



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**CURSO DE DOUTORADO**

**PRODUÇÃO DE FERMENTADO ALCOÓLICO DE  
CANA-DE-AÇÚCAR, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO SEU  
ENVELHECIMENTO**

**JOSÉ TORQUATO DE QUEIROZ TAVARES**

**CRUZ DAS ALMAS - BA**  
**NOVEMBRO - 2009**

**PRODUÇÃO DE FERMENTADO ALCOÓLICO DE  
CANA-DE-AÇÚCAR, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO SEU  
ENVELHECIMENTO**

**JOSÉ TORQUATO DE QUEIROZ TAVARES**

Engenheiro Agrônomo

Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia, 1980

Tese submetida à Câmara de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

**Orientador: Prof. Dr. RICARDO LUÍS CARDOSO**

**Co-orientador: Prof. Dr. PEDRO AFONSO DE PAULA PEREIRA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
DOUTORADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2009

## FICHA CATALOGRÁFICA

T231 Tavares, José Torquato de Queiroz.  
Produção de fermentado alcoólico de cana-de-açúcar:  
caracterização e avaliação do seu envelhecimento / José  
Torquato de Queiroz Tavares. \_ Cruz das Almas, BA, 2009.  
117 f.: il.

Orientador: Ricardo Luís Cardoso.  
Co-orientador: Pedro Afonso de Paula Pereira

Tese (Doutorado) – Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e  
Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2009.

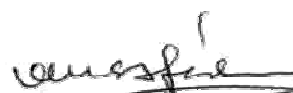
1. Cana de açúcar – fermentação 2. *Saccharum hybrida*. 3. Cana  
de açúcar - caracterização. 4. Cana de açúcar – perfil volátil. I.  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Centro de Ciências  
Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

CDD: 663.13

**COMISSÃO EXAMINADORA**



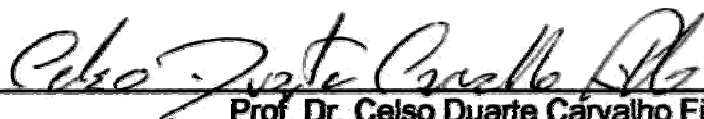
**Prof. Dr. Ricardo Luís Cardoso**  
**Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - UFRB**  
**(Orientador)**



**Prof.ª Dr.ª Elisa Teshima**  
**Engenharia de Alimentos - UEFS**



**Dr.ª Elizeth de Souza Viana**  
**Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical - Embrapa**



**Prof. Dr. Celso Duarte Carvalho Filho**  
**Faculdade de Farmácia - UFBA**



**Prof. Dr. André Dias de Azevedo**  
**Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas - UFRB**

Tese homologada pelo Colegiado do Curso de Doutorado em Ciências Agrárias em .....

Conferindo o Grau de Doutor em Ciências Agrárias em .....

## DEDICATÓRIA

*A minha esposa Noelia Sampaio Tavares, por fazer parte da minha vida, pelo amor, companheirismo, amizade, pelo apoio em minhas batalhas, estando incondicionalmente disposta a ajudar e dizer as palavras mais encorajadoras e oportunas em todos os momentos.*

*Aos meus filhos Bruno César e José Torquato pelo apoio, incentivo e força.*

**OFEREÇO**

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, pela benção da vida e por ser o farol da minha existência.

A minha esposa pela força constante e incansável, pelo sacrifício dos dias, noites e finais de semana na luta conjunta para a conclusão deste desafio e aos meus filhos pelo estímulo e apoio.

Ao meu orientador Ricardo Luís Cardoso pela orientação e amizade.

Ao meu co-orientador Pedro Afonso de Paula Pereira pelo aprendizado em novas áreas de conhecimento, pela orientação e por todo seu apoio, suporte estratégico e logístico para a realização de grande parte do trabalho

Aos meus orientados e amigos Lucas Athayde Oliveira e Frederico dos Santos Lordelo, pelo apoio no desenvolvimento do trabalho desde os ensaios preliminares.

A o colega e amigo Adalberto Menezes Filho pela orientação do uso dos equipamentos e pela grande ajuda e amizade.

Ao amigo Sérgio Roberto Lemos de Carvalho, pelos ensinamentos e orientações na análise estatística multivariada, por me receber em sua casa no período de férias para me ajudar. Agradeço também a toda sua família pela paciência e receptividade.

À Elen Motta (Lili), pelo apoio durante o processamento dos dados para a análise estatística.

Ao colega Fábio Santos de Oliveira que se prontificou a me ajudar na análise multivariada mesmo sem me conhecer.

Ao amigo Jorge Antônio Gonzaga Santos pela grande ajuda nas correções e traduções para o inglês.

Ao amigo e professor Carlos Alberto Ledo pelos ensinamentos e ajuda na estatística.

Ao amigo João Albany Costa pela grande ajuda e explicações da estatística.

Ao colega e amigo Antônio Augusto Fonseca pela força e estímulo.

Aos professores Márcia, Givanildo e André pelo apoio durante o período de afastamento.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da UFRB pelos conhecimentos transmitidos.

A todos os professores das disciplinas cursadas como aluno especial na Faculdade de Farmácia e Instituto de Química da UFBA pelos conhecimentos transmitidos e amizade.

A Bibliotecária Isaelce pelas correções e sugestões nas referências

Aos Membro da Banca de Defesa de tese Elisa Teshima, Celso Duarte Carvalho Filho, Elizeth de Souza Viana e André Dias de Azevedo pela grande contribuição nas correções e sugestões.

Ao CNPq, a FAPESB, PRONEX, FINEP e CAPES pelo apoio através do Laboratório de Pesquisas Avançadas em Química (LPQ) do Instituto de Química da UFBA.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pela oportunidade de realização deste curso.

Ao CETEC, através da sua direção e todo seu corpo docente pelo apoio.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram com a realização deste trabalho.

*MUITO OBRIGADO.*

*Cada um que passa em nossa vida  
passa sozinho,  
pois cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra.  
Cada um que passa em nossa vida  
passa sozinho,  
mas não vai só,  
nem nos deixa sós:  
leva um pouco de nós mesmos,  
deixa um pouco de si mesmo.  
Essa é a maior responsabilidade em nossas vidas  
e a prova evidente  
de que duas pessoas não se encontram ao acaso.*

*Antoine de Saint-Exupéry*



## SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO .....	01
<b>Capítulo 1</b> PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FERMENTADOS ALCOÓLICOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRODUZIDOS A PARTIR DE GARAPA NATURAL E PASTEURIZADA .....	43
<b>Capítulo 2</b> ANÁLISE DE COV POR HS-SPME E CG-MS EM FERMENTADOS ALCOÓLICOS DE CANA-DE-AÇÚCAR NATURAL E PASTEURIZADO, ENVELHECIDOS EM GARRAFAS E BARRIS DE CARVALHO .....	64
<b>Capítulo 3</b> EVOLUÇÃO DE COV AO LONGO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO E ENVELHECIMENTO DE FERMENTADO ALCOÓLICO DE CANA-DE- AÇÚCAR .....	85
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	104

## LISTA DE ABREVIÇÕES, UNIDADES E SÍMBOLOS

ACP	Análise de Componentes Principais
AF	Acidez fixa
ANOVA	Análise de Variância
AR	Açúcares redutores
ANR	Açúcares não redutores
AT	Açúcares Totais
ATT	Acidez total titulável
DVB	Divinilbenzeno
ELL, EFS	Extração líquido líquido, extração em fase sólida
CAR	Carboxen
CCAAB	Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas
CW	Carbowax
CG/EM	Cromatografia a gás/espectrometria de massa
CG	Cromatografia a Gás
COV	Composto(s) orgânico(s) volátil(eis)
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
FN	Fermentado alcoólico de cana obtido da garapa natural
FP	Fermentado alcoólico de cana obtido da garapa pasteurizada
FNG	Fermentado de cana natural envelhecido em garrafa
FNB	Fermentado de cana natural envelhecido em barril
FPG	Fermentado de cana pasteurizado envelhecido em garrafa
FPB	Fermentado de cana pasteurizado envelhecido em barril
GN	Garapa natural (sem pasteurizar)
GP	Garapa pasteurizada
g, mg, µg, ng, kg	Grama, miligrama, micrograma, nanograma, quilograma
g L <sup>-1</sup> , ng L <sup>-1</sup> , mg L <sup>-1</sup>	Grama por litro, nanograma por litro, miligrama por litro
g hL <sup>-1</sup>	Grama por hectolitro
° Brix	Graus Brix
° C	Graus Celsius
° C min <sup>-1</sup>	Graus Celsius por minuto
° GL	Graus Gay Lusac

HCl	Ácido Clorídrico
IAL	Instituto Adolfo Lutz
<i>I</i>	Índice de retenção de Kováts
<i>I</i> <sup>T</sup> , IRL	Índice de retenção linear
MM	Massa molar
m/v	Massa/volume
m/z	Massa/carga
m, µm	Metro, micrômetro
M, mol L <sup>-1</sup>	Molar, 1 mol por litro
meq L <sup>-1</sup>	Miliequivalente por litro
MEFS-HS	Micro extração em fase sólida em <i>headspace</i>
min	Minutos
µL, mL, L, hL	Microlitro(s), mililitro(s), litro(s), hectolitro(s)
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
ns	Não significativo
p	Probabilidade
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
pH	Potencial hidrogeniônico
PTV	<i>Programmed temperature vaporizer</i>
seg	Segundos
SST	Sólidos solúveis totais
SO <sub>2</sub>	Sulfito
T.R.	Tempo de retenção
T1N, T2N, T3N	Trasfega 1, 2 e 3 dos mostos obtidos da garapa natural
T1P, T2P, T3P	Trasfega 1, 2 e 3 dos mostos obtidos da garapa pasteurizada
UFRB	Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

# PRODUÇÃO DE FERMENTADO ALCOÓLICO DE CANA-DE-AÇÚCAR, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO SEU ENVELHECIMENTO.

Autor: JOSÉ TORQUATO DE QUEIROZ TAVARES

Orientador: RICARDO LUIS CARDOSO

Co-orientador: PEDRO AFONSO DE PAULA PEREIRA

**RESUMO:** Estudo conduzido em desenho experimental completamente casualizado avaliou o efeito da fermentação da garapa da cana-de-açúcar resultante de dois processos de produção (natural e pasteurizado) e de dois tipos de envasamento (garrafas de vidro ou barris de carvalho) em algumas características físico-químicas e sensoriais do fermentado durante o envelhecimento, com três repetições. Os resultados dos atributos avaliados foram submetidos à análise de variância, testes de médias e análise de componentes principais (ACP). Todas as características avaliadas ficaram dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira. O processo de produção e o tipo de envasamento alteraram significativamente ( $p \leq 0,01$ ) as características físico-químicas (acidez volátil, acidez fixa, sólidos solúveis totais e açúcares), no número e áreas dos picos dos COV dos fermentados durante o envelhecimento, assim como, as características sensoriais fazendo com que a avaliação sensorial do fermentado pasteurizado (FP) fosse superior a do fermentado natural (FN) para a maioria dos atributos. Os fermentados envelhecidos em garrafas apresentaram maior concentração de compostos orgânicos voláteis que os envelhecidos em barril de carvalho. Foram identificados 104 COV comuns aos quatro tipos de bebida. A ACP discriminou os quatro tipos de fermentado. Durante o estudo, foi desenvolvido um método eficiente por micro extração em fase sólida em *headspace* (MEFS-HS) e cromatografia gasosa – espectrometria de massas (CG-EM), para extração e identificação de compostos orgânicos voláteis (COV) formados no processo de vinificação e no envelhecimento.

Palavras-chave: vinho de cana-de-açúcar, *Saccharum hybrida*, perfil volátil, HS/SPME-CG/MS, fermentado de cana.

