F. **Estudo do processo descontínuo alimentado para a produção de amiologlicosidase por Aspergillus awarnori NRRL3112 para concentrações de polissacarídeo de 40 e 80 g/L.** 1993. Dissertação (Mestrado) Escola Politécnica - USP, São Paulo, Brasil, 1993.

LIMA, U. A. Produção de etanol. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDT, W (Coord.) **Biotecnlogia Industrial.** v.3, São Paulo: Edgar Blucher, 2001a. 01-43p.

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. **Biotecnologia Industrial – Processos Fermentativos e Enzimáticos.** In: Schimidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. vol.1, cap.1: Produção de Etanol, p.1-43, 2001.

LIMA, U. A. Aguardentes In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W (Coord.) **Biotecnologia Industrial.** v.4, São Paulo: Edgar Blucher, 2001b. 145-180p.

LIMA, U. A. **Aguardente**: fabricacao em pequenas destilarias. 1ª ed. Piracicaba: Fundacao de Estudos Agrarios Luiz de Queiroz, 1999. 187 p.

LIMA, L.R.; MARCONDES, A.A. **Álcool carburante: uma estratégia brasileira**. Ed. UFPR, Curitiba, 2002. 248 p.

LOPES, R. L. T. **Dossiê Técnico-Processamento de cachaça de alambique**. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais - CETEC; Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas, 2007. Disponível em: <www.respostatecnica.org.br>. Acesso em: 30 mar. 2016.

MAIA, A.B.R. Componentes voláteis da aguardente. **STAB, Piracicaba,** v.12, n.6, p.29-34, 1994.

MAIA, A. B. R. A.; CAMPELO, E. A. P. **Tecnologia da cachaça de alambique.** Belo Horizonte: SEBRAE/MG; SINDBEBIDAS, 2005. 129 p.

MALTA, H.L. **Estudos de parâmetros de propagação de fermento (Saccharomyces cerevisiae) para produção de cachaça de alambique. Belo Horizonte**: Faculdade de

Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2006. 70 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).

MASSON, J. **Parâmetros físico-químicos e cromatográficos em aguardente de cana queimada e não queimada**, 2005. 69 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2005.

MENDEZ, T. A. O. et al. Aumento na produção de biomassa de levedura em propagador aerado por processo descontínuo e semicontínuo para produção de cachaça Increase in yeast biomass production in batch and semi-continuous. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, n. 2, p. 81–89, 2013.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry,** v. 31, n. 3, p. 326-428. 1959.

MIRANDA, M. B.; MARTINS, N. G. S.; BELLUCO, A. E. S.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Qualidade química de cachaças e de aguardentes brasileiras. **Ciência e tecnologia de Alimentos,** Campinas, v.27, p. 897-901, 2007.

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. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MONTEIRO, B. M. S. **Composição química de aguardentes de cana-de-açúcar obtidas por fermentação com diferentes cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae***. 2010. 73 f. Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2010.

MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A.; Aguardente de cana. Cap. II **In: FILHO, W. G. V. et al., Bebidas alcoólicas**. v.1, São Paulo: Blucher, 2010. 237-266p.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1274p.

OSHITA, D. et al. Determinação direta e simultânea de Al, As, Fe, Mn e Ni em cachaça por espectrometria de absorçãoo atômica em forno de grafite. **Ecletica Quimica**, v. 28, n. 1, p. 91–96, 2003.

PATARO, C. et al. Yeast communities and genetic polymorphism of Saccharomyces cerevisiae strains associated with arisanal fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 24–31, 2000.

PATARO, C. et al. Utilização de leveduras selecionadas na fabricação de cachaça de alambique. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 37-43, 2002.

PEIXOTO, C.R.M.; COSTA JUNIOR, R.R.; GUIMARÃES. R.G.; SANTOS, B.T.; LOPES, T.J.; PAGNUSSATT, F.A.; SILVA, A.da. Análise estatística paramétrica de fatores de operação no processo de fermentação para obtenção de cachaça. **Revista**

Brasileira de Pesquisa em Alimentos, v.7, p.16, 2016.

RIBEIRO, M. L. D. **Qualidade da cachaça em função do tratamento do caldo e tipo de fermento.** 2016. 61 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, SP, 2016.

RIBEIRO, C. A. F.; HORII, J. **Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana**. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 2, p. 255-263, 1999.

SILVA, José Alexandro. et.al. **Aplicação da Metodologia de Planejamento Fatorial e Análise de Superfícies de Resposta para Otimização da Fermentação Alcoólica**.Universidade Estadual da Paraíba.Química Nova.2008.Vol.31.

SOARES, T. L.; SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F. Acompanhamento do processo de fermentação para produção de cachaça através de métodos microbiológicos e físico-químicos com diferentes isolados de Saccharomyces cerevisiae. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 004115, p. 184–187, 2011.

SORATTO, A. N.; VARVAKIS, G.; HORII, J. A certificação agregando valor à cachaça do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 681–687, 2007.

SOUZA, L.G.; LLISTÓ, A.S.M. Alguns componentes do coeficiente não alcoólico das aguardentes de cana: Determinação por cromatografia de fase gasosa. **Brasil Açucareiro,** Rio de Janeiro, n.3, p.109-112, 1978.

STROPPA, C. T. et al. Parâmetros cinéticos de linhagens de levedura isoladas de alambiques mineiros. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 33, n. SUPPL., p. 1978–1983, 2009.

TONIATO, J. **Determinação de parâmetros cinéticos de fermentação alcoólica em diferentes substratos.** 2013. 50 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, SP, 2013.

VARGAS, E. A.; GLÓRIA, M. B. **Qualidade da aguardente de cana (*Saccharum officinarum,* L.) produzida, comercializada e/ou engarrafada no Estado de Minas Gerais.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 15, n.1, p. 43-46, 1995.

YOKOYA, F. **Fabricação de aguardente de cana**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", 1995. 87 p.