# **SUGAR CANE WINE PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND AGING EVALUATION.**

Author: JOSÉ TORQUATO DE QUEIROZ TAVARES

Adviser: RICARDO LUIS CARDOSO

Co-adviser: PEDRO AFONSO DE PAULA PEREIRA

**ABSTRACT:** Study in a completely randomized experimental design evaluated the effect of brewing sugar cane juice yielded from two production process (natural and pasteurized), and stored in two aging containers (glass bottle and oak barrels) in selected physical-chemical and sensory characteristics of the fermented, with three replications. The results of the evaluated parameters were submitted to analysis of variance, mean test and principal component analysis (PCA). All observed characteristics were within the limits established by Brazilian legislation. Both, the production process and store containers influenced significantly ( $p \leq 0.01$ ) the physical-chemical characteristics (volatile acidity, fixed acidity, soluble solids and sugars), VOCs number and peaks area of the brew during the aging period and the sensory characteristics. For most attributes evaluated pasteurized sugar cane alcoholic beverage (FP) was superior to the natural sugar cane alcoholic beverage (FN). The fermented aged in glass bottles showed a higher concentration of volatile organic compounds that aged in oak barrels. It was identified 104 VOCs common to the four types of drink. The ACP analyze discriminated four types of sugar cane alcoholic beverage. The garapa pasteurization caused increase in concentration, expressed as peak areas, in the most volatile and increasing the VOCs number. The pasteurization affected the sensory characteristics. During the study, it was developed an efficient method for micro solid phase extraction in headspace (HS-SPME) and gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) for extraction and identification of volatile organic compounds (VOCs) formed in winemaking and aging

Keywords: sugar cane wine, *Saccharum hybrida*, volatile profile, HS/SPME-GC-MS, sugar cane fermented.

## INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*) é uma planta originária do sudeste da Ásia, onde é cultivada desde épocas remotas, principalmente a espécie *S. officinarum*. O surgimento de várias doenças e de uma tecnologia mais avançada exigiu a criação de híbridos através do cruzamento da *S. officinarum* com outras quatro espécies do gênero *Saccharum* e, posteriormente, por meio de retrocruzamento foram obtidas novas variedades e cultivares (MARAFANTE, 1993).

A importância da cana-de-açúcar pode ser atribuída à sua múltipla utilização: é processada com a retirada do colmo (caule), que é esmagado, liberando o caldo que é concentrado por aquecimento, resultando no mel, a partir do qual o açúcar é cristalizado, tendo como subproduto o melaço ou mel final. O colmo pode também ser consumido in natura (mastigado), ou então usado para fazer caldo de cana (garapa), melado e rapadura, podendo também ser usada na alimentação animal (MARAFANTE, 1993).

O caldo também pode ser utilizado na produção de etanol, através de processo fermentativo, além de bebidas destiladas como cachaça ou rum e outras bebidas alcoólicas. Já as fibras, principais componentes do bagaço, podem ser usadas como matéria prima para produção de energia elétrica, através de queima e produção de vapor em caldeiras que tocam turbinas, e etanol, através de hidrólise enzimática ou por outros processos que transformam a celulose em açúcares fermentáveis (CESNIK, 2004).

No Brasil, a cultura da cana-de-açúcar está instalada em uma área superior a seis milhões de hectares, Com uma estimativa de produção de mais de 622 milhões de toneladas de cana, conforme dados de abril de 2009 para a safra 2009/2010, e que são destinados à fabricação de açúcar, álcool e outros usos (CONAB, 2009).

A produção mundial de cana-de-açúcar totaliza quase 1,4 bilhão de toneladas e está localizada predominantemente na faixa tropical do planeta, nos países em desenvolvimento da América Latina, África e do Sudeste Asiático. Quase metade da

produção mundial de cana-de-açúcar é assegurada atualmente por quatro nações das Américas - Brasil, Cuba, México e Estados Unidos. Seguem-se, pela importância de suas safras, países asiáticos como a Índia, a China e as Filipinas. O Brasil é líder mundial na produção de cana-de-açúcar, tendo processado cerca de 487 milhões de toneladas na safra 2007/2008, dos quais cerca de 90 % na região Centro-Sul, e 10 % na Nordeste (UNICA, 2009, CONAB, 2009).

Os primeiros relatos sobre a fermentação vêm dos egípcios antigos por volta de 6000 anos quando foi descoberta. “Curam várias moléstias, inalando vapor de líquidos aromatizados e fermentados, absorvido diretamente do bico de uma chaleira, num ambiente fechado” (ALMEIDA, 2008).

Conforme o mesmo autor (ALMEIDA, 2008), foram os árabes que descobriram os equipamentos para a destilação, semelhantes aos que conhecemos hoje. Portugal também utilizou a tecnologia dos árabes e passou a destilar a bagaceira a partir do bagaço de uva.

Os primeiros colonizadores que vieram para o Brasil, apreciavam a bagaceira portuguesa e o vinho d'Porto. Assim como a alimentação, toda a bebida era trazida da corte. Num engenho da Capitania de São Vicente, entre 1532 e 1548, descobrem o vinho de cana-de-açúcar - garapa azeda, proveniente dos tachos de rapadura, que ficam ao relento em cochos de madeira para os animais. A cagaça é uma bebida limpa, em comparação com o cauim - bebida produzida pelos índios, na qual todos cospem num enorme caldeirão de barro para ajudar na fermentação do milho ou da mandioca. Os senhores de engenho passam a servir o tal caldo, denominado cagaça, para os escravos. Daí surgiu o modo de destilar a cagaça, nascendo aí a cachaça (A HISTÓRIA DA CACHAÇA, 2008).

Segundo Rosier, (1988) vinho é uma bebida alcoólica, resultante da fermentação do mosto de uvas frescas, sãs e maduras por intermédio de leveduras, as quais transformam o açúcar em álcool e numa série de compostos secundários em quantidades variadas, de modo que o produto adquira características próprias que o identificam como uma das bebidas mais requisitadas. No Brasil é proibida a aplicação do termo “vinho” a produtos obtidos a partir de outras matérias-primas (BRASIL, 2004).

Até o início do ano de 2008 era permitido aos países membros da organização comum do mercado vitivinícola a utilização da palavra "vinho" acompanhada de um nome de fruto e sob a forma de denominações compostas

para a designação de produtos obtidos a partir da fermentação de frutos que não as uvas. Os "vinhos" resultantes eram geralmente designados em função do fruto a partir do qual são obtidos (por exemplo, vinho-de-maçã, vinho-de-laranja) e eram genericamente conhecidos como vinhos de frutas (REGULAMENTO (CE) N.º 1493/1999, 2008). Entretanto, em abril de 2008 foi promulgado e publicado o Regulamento 479/2008 que revoga, entre outros o regulamento 1493/1999 (REGULAMENTO (CE) N.º 479/2008, 2009).

Na África, principalmente em Angola, Congo, e República Democrática do Congo (RDC), a cana-de-açúcar possui três utilidades: é consumida in natura (literalmente, cana para a boca) para matar a sede e/ou aliviar a fome; é usada como matéria prima para a produção de açúcar ou é usada na preparação do vinho da cana-de-açúcar denominado "*lunguila*". (LUZIETOSO et al., 2008).

O processo de produção do vinho da cana-de-açúcar provém do antigo reino do Congo. Os descendentes de várias comunidades que empregam esta tecnologia podem hoje ser encontrados em algumas regiões de Angola, Congo e República Democrática do Congo. Este conhecimento é dominado somente por homens, normalmente anciãos e a matéria prima provém usualmente do auto-abastecimento, sendo o processo artesanal (SLU – M. C. A., 2008).

Nas Filipinas, e região circunvizinha, é produzido um vinho de cana denominado de "*Bas*", onde o caldo de cana-de-açúcar é extraído, fervido e fermentado. Um pé de cuba seco e pulverizado é usado para iniciar a fermentação. A mistura é colocada para fermentar por até três meses, e envelhecer por até um ano. O produto final, de cor marrom claro, é doce e meio ácido, um produto semelhante ao "saque shoto" feito no Japão. (STEINKRAUS, 1996). O envelhecimento é feito em um "*burnay*" (jarro de barro grande), sendo que quanto mais longo o envelhecimento, melhor e mais encorpado é o vinho. O "*tapey*" (vinho de arroz) e o "*bas*" são bebidas tradicionais utilizadas em cerimônias e rituais, fazendo parte da cultura filipina (SLU – M. C. A., 2008).

O vinho provém de uma seqüência de processos químico-biológicos que condicionam a sua composição, em que a multiplicidade de compostos originados é determinante nas características organolépticas que o produto apresenta (DUBERNET, 2000).

A fermentação é a principal etapa do processo de produção do fermentado de cana (vinho-de-cana). Nesta etapa o açúcar e outros compostos presentes no



caldo de cana são transformados em etanol, CO<sub>2</sub> e outros produtos que são responsáveis pelas qualidades e defeitos do produto.

As fermentações são conduzidas em recipientes próprios, fechados, com sistema de escapamento de gases, com batoque hidráulico e de esvaziamento com separação da borra. Conforme Janzanti, (2004), o processo fermentativo inicia-se logo que a levedura entra em contato com o mosto e é dividido em três fases: fase preliminar (pré-fermentação), caracterizada pela adaptação das leveduras e multiplicação celular; fase de fermentação principal (tumultuosa), quando ocorre desprendimento abundante de gás (CO<sub>2</sub>) e produção de álcool e fase de fermentação complementar (pós-fermentação), quando se observa redução acentuada da atividade fermentativa.

O mosto fermentado possui na sua composição produtos gasosos, líquidos e sólidos. Alguns constituintes são provenientes da matéria-prima (caldo da cana) sem nenhuma modificação e outros são formados pela atividade das leveduras inoculadas e de microrganismos contaminantes durante a fermentação. Os gasosos são o ar e o gás carbônico, dissolvidos em pequenas quantidades, enquanto os componentes líquidos são representados por água (80 - 90 %) e etanol (10 - 13 %), resultante principalmente da degradação dos açúcares. Além desses produtos, estão presentes ácidos, glicerina, álcoois superiores (amílico, isoamílico, butílico, isobutílico, propílico e isopropílico), aldeídos e ésteres, entre outros compostos voláteis conferindo as características de sabor e aroma (JANZANTTI, 2004).

Segundo Morais et al.(1997), a fermentação artesanal do mosto para a produção de cachaça caracteriza-se por ser conduzida por uma população mista de leveduras, com predominância de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, e outras espécies de leveduras como *Cândida*, *Kluyveromyces*, *Kloeckera* e *Pichia* em menor quantidade. As leveduras presentes nessas fermentações estão em constante sucessão, devido à introdução de microrganismos que acompanham o caldo de cana, e também às condições do processo.

#### *Etapas da produção de vinhos e fermentados*

São diversas etapas na produção de vinhos e fermentados alcoólicos: a obtenção do material a ser fermentado (frutas ou partes da planta) que é denominado de mosto; seleção; higienização; descascamento ou raspagem; processamento (prensagem, despulpamento ou moagem); preparo do mosto com

adição de nutrientes, sulfitação, correção da acidez e chaptalização; inoculação das leveduras; fermentação; trasfegas; atesto; envelhecimento; clarificação e envase.

Mosto é o caldo ou suco obtido das frutas ou materiais vegetais, depois de espremidas, para elaboração de fermentados e vinhos (AMERINE et al., 1972). O mosto de origem animal utilizado para produção de fermentado é o mel de abelha que dá origem ao hidromel.

A obtenção do mosto é simples, mas merece determinados cuidados. Os frutos ou materiais vegetais devem ser selecionados, devem estar sadios (sem podridões, rachaduras e/ou contaminações por insetos), maduros e suculentos, reunindo qualidades requeridas para obtenção de vinhos ou fermentados apreciáveis (MORETTO et al. 1988).

O mosto é um meio nutritivo, rico em substâncias suficientes para o perfeito desenvolvimento de muitos fungos e bactérias, e como ainda se procura melhorá-lo, visando as necessidades nutricionais das leveduras é indispensável ter cuidado para que outros microrganismos não se desenvolvam e prejudiquem a obtenção de uma boa bebida. Por esse motivo a desinfecção é importante na preparação do mosto e consiste na destruição dos microrganismos prejudiciais existentes, com a lavagem e higienização dos equipamentos e vasilhames, utilizando tratamento térmico e soluções sanitizantes.

Segundo Moretto et al. (1988), a extração do suco para preparação do mosto pode ser feita por esmagamento e difusão (ou maceração). A primeira extrai suco natural, sem grandes alterações, enquanto a segunda artificializa o suco, dissolvendo em volume correspondente de água os princípios contidos nos sucos muito concentrados.

Quando o mosto é reconhecidamente carente em alguns nutrientes, recorre-se ao emprego de substâncias, principalmente fosfatadas e nitrogenadas. O fosfato de amônio reúne esses dois nutrientes e, recomenda-se as doses de 0,1 a 0,3 g L<sup>-1</sup> (10 a 30 g hL<sup>-1</sup>) (CORAZZA et al., 2001).

A sulfitação ou sulfitagem é uma das técnicas mais empregadas na vinificação, elimina principalmente as bactérias e leveduras selvagens não produtoras de álcool, previne as enfermidades do vinho, funciona como antioxidante e facilita a dissolução das matérias corantes (polifenóis) da uva. Pode ser feita pela aplicação de anidrido sulfuroso, usando-se 4 a 5 g hL<sup>-1</sup>. Pode ser também utilizado o

metabissulfito de potássio ( $K_2S_2O_5$ ) na proporção de 12 g  $hL^{-1}$  de mosto. A sulfitação deve ser feita 5 horas antes da adição do inóculo (MORETTO et al. 1988).

Em mostos de baixa acidez deve ser feita a correção, com a utilização de 50 a 100 mg de ácido tartárico ou de ácido cítrico por 100 L. O pH dos vinhos variam de 2,8 a 3,8 e a acidez total do mosto de uva varia de 7 a 16 mL de NaOH 1 M por 100 mL de suco (JACKSON, 1993).

Os vinhos e mostos que apresentam acidez elevada podem ser corrigidos por desacidificação com carbonato de cálcio, tartarato neutro de potássio ou por trocadores de íons. Para reduzir a acidez dos vinhos ou mostos em 1 g  $L^{-1}$  adiciona-se 67 g de carbonato de cálcio para 100 L de vinho ou mosto. O tartarato de cálcio formado é insolúvel e precipita na forma de cristais finos (MORETTO et al. 1988).

A correção do açúcar ou chaptalização geralmente é feita em mostos pobres em açúcar, para aumentar o grau alcoólico, produzir os vinhos suaves e licorosos, assim como, para proporcionar mais corpo a bebida. Considera-se que 2 °Brix produz aproximadamente 1 °GL de álcool após a fermentação (CORAZZA et al., 2001). Essa proporção de 2:1 foi estabelecida devido às crescentes dificuldades dos fermentos se desenvolverem em meio de elevado teor alcoólico, quando então precisam de maior quantidade de açúcar para aumentar um grau alcoólico. Para ser obtido um vinho doce com 14 °GL são necessários 28 % de açúcar, ou seja, 28 kg por 100 L de mosto, portanto, é indispensável haver acréscimo de açúcar, para que o vinho resultante se enquadre no limite alcoólico desejado (MORETTO et al. 1988).

Qualquer mosto de frutas e soluções ricas em nutrientes, quando em repouso e exposta ao ambiente, apresenta uma flora microscópica que se desenvolve, se multiplica e fermenta. Essa microflora é constituída principalmente de leveduras selvagens (fermentos naturais) desses mostos. Essas leveduras proporcionam fermentações irregulares e produção de vinho de qualidade variável (CAMARGO, 1975).

Diferentes leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Kloeckera*, *Candida*, *Hansenula*, *Hanseniospora*, *Zigossacharomyces* e *Pichia* entre outras, juntamente com a *Saccharomyces cerevisiae* podem iniciar a fermentação do mosto de uva e dar origem ao vinho. Embora as leveduras não-*S. cerevisiae* participem apenas do início da fermentação, elas exercem grande contribuição para a qualidade do aroma do vinho pela capacidade de produzir compostos orgânicos voláteis como ésteres e álcoois em concentrações superiores às *S. cerevisiae* (FLEET & HEARD, 1993).

O emprego de leveduras selecionadas se constitui em uma prática mais racional para melhor exploração de vinhos.

As leveduras de interesse industrial pertencem ao gênero *Saccharomyces*. A *Saccharomyces cerevisiae* é a mais abundante e a que se encontra em maior quantidade, principalmente no final da fermentação principal ou tumultuosa. As leveduras selecionadas se constituem principalmente de representantes dessa espécie ou variedades dessa. Além de outras, também se encontram *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *S. cerevisiae* var. *carlbergensis*, *S. bayanus* e *S. uvarum* (ROJAS et al., 2001; MORETTO et al., 1988).

A fermentação do mosto começa com adição do inóculo, inicialmente é lenta, a fase de adaptação e multiplicação. Passadas 6 horas à temperatura de 20 a 25 °C a fermentação está na fase, tumultuosa com grande desprendimento de CO<sub>2</sub>. O tempo de fermentação tumultuosa dura de 5 a 10 dias dependendo da riqueza do mosto e do preparo do inóculo. Após essa o processo fermentativo se torna mais lento, as leveduras continuam fermentando os açúcares residuais, essa etapa é denominada de fermentação complementar ou pós-fermentação (HASHIZUME, 2001; MORETTO et al., 1998).

Após a fermentação os vinhos novos contêm partículas diversas provenientes dos mostos ou de partes sólidas das uvas como: leveduras, fosfato férrico, cobre, bactérias, cristais de bitartarato de potássio, de tartarato de cálcio, substâncias de natureza coloidal, proteínas, albuminóides (gomas e pectinas), compostos fenólicos mais ou menos polimerizados, polissacarídeos de diversas estruturas, etc. Com a paralisação da liberação de CO<sub>2</sub>, todo esse material em suspensão tende a decantar por ação da gravidade o que proporcionará a clarificação gradual do vinho com a formação da borra (HASHIZUME, 2001).

Conforme o mesmo autor (HASHIZUME, 2001), após a fermentação lenta é realizada a primeira trasfega. A trasfega é a mudança do vinho de um recipiente para outro, realizada com precaução separando o vinho limpo do depósito ou borra. A finalidade da trasfega é facilitar a clarificação do vinho e prevenir a aquisição de odores estranhos, pela presença de células velhas das leveduras. A clarificação natural realiza-se por simples repouso, consistindo na sedimentação progressiva de partículas em suspensão. É influenciada pela densidade da partícula. A natureza, volume, forma do recipiente e outros fatores externos, (temperatura, arejamento, tanino, etc.) influenciam a extensão deste depósito (borra).

Segundo Moretto et al. (1998), o estado de conservação, qualidade e aparência do vinho é que determina o número e época das trasfegas.

Durante a fermentação, após as trasfegas sempre ocorrem perdas de volume dos mostos e para evitar os espaços vazios nos vasilhames e barris é necessário se fazer o atesto que consiste em repor o vinho perdido por consumo, contração, perda de dióxido de carbono, evaporação e trasfegas. Nos espaços vazios, em função da presença de oxigênio, podem ocorrer alterações no vinho devido a ação de microrganismos aeróbicos, ocorrendo principalmente a acetificação do vinho. O vinho de atesto deverá ser de qualidade semelhante àquele que vai atestar (MORETTO et al., 1998; LIMA et al., 1975).

### *Envelhecimento*

O envelhecimento é uma operação pela qual se deixa o vinho em repouso para que se processe a clarificação e se desenvolvam as suas propriedades gustativas e aromáticas, responsáveis pelo *buquê*. O envelhecimento é caracterizado por processos de oxidação e principalmente de redução, em que durante essa evolução, o vinho torna-se mais agradável de beber, caracterizando-se pela sua longevidade (MORETTO et al., 1988).

Santos (2006) relatou que para envelhecer bem, um vinho deve possuir bons teores de álcool, de ácidos e, especialmente, de taninos (substâncias responsáveis pela adstringência, que é o "travo" ou sensação de boca seca, como ao comer banana verde).

Durante a maturação ocorrem fenômenos biológicos como: fermentação dos açúcares residuais, fermentação malolática. Fenômenos físicos como: eliminação do CO<sub>2</sub> provindo da fermentação, precipitação dos tartaratos, precipitações coloidais (mucilagem de natureza glicídica, substâncias nitrogenadas simples e em combinação com fosfato e substâncias corantes insolubilizadas) e modificação da cor. Fenômenos químicos: autólise de leveduras, oxidações dos álcoois, aldeídos e outras substâncias presentes, assim como formação de ésteres voláteis, resultantes das combinações de ácidos com álcoois, responsáveis pelas qualidades específicas dos vinhos. A maturação prossegue até que o oxigênio se reduz a quantidades insignificantes, sendo prejudicada pelo excesso de CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e outras causas (LIMA, et al., 1975).

### *Envelhecimento em barril de madeira*

As modificações sensoriais nas bebidas alcoólicas, envelhecidas em barril de madeira, são decorrentes da variação da composição química da bebida, que são conseqüência de reações químicas entre os compostos contidos na própria bebida com os componentes da madeira da qual o barril é constituído.

Com o decorrer do tempo de envelhecimento, novas características sensoriais são desenvolvidas: aroma e sabor de madeira, doçura, aroma de baunilha, coloração e a diminuição significativa da agressividade do álcool (CARDELLO & FARIA, 1998).

O vinho recebe uma característica adicional de madeira, baunilha e outros aromas, atingindo sua complexidade. Também fica mais estruturado em função dos fenóis, como o tanino. É devido à quantidade de tanino que o vinho apresenta seu potencial para ser armazenado ou não. O envelhecimento aumenta a estabilidade dos aromas, a intensidade das cores e possibilita a oxidação, o que amadurece o vinho. A madeira em contato com o vinho comunica-lhe gosto agradável, com aumento da suavidade. Durante a permanência no barril de madeira, o grau alcoólico diminui por evaporação, ao mesmo tempo a acidez aumenta pela oxidação de  $SO_2$  e, às vezes, pela ação de bactérias (MORETTO et al., 1988)

Os poros da madeira permitem a entrada de oxigênio do ar e a perda de parte do etanol e água. A exposição ao oxigênio no ar limitada pelos poros da madeira ajuda a maturar o vinho. Algumas reações podem ser exemplificadas, como a oxidação de álcoois em aldeídos e ácidos e a esterificação de ácidos que reagem com os álcoois formando os ésteres, produtos responsáveis pelo sabor agradável e característico das bebidas envelhecidas (JANZANTTI, 2004)

Vinhos, obtidos de uvas de elevada qualidade e provenientes de vinhedos especiais, ao permanecerem em contato com a madeira, adquirem elementos que lhe conferem maior estrutura e maior durabilidade no tempo. Um vinho envelhecido na madeira adquire também aromas particulares derivados da mesma madeira. Agradabilíssimos se bem dosados, mas cansativos nos casos em que ocorre um excesso na utilização dos barris. Esses excessos fazem com que os aromas de madeira superem e cubram os aromas primários do vinho engarrafado (HISTÓRIA DO VINHO, 2009).

### *Envelhecimento em garrafa*

Na garrafa, ao abrigo do ar, que o vinho vai afinar, amaciar e o seu aroma se transformará em buquê, o qual evoluirá devido principalmente às reações de esterificação (ROSIER, 1988).

O vinho passa por uma série de transformações físico-químicas. O seu aroma torna-se mais fino e agradável e sua cor sofre modificações. Dentro da garrafa, com o passar do tempo, as centenas de substâncias presentes no vinho sofrem reações químicas, a maioria das quais não são bem conhecidas. Uma delas, melhor conhecida, é a polimerização dos taninos e sua deposição no fundo da garrafa contribuindo para formar a borra freqüentemente observada em vinhos velhos. Com a queda dos taninos, o vinho fica mais "macio" e "aveludado" à boca. (SANTOS, 2006).

Também durante o envelhecimento, ocorrem reações que originam aromas mais complexos e agradáveis. O vinho na garrafa está em total ausência de oxigênio (no engarrafamento é retirado todo o ar) e, portanto, as reações benéficas, mencionadas anteriormente, ocorrem na ausência de ar e são denominadas "reações de redução" (MORETTO et al., 1988).

### *Compostos orgânicos voláteis responsáveis pelo aroma*

Numa sociedade em que o suprimento de alimentos é abastecido por grande variedade de produtos industrializados, a escolha pela sensação de prazer proporcionado vem crescendo em importância. A aceitação dos produtos alimentícios no mercado depende de sua qualidade.

O sabor e o aroma são importantes fatores na seleção dos alimentos e bebidas e determinam a aceitação do produto pelos consumidores. O sabor de um alimento é uma resposta integrada aos estímulos gustativos e olfativos. A sensação do gosto é devida à presença de compostos solúveis em água, não voláteis nos alimentos, tais como açúcares, limonina, cafeína, ácidos, sais e glutamato de sódio, sendo classificada em cinco categorias básicas: doce, amargo, ácido, salgado e umami (THOMAZINI & FRANCO, 2000).

O aroma dos alimentos é bem mais complexo, pois o olfato humano pode discriminar entre milhares de compostos orgânicos voláteis e/ou semi-voláteis, representantes de várias classes químicas, com diferentes propriedades físico-químicas. Eles geralmente são moléculas pequenas com baixo peso molecular e

certa hidrofobicidade. O odor é a sensação percebida pelos quimiorreceptores olfativos que geram respostas no nervo olfativo; e o aroma é uma sensação mais complexa resultante da interação entre as sensações olfativas e gustativas (GARRUTI et al., 2002).

O principal responsável pela percepção do aroma é a presença de compostos orgânicos voláteis (COV), que chegam ao bulbo olfativo pela cavidade retro-nasal. A mastigação, temperatura da cavidade bucal, solubilização saliva e mudanças de pH colaboram para a chegada desses compostos no bulbo olfativo, fornecendo a percepção do sabor daquele alimento. Sensações térmicas, queimação, adstringência, textura e sensações residuais também contribuem para a formação do sabor do alimento (THOMAZINI & FRANCO, 2000).

Aroma é a sensação percebida pelos sentidos do gosto e olfato, produzida quando se ingere o alimento. É um dos atributos mais importantes dos alimentos e bebidas. Pode ser definido como a sensação global produzida pelas combinações que interagem com as terminações nervosas sensíveis do prazer e do cheiro. É a combinação de centenas de COV e semivoláteis que pertencem a diferentes famílias químicas e que estão em concentrações muito variáveis (AUMATELL, 2004).

Ao contrário do paladar, milhares de voláteis podem ser detectados e diferenciados, em menor ou maior escala, pelo olfato. Isso depende de diversos fatores, dentre os quais, a estrutura química do COV, a sua volatilidade (pressão de vapor) e a interação deste com a matriz alimentícia. Tais fatores, por sua vez, são responsáveis por características importantes dos compostos, a exemplo o valor do limiar de odor (limiar de detecção ou *threshold*), que pode ser definido como a concentração mínima pela qual um composto pode ser detectado pelo sentido do olfato (BELITZ & GROSCH, 1999).

O aroma das bebidas alcoólicas, principalmente dos vinhos é muito complexo porque depende de transformações biológicas, bioquímicas e tecnológicas e não só devido à fermentação. Determinados compostos têm origem na matéria-prima permanecendo inalterados durante o processo da fermentação e do envelhecimento, certos compostos são gerados no processamento da matéria-prima através do esmagamento e aquecimento, alguns são gerados durante o processo fermentativo e outros são provenientes de reações químicas durante o envelhecimento (GARRUTI et al., 2002; FARIA et al., 2003).



Diferentes bebidas podem ser facilmente identificadas sensorialmente, mas estudos comparativos qualitativos e quantitativos de substâncias em diferentes bebidas alcoólicas mostram que, embora alguns compostos sejam característicos de uma bebida particular ou tipo de bebida, em geral, os compostos responsáveis pelos sabores peculiares, são bastante similares, independente da natureza da bebida. A maior diferença parece ser devida à concentração dos COV nas diferentes bebidas, à contribuição de cada composto ao aroma total, as interações de odor e à alteração do limiar de detecção dos compostos em presença de etanol (JANZANTTI, 2004).

Ainda conforme Janzantti (2004), no decorrer do processo fermentativo alcoólico, o principal produto é o etanol, formado pela ação das leveduras sobre a glicose e outros açúcares, mono e oligossacarídeos. Os demais COV são os ésteres, os álcoois, os ácidos graxos, os aldeídos e outros, geralmente encontrados em pequenas quantidades e muitas vezes difíceis de serem determinados e quantificados, apesar de extremamente potentes quanto a sua contribuição ao aroma e sabor. Álcoois superiores (óleo fusel), ácidos graxos e ésteres formam quantitativamente os maiores grupos presentes nas bebidas alcoólicas, sendo os álcoois superiores os mais abundantes.

Segundo Ferreira (2007), o aroma dos diferentes vinhos é formado por mais de 800 compostos voláteis e semi-voláteis representando vários grupos químicos, ou seja, terpenóides, álcoois alifáticos e aromáticos, ésteres, aldeídos, cetonas, ácidos e fenóis, dos quais, só uns 50 contribuem decisivamente para o aroma. Estes cinquenta compostos podem classificar-se em diferentes categorias:

Aroma base: formado por aromas que estão em todos os vinhos em concentrações apreciáveis e que constituem o tronco aromático-gustativo. São os álcoois fúseis e seus acetatos (isobutílico, isoamílico e feniletílico), metionol, ácidos graxos, ésteres etílicos, acetaldeído, diacetila e  $\beta$ -damascenona.

Notas sutis: componentes que estando em todos os vinhos, só às vezes sua concentração supera o valor limiar e nunca chega a ser um aroma proeminente.

Exemplos: guaiacol, vinilguaiacol, eugenol.

Notas de impacto: componentes que só se encontram em determinados vinhos e seu impacto sensorial é tão intenso que diferenciam este vinho do

resto. Exemplos: linalool em vinhos Moscatel, o óxido de nerol em Gewürztraminer ou a 4-metil 4-mercaptopentanona em Sauvignon blanc.

### *Ésteres*

Os ésteres são os voláteis mais importantes e abundantes em vinhos e nas bebidas alcoólicas resultantes do processo de fermentação e de reações entre álcool e ácido com eliminação de molécula de água durante o envelhecimento. Tanto a quantidade como as proporções relativas são essenciais para a percepção do aroma das bebidas, pois os ésteres conferem aromas característicos. Até mesmo quando presentes em baixa concentração possuem papel fundamental nas notas frutais do aroma (FERREIRA, 2007; NYKÄNEN & SUOMALAINEN, 1983; NYKÄNEN & NYKÄNEN 1991).

Um considerável número de álcoois e ácidos diferentes está presente no vinho, portanto o número de ésteres que podem ser formados é muito grande. Assim os álcoois primários são os mais reativos e devido a presença do etanol e os etil ésteres são os mais abundantes (FERREIRA, 2007).

Ésteres acetato, como acetato de etila, acetato de hexila, acetato de isoamila e acetato de 2- feniletila, são reconhecidos como compostos importantes em aroma de vinho e em outras bebidas alcoólicas derivadas de uvas (ROJAS et al., 2001).

São conhecidas três diferentes origens para os ésteres. Eles podem ser originados da matéria prima, em pequena extensão; da atividade metabólica das leveduras, durante o processo fermentativo, por esterificação enzimática entre álcoois livres e a forma ativa de ácidos carboxílicos, o acil-S-CoA (DUBOIS, 1994); e da esterificação química entre etanol e um considerável número de diferentes ácidos no vinho, quando estocado, durante o tempo de maturação e de envelhecimento (SOLES et al., 1982). Os mesmos ésteres podem ser sintetizados por ambas as vias, esterificação enzimática e química.

A quantidade de ésteres é dependente da abundância relativa dos álcoois correspondentes e do tioéster acil-CoA produzido pelas leveduras. O composto tioéster mais comum é o acetil-CoA, que é formado pela descarboxilação oxidativa do piruvato e tem papel central no metabolismo das leveduras. Os compostos acil-CoA maiores são intermediários do metabolismo de ácidos graxos. O acetato de etila normalmente é o éster predominante nas bebidas alcoólicas (JANZANTTI, 2004).

Segundo Berry (1995), alguns dos fatores que influenciam a formação de ésteres são: tipo e quantidade de levedura, a temperatura de fermentação, a aeração, a agitação e a qualidade do mosto. A falta de aeração ou nitrogênio pode produzir aumento na formação de ésteres. Parece que a maioria dos ésteres é produzida nos últimos estágios de fermentação, ao contrário dos álcoois, que são produzidos abundantemente no início.

Os aromas conferidos pelos ésteres estão relacionados com o tamanho da cadeia carbônica. Os ésteres com cadeia curta geralmente apresentam agradável aroma de frutas. Com o aumento do peso molecular as características frutais são perdidas aparecendo odores de sabão e ranço. Os ésteres etílicos de ácidos graxos presentes na concentração total de uns poucos  $\text{mg L}^{-1}$ , são responsáveis por muitos odores agradáveis que participam do aroma característico das bebidas (FERREIRA et al., 2002).

### *Álcoois*

Conforme Amerine et al. (1972), os álcoois são indiretamente responsáveis pelo sabor das bebidas alcoólicas. São importantes devido à ação solvente sobre outras substâncias aromáticas, interferindo no grau de volatilidade e conseqüentemente nos seus limiares de percepção. Conferem corpo à bebida, além de alguns esterificarem durante o envelhecimento, formando ésteres aromaticamente mais agradáveis (LIMA, 1964).

Depois da água o etanol é o componente mais abundante do vinho. É produzido durante a fermentação alcoólica dos açúcares presentes no mosto (RIBÉREAU-GAYON et al., 2000). Este composto é responsável pelo grau alcoólico da bebida (volume do álcool expresso em porcentagem) e afeta as características organolépticas do vinho mesmo que não seja considerado um componente do aroma (DUBOIS, 1994). Entretanto, sua percepção sensorial se deve a sua presença bem acima do limiar de percepção. Etanol também tem um importante papel na solubilização de compostos do aroma, após a elaboração do vinho, contribuindo para a expressão do aroma global no vinho. Estudos demonstraram a diminuição na quantidade de muitos COV importantes quando foi feita a desalcolização de vinhos (GÓMEZ-PLAZA et al., 1999).

O etanol, devido a sua função álcool, pode participar de diversas reações, tais como, reações de esterificação com diversos ácidos incluindo o tartárico. Pode

reagir igualmente com aldeídos, especialmente etanal, produzindo o dietoxietano (FERREIRA et al., 2002).

Álcoois com mais de 2 átomos de carbono e apenas uma função álcool são chamados de álcoois superiores ou fúseis e geralmente constituem 50 % dos componentes de aroma do vinho, excluindo-se o etanol. Esses álcoois têm sido encontrados em vinhos em concentrações entre 150 a 550 mg L<sup>-1</sup>. Apesar de estarem presentes em quantidades menores do que o etanol eles tem um importante papel no aroma dos vinhos (FERREIRA et al., 2002). Entretanto, Santos (2006) afirma que os álcoois nunca foram considerados como fator de qualidade, pois a maioria apresenta odor desagradável; apenas o 2-feniletanol foi descrito com termos agradáveis como “de perfume”.

Os álcoois superiores presentes nos vinhos são formados durante a fermentação, resultando principalmente da atividade metabólica das leveduras. Os principais álcoois de origem fermentativa são 2-metil-1-propanol (álcool isobutílico), 2-metil-1-butanol (álcool amílico), 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico) e o 2-feniletanol.

Após o etanol, o álcool isoamílico é o principal álcool sintetizado durante a fermentação e dependendo da natureza da bebida, pode perfazer 40-70 % do total da fração de óleo fusel (JANZANTTI, 2004).

Esses álcoois tem sido encontrados em vinhos em concentrações acima de 50 mg L<sup>-1</sup> (RIBÉREAU-GAYON et al., 2000). Outros, tais como 1-propanol, 1-butanol, 1-hexanol, 3-metil-2-butanol, 2-decanol e 2-butanol tem sido encontrados em concentrações entre 1 e 50 mg L<sup>-1</sup> (MAURICIO et al., 1997).

Os álcoois superiores provêm do metabolismo de aminoácidos e proteínas presentes no mosto, mas também podem ser formados como produtos secundários do metabolismo de carboidratos. Ambas as rotas podem ocorrer simultaneamente na fermentação (BERRY, 1995). Além disso, as leveduras são capazes de reduzir os aldeídos a álcoois superiores durante a fermentação (NYKÄNEN & NYKÄNEN, 1991).

Janzantti (2004) informa que o conteúdo de álcoois superiores formados durante a fermentação varia de acordo com as condições da fermentação, pela composição do meio (concentração de açúcar, pH, concentração e tipo de fonte de nitrogênio), pela temperatura, pelo grau de aeração durante a fermentação e especialmente a linhagem da levedura.

Em geral, biomassa de levedura, oxigenação, temperatura alta e presença de material em suspensão que promove aumento da fermentação e a formação de álcoois superiores (RIBÉREAU-GAYON et al., 2000). O conteúdo de álcoois superiores no vinho pode aumentar também devido a autólise dos microrganismos envolvendo leveduras e/ou bactérias.

As propriedades sensoriais dos álcoois estão relacionadas com a estrutura química dos compostos e podem ser separados em dois grupos, os álcoois alifáticos de seis carbonos e os aromáticos. Os primeiros são responsáveis pelo odor herbáceo e os segundos são responsáveis por aromas agradáveis e florais. (DUBOIS, 1994).

Em concentrações menores que  $300 \text{ mg L}^{-1}$ , os álcoois fúseis podem participar do aroma global do vinho ou podem contribuir individualmente para o aroma do vinho. Entretanto, em altas concentrações, eles podem mascarar outros aromas responsáveis pelas propriedades sensoriais do vinho (FERREIRA et al., 2002).

### *Ácidos*

Os ácidos orgânicos voláteis contribuem para o aroma das bebidas, devido ao seu aroma característico e são fixadores de vários compostos aromáticos, além de conferir corpo às mesmas (LÉAUTÉ, 1990).

Os ácidos orgânicos voláteis são os mais comuns em bebidas. O conteúdo de ácidos orgânicos é expresso pela acidez volátil, fixa ou total, sendo esta última a soma das duas anteriores. Além do ácido acético e láctico, que são subprodutos normais da fermentação alcoólica, estão presentes os ácidos fórmico, butírico, propiônico e outros ácidos de cadeias médias em quantidades pequenas (AMERINE et al., 1972; NYKÄNEN & NYKÄNEN 1991). Segundo Novaes et al. (1974), os ácidos fixos são principalmente o tartárico, cítrico e málico.

Os ácidos sintetizados pelas leveduras podem prontamente passar da célula da levedura para o meio durante a fermentação, por meio de reações de esterificação que produzem seus respectivos ésteres (JANZANTTI, 2004).

Alguns ácidos orgânicos excretados no meio de fermentação são derivados de vias intermediárias, como o acético, málico e succínico, contudo, a maioria dos ácidos graxos de cadeia longa é derivada da via biossintética dos ácidos graxos. O ácido acético é produzido pela oxidação do acetaldeído, com remoção de

hidrogênio, na reação oposta à redução normal do acetaldeído a etanol (BERRY, 1995).

Segundo Janzantti (2004), os ácidos orgânicos, do ponto de vista qualitativo, não variam nas diferentes bebidas, apesar de haver uma grande variação na sua proporção relativa. As proporções dos ácidos nas bebidas alcoólicas são determinadas em grande extensão pela linhagem da levedura e condições de fermentação e, em menor extensão, pelo substrato utilizado.

O ácido acético, apesar de sua proporção variar extensamente nas diferentes bebidas, na maioria dos casos corresponde de 60 a 95 % da acidez volátil (NYKÄNEN & SUOMALAINEN, 1983).

A formação dos ácidos está relacionada com a biossíntese dos álcoois superiores. Ácidos propanóico, 2-metil-1-propanóico (isobutírico), 2-metil-1-butanóico, 3-metil-1-butanóico (isovalérico) e 2-fenilacético são formados por  $\alpha$ -cetoácidos (desaminação de aminoácidos seguida por descarboxilação de oxiácidos homólogos). Ácidos isobutírico e isopentenóico vêm da degradação da valina e leucina, respectivamente. Outros compostos, tais como ácidos butanóico (butírico), hexanóico (capróico), octanóico (caprílico) e decanóico (cáprico) são formados por oxidação de ácidos graxos poliinsaturados de cadeias médias e longas (JANZANTTI, 2004; FERREIRA, 2007).

Segundo Montedoro & Bertuccioli (1986), poucos ácidos orgânicos encontrados nos vinhos são suficientemente voláteis para contribuir para o seu odor. Os ácidos tartárico e málico contribuem para o gosto ácido e dentre os ácidos alifáticos, apenas o acético (odor de vinagre), propiônico (odor de caprino) e butanóico (odor de manteiga rançosa) contribuem efetivamente para o odor do vinho.

Dubois (1994) reporta que em vinhos, alguns ácidos têm aromas agradáveis e outros são desagradáveis. Essas diferenças são devidas ao tamanho das cadeias carbônicas. Dessa forma, os ácidos graxos de cadeia curta (C2 a C5) parecem estar relacionados com notas desagradáveis, tais como ácido acético (vinagre), ácido propanóico (cabra) e ácido butanóico (manteiga rançosa). Em contraposição aos autores anteriores ele relata que os ácidos graxos com mais de cinco átomos de carbono estão relacionados com aromas agradáveis, tais como ácido hexanóico (aroma doce), ácido octanóico (aroma de fruta doce) e ácido decanóico (aroma de

fruta doce, baunilha). Ácido acético está presente sempre acima do seu limiar de percepção.

### *Compostos carbonílicos*

Aldeídos e cetonas são compostos nomeados de carbonílicos devido a presença, em ambos do grupamento carbonila (C=O). Os principais compostos que podem ter uma influência no aroma dos vinhos são o etanal (acetaldeído), 3-hidroxi-2-butanona (acetoina ou acetil-metil-carbinol), 2,3-butanediona (diacetil), 3-hidroxi-2-pentanona, 2,3-pentanediona e fenil-etanal (BAYONOVE et al., 1998).

Os compostos carbonílicos podem ser produtos de oxidação dos álcoois produzidos durante o processo de maturação do vinho em recipientes de madeira. Entretanto, em vinhos jovens, é mais provável que representem compostos intermediários do processo metabólico que ocorre durante a fermentação e que não foram reduzidos à forma de álcool pelo excesso de nicotinamina adenina dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>) produzida pelas leveduras (SLINGSBY et al., 1980).

Os aldeídos são importantes por suas notas sensoriais no sabor das bebidas, pois um grande número desses compostos apresenta baixo valor de limiar. Segundo Nykänen & Suomalainen (1983), os aldeídos podem ser formados pela oxidação de álcoois, degradação oxidativa de *Strecker* de aminoácidos e autooxidação de ácidos graxos insaturados durante a fermentação e o envelhecimento da bebida. Hexanal, hexenais e (E,E)-2,4-decadienal são considerados produtos da oxidação enzimática dos ácidos linoléico e linolênico. São rapidamente convertidos aos álcoois correspondentes pela ação das leveduras, e logo após a fermentação, já se encontram em níveis muito baixos, apesar de presentes em grande quantidade no mosto (ULRICH & GROSCH, 1987).

Quando são produtos intermediários da rota biossintética de álcoois superiores, são formados por descarboxilação de  $\alpha$ -cetoácidos pela ação da enzima piruvato descarboxilase. Durante a fermentação, as condições que favorecem a produção de álcoois superiores também favorecem a formação de pequenas quantidades de aldeídos. Os aldeídos que são formados dentro das células das leveduras e excretados para o meio, podem ser reabsorvidos e reduzidos ao álcool correspondente, durante os últimos estágios de fermentação (BERRY, 1995).

O acetaldeído é o composto carbonílico mais abundante, que possui odor pungente e pode aumentar o sabor picante das bebidas (NYKÄNEN & NYKÄNEN, 1991).

Segundo Novaes et al. (1974) o furfural e o hidroximetilfurfural são resultantes da decomposição química de carboidratos, podendo aparecer no caldo de cana, quando a colheita é precedida da queima da folhagem, que acarreta a desidratação parcial de uma pequena fração de açúcares presentes. A desidratação parcial das pentoses leva à formação de furfural (2-furfuraldeído) e a desidratação das hexoses à hidroximetilfurfural (5-hidroximetil-2-furfuraldeído). O furfural também pode ser formado pela pirogênese de matéria orgânica depositada no fundo dos alambiques. Nas aguardentes envelhecidas, o furfural pode ser oriundo da ação de ácidos sobre as pentoses e seus polímeros (hemiceluloses), provenientes da madeira usada na construção de tonéis (YOKOYA, 1995).

As moléculas com função cetona, tais como propanona, butanona e pentanona, tem sido encontradas em vinhos. As cetonas são importantes para o sabor das bebidas. Nas aguardentes de cana, as cetonas são originadas por fermentação secundária ou por contaminação durante o processo de produção. As mais importantes são 3-hidroxi-2-butanona (acetoina), e 2,3-butanodiona (diacetil), presente em concentrações em torno de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. O diacetil pode ter o ácido pirúvico como precursor (REVEL et al., 1989; HAYASAKA & BARTOWSKY, 1999).

O composto mais extensivamente estudado é o diacetil (2,3-butanodiona), que apresenta uma contribuição importante para o sabor de cerveja, vinhos tintos, bebidas destiladas, como uísque e o rum. Possui baixo valor de *threshold* e o seu odor é semelhante à manteiga (NYKÄNEN & NYKÄNEN, 1991; BERRY, 1995). Este composto é produzido pela descarboxilação oxidativa de hidroxiácidos.

Conforme Frivik & Ebeler (2003), os compostos voláteis aldeídos e cetonas podem ser responsáveis por muitos odores intensos, tais como manteiga e amêndoas este último característico do benzaldeído. As cadeias curtas e saturadas de aldeídos contribuem favoravelmente para muitas bebidas alcoólicas, transmitindo aromas de nozes, maçãs amassadas, herbáceo, parecido com capim, verde, parecido com fruta, e pungente.



### *Compostos fenólicos*

Compostos fenólicos são formados por várias moléculas: alguns polifenóis são responsáveis pela coloração do vinho; e moléculas simples, os fenóis voláteis podem contribuir para o aroma dos vinhos. Quanto à origem dos compostos fenólicos voláteis, dois caminhos foram propostos: a degradação biológica dos ácidos fenólicos presentes e a degradação química da lignina (SANTOS, 2006).

Os fenóis voláteis são basicamente formados por um grupo hidroxila e grupos metil/etil ligados a um grupo aromático. Segundo Ribéreau-Gayon et al. (2000), os principais compostos em vinhos brancos são 4-vinilfenol e 4-vinilguaiacol. Esses compostos podem, em algumas condições, ser responsáveis por certos defeitos nos vinhos.

Dubois (1994) relata que apesar de serem encontrados em quantidades consideradas como vestígios no mosto, em vinhos as concentrações dos fenóis voláteis tem sido relatadas como de poucas dezenas até várias centenas de mg L<sup>-1</sup>. Os vinilfenóis são formados principalmente durante a fermentação pelo metabolismo das leveduras. Outros compostos podem resultar da hidrólise de seus glicosídeos precursores, mas em pequenas quantidades.

Segundo Ferreira (2007), os fenóis voláteis podem conferir um acentuado odor aos vinhos, parecido com temperos (4-vinilguaiacol, eugenol) e baunilha (vanilina). O 4-vinilfenol e 4-vinil-2-metoxifenol podem contribuir positivamente para o aroma global do vinho.

### *Outros compostos*

Outros compostos que apresentam efeito marcante no aroma das bebidas são os compostos sulfurados, pois possuem baixo limiar de percepção. A maioria dos compostos sulfurados já identificados em bebidas alcoólicas é oriunda diretamente da matéria-prima, contudo, alguns podem ser derivados do metabolismo das leveduras (BERRY, 1995).

Os compostos sulfurados apresentam valores de limiar muito baixo e, portanto, podem ser percebidos em concentrações muito baixas, além do fato de pequenas variações positivas em sua concentração poderem causar aroma desagradável no produto. Os compostos sulfurados podem ocorrer devido à processos de degradação enzimáticos ou não-enzimáticos. O processo enzimático envolve a degradação de aminoácidos, ou de outros produtos oriundos do processo

fermentativo que contenham enxofre. A via não enzimática inclui reações térmicas, fotoquímicas e outros tipos de reações de compostos sulfurados durante o processo de obtenção e de estocagem do vinho (MESTRES et al., 2000).

O sulfeto de hidrogênio é reconhecido pelo seu odor de ovos podres, porém pouco abaixo de seu limiar de percepção, contribui para o odor de vinhos recém fermentados. O etanotiol produz odores de alho e borracha, perto do seu valor de limiar, porém acima, apresenta odor fecal. O dimetil sulfeto, um tioéster, apresenta odor de camarão quando presente em concentrações acima do seu limiar (JACKSON, 1993)

Entre os compostos nitrogenados as acetamidas das aminas primárias são voláteis. No meio da fermentação as aminas primárias são acetiladas pelas leveduras e convertidas em acetamidas. As mais abundantes são *N*-(2-metilbutil)-acetamida, *N*-(3-metilbutil)-acetamida, *N*-(2-feniletíl)-acetamida, *N*-(3-metilpropil)-acetamida, *N*-pentilacetamida e *N*-etil-acetamida (DUBOIS, 1994; BAYONOVE et al., 1998). A *N*-(3-metilbutil)-acetamida, por exemplo, pode aparecer em concentrações acima de 1 mg L<sup>-1</sup>. Entretanto, parece não trazer nenhuma contribuição para o aroma do vinho.

As informações sobre dioxolanos em vinhos são quase inexistentes. Parecem ser resultantes de reações de condensação entre álcoois e aldeídos em condições ácidas (em pH do vinho), o que leva a formação de dioxolanos e dioxanos. Entretanto, esses compostos estão relacionados principalmente com o envelhecimento do vinho (MULLER et al., 1978; FERREIRA et al., 2002; CÂMARA et al., 2003).

Pirazinas são compostos heterocíclicos que podem aparecer em alguns vinhos brancos. Em particular, as metoxipirazinas são produzidas a partir do metabolismo de aminoácidos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2000). Alguns estudos sugerem que as algumas metoxipirazinas tem uma origem microbiológica em vinhos (ALLEN et al., 1995). As pirazinas também podem ser formadas na reação de Maillard (BELITZ & GROSCH, 1999).

A 2-metoxi-3-isopropilpirazina, 2-metoxi-3-sec-butilpirazina e 2-metoxi-3-isobutilpirazina tem um odor vegetal lembrando pimenta verde com alguma nuancia terrestre, como batata ou herbáceo (RIBÉREAU-GAYON et al., 2000). Desses, a 2-metoxi-3-isobutilpirazina tem grande contribuição para notas de aroma terra e

vegetal. Segundo Allen et al. (1995), esses compostos são fortemente odorantes e podem ser detectados em água mesmo em ínfimas quantidades (1-2 ng L<sup>-1</sup>).

#### *Método de isolamento dos compostos orgânicos voláteis*

Franco & Janzanti (2003) informam que a pesquisa dos COV é complexa, requer preparo cuidadoso da amostra. O alimento é uma matriz susceptível a alterações, tendo-se a necessidade de utilização de instrumentos caros, sofisticados e de precisão como cromatógrafos a gás e espectrômetros de massa (CG/EM), pois os COV estão presentes em quantidades muito pequenas, são instáveis, e qualquer aumento na temperatura durante o preparo da amostra acarreta reações químicas que modificam a composição original da amostra. Qualquer modificação causada na composição de voláteis da amostra nesta etapa inicial não mais poderá ser corrigida, por mais sofisticados que sejam os instrumentos utilizados nas etapas subsequentes.

Conforme Ferreira (2007), os processos de extração de COV de vinhos são baseados principalmente nas suas propriedades físico-químicas, tais como, volatilidade e solubilidade em distintas fases orgânicas imiscíveis com matriz aquosa, e a capacidade de ser seletivamente sorvidos por certos materiais. Geralmente, os compostos, principalmente aqueles presentes em pequenas quantidades, precisam ser extraídos e concentrados antes da determinação. Na análise de COV, existem vários fatores que dificultam seu estudo: as pequenas quantidades, geralmente alguns voláteis em teores traços, as diferentes características (tais como alta volatilidade/alto ponto de ebulição) e características distintas em termos de polaridade e solubilidade.

A metodologia para avaliação dos COV compreende as seguintes etapas: isolamento, separação por cromatografia de alta resolução e identificação (AUMATELL, 2005; FERREIRA, 2007).

O isolamento dos analitos pode ser realizado com ou sem o uso de solventes. Dois processos típicos que utilizam solventes são a extração líquido-líquido (ELL) e a extração em fase sólida (EFS). Em ambos, são realizadas várias etapas até a obtenção dos analitos. Existem também processos que dispensam o uso de solventes como: a extração em fase gasosa (*headspace*), extração em membrana e extração em solventes (micro-extração em fase sólida –MEFS) ou em inglês solid phase micro-extraction (SPME).

Na ELL devido ao emprego de calor, perdas ou modificações significativas podem ocorrer na composição de voláteis, assim como impurezas presentes no solvente podem contaminar o isolado. Segundo Bastos et al., (2002), o sistema de destilação extração simultânea de Nickerson-Likens, que emprega calor, tem sido uma das técnicas utilizadas. No entanto, o aquecimento durante esta etapa leva a formação de compostos furânicos. Em função da metodologia aplicada pode ocorrer ainda a discriminação de alguns compostos em função de sua volatilidade e massa molar.

Na extração em fase sólida, os componentes do aroma são retidos no polímero após a passagem da amostra na coluna e posteriormente eluidos com solvente. Apresenta como desvantagem o fato de também extrair compostos pouco voláteis, os quais, no momento da análise cromatográfica, podem ficar depositados no injetor e/ou na cabeça da coluna, problemas que podem ser contornados pela realização de limpezas periódicas do injetor e pelo uso de pré-coluna (SANTOS, 2006).

De acordo com Franco & Janzanti (2004), o isolamento dos compostos voláteis pode ser realizado pela análise total ou pela análise do *headspace* (espaço de cabeça - expressão adaptada para a fase gasosa em equilíbrio com a matriz do alimento).

Dois tipos diferentes de análise do *headspace* são comumente empregados: *headspace* estático e *headspace* dinâmico. A análise direta do *headspace* estático, apesar da simplicidade e pouco manuseio da amostra, permite detectar apenas os componentes que apresentam maior pressão de vapor e, portanto, maior concentração no *headspace*, de um sistema fechado (JANZANTTI, 2004).

Dentre as alternativas para se contornar o problema e no sentido de aumentar as concentrações dos COV, potencialmente importantes ao aroma, presentes no *headspace*, foi desenvolvida a técnica de *headspace* dinâmico. Esta técnica envolve a passagem dos vapores do *headspace* através de polímeros porosos (tais como Porapak e Tenax), utilizando-se um sistema a vácuo (FRANCO & RODRIGUEZ-AMAYA, 1983) ou a passagem de um gás inerte pela amostra (JENNINGS & RAPP, 1983) e posterior retenção dos voláteis por adsorção, seguida de eluição pelo emprego de solvente ou temperatura. O isolamento dos compostos voláteis em polímeros porosos tem sido largamente empregado na investigação de aromas em frutos após padronização cuidadosa das condições de adsorção e

dessorção (FRANCO & SHIBAMOTO, 2000; JANZANTTI et al., 2000; BASTOS et al., 2002; ALVES & FRANCO, 2003) e bebidas (FRANCO et al., 1998).

Segundo Jennings et al. (1972) cuidados devem ser tomados na análise de bebidas alcoólicas pela técnica do *headspace* dinâmico, pois o etanol, como parte da matriz, influencia no equilíbrio da fase de vapor dos analitos, sendo necessário o uso de polímeros com baixa afinidade com o etanol e em alguns casos, uma etapa adicional de desenvolvimento para se diminuir o conteúdo de etanol retido.

A técnica de MEFS introduzida em 1990 por Arthur & Pawliszyn, tem sido considerada como potencialmente útil para a caracterização de COV de alimentos (IBÁÑEZ et al., 1998) e bebidas (NONATO et al., 2001).

Segundo Damasceno (2007), a técnica analítica mais aplicada atualmente para a detecção de COVs responsáveis pelo aroma é a MEFS. É um método de preparação de amostras baseada na técnica baseada na sorção (absorção e/ou adsorção), conforme Figura 1, dependendo do revestimento da fibra, que é usado para extração e concentração. Tem sido amplamente usada para análise de traços de substâncias, tanto na pré-concentração destes compostos quanto na separação de analitos de uma matriz. O método envolve extração e pré-concentração, utilizando com uma fibra de sílica fundida, revestida com um material adsorvente (polímero da fase estacionária) de variadas espessuras, que está protegida dentro da agulha do dispositivo da MEFS.

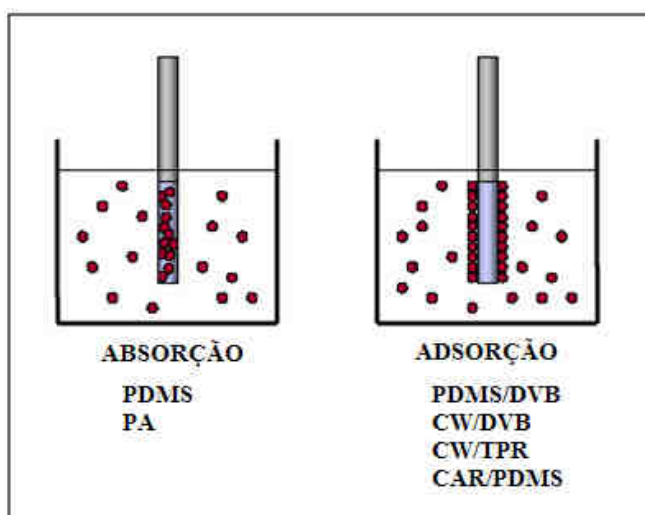


Figura 1. Classificação das fibras de MEFS de acordo com o princípio de extração por absorção ou por adsorção. Fonte: Aumatell (2005).

O dispositivo básico para MEFS (Figura 2) consiste de um bastão de fibra ótica, de sílica fundida, com 10 mm de sua extremidade recoberto com um filme fino de polímero (polidimetilsiloxano - PDMS, poliacrilato - PA, divinilbenzeno - DVB ou carbowax - CW) ou de um sólido adsorvente (carvão ativo microparticulado = carboxen - CAR). As espessuras dos recobrimentos das fibras variam de 7  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$  e seus volumes de 0,03  $\mu\text{L}$  a 0,7  $\mu\text{L}$ , respectivamente. A espessura do revestimento e a sua natureza (Figura 3) polar (PA, CW-DVB), apolar (PDMS), bipolar ou semipolar (PDMS-DVB, CAR-PDMS) e a dotada de triplo revestimento de polaridade intermediária (DVB-CAR-PDMS) são as principais características que governam a seletividade e a eficiência da extração (DAMASCENO, 2007).

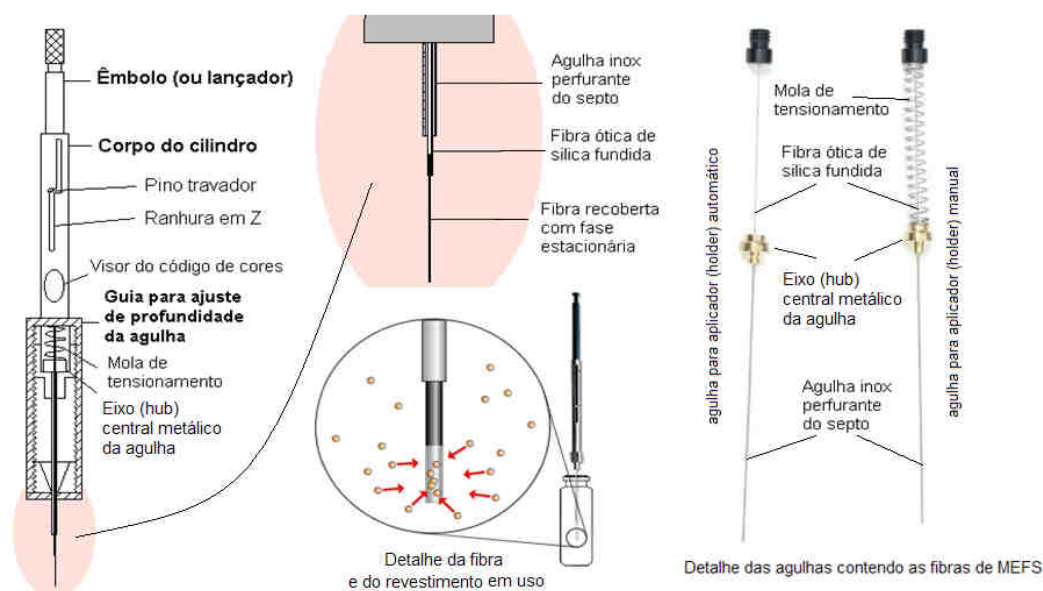


Figura 2. Dispositivo de MEFS com detalhes do aplicador (holder) e da fibra de sílica fundida.

A extração dos analitos com a fibra de MEFS pode ser utilizada por submersão em uma fase líquida (extração por imersão direta) ou por exposição a uma fase gasosa (*headspace*) em equilíbrio com a amostra (Figura 4), a uma determinada temperatura (ARTHUR et al., 1992). Os compostos adsorvidos podem ser dessorvidos termicamente por exposição da fibra no injetor do cromatógrafo. Essa técnica baseia-se na cinética de transferência de massa e na termodinâmica

que descreve o equilíbrio de partição do analito entre as fases. Tem como principais vantagens a simplicidade, a rapidez e de não utilizar solvente.



Figura 3. Esquema representativo da classificação dos revestimentos poliméricos (fase estacionária) comerciais para MEFS. Fonte: Damasceno (2007).

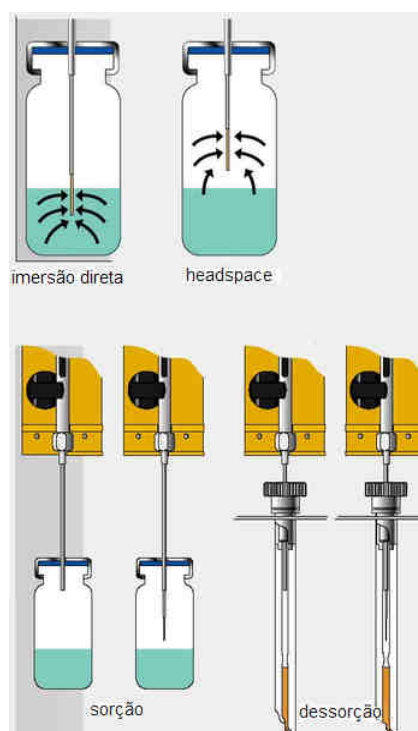


Figura 4. Ilustração das formas de extração (sorção) dos analitos (por imersão direta e por *headspace*) nos frascos (*vial*), e dessorção no injetor do cromatográfico.

A MEFS depende de alguns parâmetros que garantem a eficácia na extração dos componentes, dentre os quais estão: o volume da amostra e do *headspace*, tipo e espessura da fase extratora (ou revestimento polimérico), adição de sal, pH da solução, temperatura de extração e agitação (FRANCO & JANZANTTI, 2004).

A aplicação da técnica de análise de aroma de alimentos e bebidas, especialmente de vinhos, requer conhecimentos da afinidade da fibra para os voláteis específicos em estudo, assim como, a otimização dos parâmetros experimentais para melhorar a sensibilidade e reprodutibilidade do método. MEFS combinada com CG-EM é uma metodologia muito usada para estudar a composição de voláteis de vinhos. (MESTRES et al., 2000; MARENGO et al., 2001; ROCHA et al., 2001; BONINO et al., 2003)

O método de MEFS tem sido aplicado com sucesso na análise de componentes voláteis de bebidas alcoólicas (WADA & SHIBAMOTO, 1997; AZNAR et al., 2001; LÓPEZ et al., 2003; CULLERE et al., 2003) e frutas (FISHER et al., 1995), principalmente quando outras técnicas falham na obtenção do aroma característico, por falta de compostos de maior ponto de ebulição, como também aproveitando o fato de algumas resinas terem baixa afinidade com o etanol (LÓPEZ et al., 2002), no caso de bebidas alcoólicas. Neste tipo de técnica é fundamental o ajuste do grau alcoólico, sobretudo quando se usam resinas hidrofóbicas, já que o etanol pode atuar como eluente dos compostos retidos.

Os injetores *Split* ou *Splitless* dos cromatógrafos à gás são muito adequados para realizar a dessorção dos analitos da fibra (PAWLISZYN, 1997). A válvula de divisão (*Split valve*) deve permanecer fechada durante a dessorção, para que a totalidade dos analitos sejam introduzida na coluna cromatográfica, então a dessorção tem que se dar na forma *splitless*. O diâmetro da inserção do *liner* dos injetores deve ser o mais similar possível ao diâmetro da fibra, para assegurar uma transferência rápida dos analitos do injetor a coluna (AUMATELL, 2005).

Os injetores são os responsáveis pela introdução de uma banda estreita na coluna. Os mais indicados para análise de traços são do tipo *splitless*, *on-column* e PTV (*programmed temperature vaporizer*), envolvendo efeitos de focalização da amostra na entrada da coluna capilar (GROB & ROMANN, 1981). A melhor opção para análise de compostos voláteis termolábeis é o injetor chamado *cool on-column* e PTV operando em *cold splitless*, pois evitam a decomposição térmica ou a discriminação de compostos com pontos de ebulição elevados, permitindo a



introdução direta da amostra na coluna cromatográfica sem vaporização prévia (THOMAZINI & FRANCO, 2000).

### *Separação dos Compostos Voláteis*

A mistura de voláteis obtida após o isolamento é muito complexa e requer para a sua separação a aplicação de cromatografia gasosa de alta resolução. Conforme Franco & Janzantti (2003), as colunas capilares de sílica fundida, que apresentam elevado número de pratos teóricos e com grande poder de resolução, possibilitam a separação de diversas classes de compostos químicos com largas faixas de polaridade, solubilidade e pontos de ebulição. As fases estacionárias podem ser quimicamente ligadas às paredes da coluna e, nesse caso, são chamadas de colunas quimicamente ligadas. Tais fases apresentam baixa volatilidade, estabilidade térmica e inatividade química, apresentando menor sangramento e maior tempo de vida útil da coluna.

### *Identificação dos Compostos Voláteis*

Com a introdução do sistema acoplado de cromatografia gasosa-espectrometria de massas a pesquisa de COV recebeu grande impulso. Atualmente, aparelhos sofisticados permitem obter em segundos a varredura de compostos, eluidos das colunas capilares de alta eficiência. As características dos espectros de massas são usadas na identificação de uma grande variedade de compostos orgânicos, onde as relações massa/carga obtidas podem ser transformadas em informação estrutural a partir de estudos sobre mecanismos de fragmentação dos compostos (MCLAFFERTY, 1994). Sistemas modernos de biblioteca auxiliam na identificação dos compostos desconhecidos através de comparação com espectros padrões, armazenados na memória do computador na forma de bibliotecas eletrônicas (FRANCO & JANZANTTI, 2004).

Além dos dados obtidos por espectrometria de massas, informações adicionais são necessárias para a confirmação positiva do composto. Os índices de retenção cromatográficos, comparando a ordem de eluição experimental com a ordem de eluição indicada na literatura (ETTRE, 1964) e o uso de padrões puros, auxiliam e eliminam possibilidades, aumentando a confiabilidade da identificação.

O índice de retenção de um componente é obtido por interpolação, relacionando o tempo de retenção do componente em estudo com o tempo de

retenção de dois padrões, geralmente hidrocarbonetos eluidos antes e após o pico do composto de interesse (INCZEDY et al., 1998). Os índices de retenção mais divulgados na literatura são o índice Kováts e o índice de retenção linear (IRL). O índice Kováts é aplicado para condições isotérmicas. Quando se utiliza gradiente de temperatura um valor similar pode ser calculado utilizando os números extraídos de seus algoritmos. Este valor é chamado de índice de retenção linear. Devido à complexidade das matrizes e à ineficiência nas técnicas de extração é apropriado o uso do IRL na identificação de compostos (INCZEDY et al., 1998, IUPAC, 2009).

Para a determinação dos índices de retenção geralmente uma mistura padrão de n-alcenos é injetada no sistema CG-EM operando nas condições cromatográficas estabelecidas e seus respectivos tempos de retenção são utilizados como padrões externos de referência para o cálculo do índice de Kováts ( $I$ ) e do índice de retenção linear (em inglês *LRI - Linear Retention Index*) em conjunto com o tempo de retenção de cada composto de interesse. O  $I$  de cada componente é calculado com a Equação 1.

$$IRL = 100n + 100(N - n) \left[ \frac{\ln RT(x) - \ln RT(n)}{\ln RT(N) - \ln RT(n)} \right] \quad (1)$$

Índice de Retenção Linear, o  $I^T$  (IRL ou LRI), de cada componente é calculado conforme a Equação 2.

$$IRL = 100n + 100(N - n) \left[ \frac{RT(x) - RT(n)}{RT(N) - RT(n)} \right] \quad (2)$$

onde  $I$  é o índice de retenção de Kováts e IRL é o índice de retenção linear do composto desconhecido  $x$ ,

$n$  é o número de átomos de carbono do n-alceno eluido antes do composto desconhecido  $x$ ,

N, o número de átomos de carbono do n-alcano eluido após o composto desconhecido x,  $\ln RT(x)$  é logaritmo neperiano do tempo de retenção do composto desconhecido x,

$RT(n)$  é o tempo de retenção do n-alcano eluido antes do composto desconhecido x,

$RT(N)$  o tempo de retenção do n-alcano eluido após o composto desconhecido.

Na falta de padrões disponíveis, a identificação dos COV pode ser feita através da espectrometria de massas, por comparação do espectro obtido da amostra com aqueles armazenados nas bibliotecas eletrônicas. Adicionalmente, quando possível, a identificação é confirmada por comparação do índice de retenção linear (IRL) da substância com aqueles relatados em literatura.

### *Análise multivariada*

A avaliação dos perfis de compostos voláteis que podem contribuir para o aroma do vinho de cana produzido e envelhecido por diferentes processos é difícil, devido ao grande número de COV detectados neste tipo de matriz. Nesse sentido a análise simultânea de todas as amostras e variáveis, com a análise de componentes principais (ACP) contribui como uma poderosa ferramenta para identificar semelhanças entre as amostras complexas nas quais várias componentes são medidas.

Segundo Carvalho, (2009), os métodos estatísticos multivariados consideram as amostras e as variáveis em seu conjunto, permitindo extrair informações complementares que a análise univariada não consegue evidenciar.

Ainda conforme o mesmo autor (CARVALHO, 2009), a análise multivariada reduz a complexidade do problema em questão, sem causar perda relevante de informação e, ao mesmo tempo, evidencia as relações entre as variáveis constituintes da base de dados. Um dos objetivos da utilização da análise multivariada é reduzir a representação dimensional dos dados, organizando-os em uma estrutura que facilita a visualização de todo o conjunto de dados.

Mingotti, 2005 reporta que a ACP consiste numa transformação da matriz de dados com o objetivo de representar as variações presentes em muitas variáveis, por meio de um número menor de fatores. Estas novas variáveis são obtidas em ordem decrescente de quantidade de informação estatística que descrevem, a

primeira componente principal aponta a direção de maior variação dos dados, a segunda, é ortogonal à primeira, aponta outra direção que descreve a maior variação restante dos dados e assim por diante. Hair et al. (2005), diante da perspectiva do resumo de dados, consideram que a ACP fornece ao pesquisador uma clara compreensão sobre quais variáveis podem atuar juntas e quantas variáveis podem realmente ser consideradas como tendo impacto na análise.

### *Fermentado de cana-de-açúcar*

Apesar de ser utilizado há séculos no Brasil para produção de cachaça e de existir em outras regiões do mundo, o vinho de cana, ou fermentado de cana atualmente não é conhecido, não é produzido nem comercializado, não existindo na literatura local atual nenhuma citação referente ao estudo científico deste produto.

Aperfeiçoando a tecnologia de obtenção e envelhecimento é possível se obter um fermentado de cana (vinho-de-cana) de boa qualidade com boas características sensoriais, com grande potencial agroindustrial em função dos baixos custos de produção.

Este trabalho teve por objetivo produzir, caracterizar e avaliar sensorialmente o fermentado de cana obtido do caldo fermentado e envelhecido. Também de comparar a qualidade e as características químicas e sensoriais do vinho-de-cana produzido a partir do mosto sem pasteurização inicial e com pasteurização; avaliar a evolução das características físico-químicas e químicas do fermentado de cana durante sua produção e após o seu envelhecimento; determinar os compostos voláteis formados no processo de vinificação e no envelhecimento da bebida alcoólica; comparar as características químicas e sensoriais da bebida obtidas pelos diferentes processos de produção e envelhecida em garrafas e em barris de carvalho.

## **REFERÊNCIAS**

A HISTÓRIA DA CACHAÇA. Disponível em:

<<http://www.museudacachaca.com.br/historia.html>>. Acesso em: 02 jun. 2008.

ALLEN, M. S.; LACEY, M. J.; BOYD, S. J. Methoxypyrazines in red wines: occurrence of 2-methoxy-3-(1-methylethyl) pyrazine. **J. Agric. Food Chem.**, v. 43, p.769-772, 1995.

ALMEIDA, Rômulo. **Um cálice de história**. Disponível em:  
<<http://www.cachaca.com.br/frmcachaca.html>>. Acesso em: 05 jun. 2008.

ALVES, G. L.; FRANCO, M. R. B. Headspace gas chromatography-mass spectrometry of volatile compounds in murici (*Byrsonima crassifolia* L. Rich). **Journal of Chromatography A.**, v. 985, p. 297-301, 2003.

AMERINE, M. A.; BERG, H. W.; CRUESS, W. V. **Technology of wine making**. Westport: AVI Publ., 1972.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 2145-2148, 1990.

ARTHUR, C. L. et al. Automation and optimization of solid-phase microextraction. **Anal. Chem.** v. 64, p. 1960-1966, 1992.

AUMATELL, M. R. **Caracterización de compuestos volátiles en bebidas derivadas de fruta**. 2005. 136p. Tese (Doctorat) - Universitat de Barcelona, Barcelona, 2005.

AUMATELL, M. R. et al. Characterization of volatile compounds of fruit juices and nectars by HS/SPME and GC/MS, **Food Chem.**, v. 87 p. 627–637, 2004.

AUMATELL, M. R. et al. Development of volatile compounds of cava (Spanish sparkling wine) during long ageing in contact with lees. **Food Chem.**, v.95, p.237-242, 2005.

AZNAR, M. et al. Identification and quantification of odorants of aged red wines from Rioja. GC-olfactometry, quantitative GC-MS, and odor evaluation of HPLC fractions. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 2924-2929, 2001.

BASTOS, D. H. M. et al. Composição de voláteis e perfil sensorial de méis de eucalipto e laranja produzidos nos estados de São Paulo e de Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, p. 122-129, 2002.

BAYONOVE, C. L. et al. Arômes. In: FLANZY, C. **Oenologie-fondements scientifiques et technologiques**. Paris, France: Lavoisier Tec & Doc, 1988. Cap. 5, p. 163-235.

BELITZ, H-D; GROSCH, W. Aroma substances. In: BELITZ, H-D.; GROSCH, W. (Eds.). **Food chemistry**. Berlin; Springer-Verlag, 1999. Cap.5, p. 319-377.

BERRY, D.R. Alcoholic beverage fermentations. In: LEA, A. G. H.; PIGGOTT, J. R. (Eds.). **Fermented beverage production**. London: Blackie Academic & Professional, 1995. p. 32-44.

BONINO, M. et al. Aroma compounds of an Italian wine (Ruché) by HS-SPME analysis coupled with CG-ITMS. **Food Chemistry**, v. 80, p. 125-133, 2003.

BRASIL. Decreto Nº. 6871, de 04 de jun. 2009. **Que regulamenta a Lei nº 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**. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm)> Acesso em 22/9/2009.

BRASIL. Lei Nº. 10.970 de 12 de Nov. 2004. **Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências**. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2004-2006/2004/Lei/L10.970.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2004/Lei/L10.970.htm)>. Acessado em 22/09/2009.

CÂMARA, J. S. et al. Sheterocyclic acetals in Madeira wines. **Anal. Bioanal. Chem.** v. 375, p. 1221-1224, 2003.

CAMARGO, R. **Obtenção de alimentos por fermentação. Biotecnologia, Tópicos de microbiologia industrial.** 1975, São Paulo: Edgard Blücher.

CARDELLO, H. M. A. B.; FARIA, J. B. Análise descritiva quantitativa da aguardente de cana durante o envelhecimento em tonéis de carvalho (*Quercus Alba L.*). **Ciênc. Technol. Aliment.**, v. 18, p. 169-175, 1998.

CARVALHO, S. R. L. **Referência geoquímica regional para a interpretação das concentrações de metais pesados em solos derivados de sedimentos da Formação Barreiras.** 2009, 202 f. Tese (Doutorado em Geologia) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, 2009.

CORAZZA, M. L., RODRIGUES, D. G. e NOZAKI, J. Preparação e caracterização do vinho de laranja. **Quim. Nova**, v. 24, n. 4, p. 449-452, 2001.

CESNIK, R. **Melhoramento da cana-de-açúcar.** Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2004. 307 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira.** Disponível em:

<[http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/1\\_levantamento2009\\_abr2009.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/1_levantamento2009_abr2009.pdf)>. Acesso em: set. 2009.

CULLERE, L. et al. Fast fractionation of complex organic extracts by normal-phase chromatography on a solid-phase extraction polymeric sorbent. Optimization of a method to fractionate wine flavor extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1017, p. 17-26, 2003.

DAMASCENO, F. C. **Microextração em fase sólida no modo *headspace* aplicada ao estudo de substâncias voláteis de plantas infestadas por galhas**

**foliares entomógenas.** 2007, 143 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

DUBERNET, M., Utilisation de l'analyse infrarouge à transformée de Fourier pour l'analyse oenologique de routine, **Revue Française d'Oenologie**, n. 181, p. 10-13, mar/abr. 2000.

DUBOIS, P. Les arômes des vins et leurs défauts (wines aromas and their defects). **Rev. Fr. Oenol.** v.145, p. 27-40, 1994.

ETTRE, L. S. The Kováts retention index system. **Analytical Chemistry**, v. 36, p. 31A-41A, 1964.

FARIA, J. B.; LOYOLA, E.; LÓPEZ, M. G; DUFOR, J.P. Cachaça, pisco and tequila. In: LEA, A. G. H.; PIGGOTT, J. R. (Eds.). **Fermented beverage production**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. Chapter 15, p. 335-363.

FLEET, Graham. H.; HEARD, G. M. Growth during fermentation. In: FLEET, G. H. **Wine microbiology and biotechnology**, Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1993, 507 p.

FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 2006. 1100 p.

FERREIRA, A.C.; BARBE, J.-C.; BERTRAND, A. Heterocyclic acetals from glycerol and acetaldehyde in Port wines: evolution with aging. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 2560-2564, 2002.

FERREIRA, Paula Raquel da Silva Jorge Coutinho **Volatile composition of *Vitis vinifera* L. Fernão-Pires variety from Bairrada Appellation: 1. Comparison with other major white grape varieties; 2. Development of methodologies of analysis.** 2007, 235 p. Tese (Doutorado) Universidade de Aveiro, Aveiro, 2007.



FISHER, N.; HAMMERSCHMIDT, F. J.; BUNKE, E. J. A contribution to the analysis of the flavor of cupuaçu fruit (*Theobroma grandiflorum* Spreng.). **Fruit Processing**, v. 3, p. 61-65, 1995.

FRANCO, M. R. B.; GARRUTI, D. S.; DA SILVA, M. A. A. P. Time and solvent optimization for the trapping of the volatile compounds of cashew juice and wine by suction on Porapak Q. **Revista Cubana de Química**, v. 10, p. 273-274, 1998.

FRANCO, M. R. B.; JANZANTTI, N. S. Avanços na metodologia instrumental da pesquisa do sabor. In: FRANCO, M. R. B. (Ed.). **Aroma e sabor de alimentos: temas atuais**. São Paulo: Varela, 2004. Cap. 1, p. 17-27.

FRANCO, M. R. B.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. Trapping of soursop (*Annona muricata*) juice volatiles on porapak Q by suction. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 34, p. 293-299, 1983.

FRANCO, M. R. B.; SHIBAMOTO, T. Volatile composition of some Brazilian fruits: umbu-cajá (*Spondias citherea*), camu-camu (*Myrciaria dubia*), araçá-boi (*Eugenia stipitala*) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1263-1265, 2000.

FRIVIK, S.K.; EBELER, S. E. Influence of sulfur dioxide on the formation of aldehydes in white wine. **Am. J. Enol. Vitic.** v. 54, p. 31-38, 2003.

GARRUTI, D. dos S. et al. Efeito da suplementação do mosto e da linhagem de levedura na composição de voláteis e no sabor do fermentado de caju. **Revista Ciência Agronômica**, v. 33, n. 2, p 85-92, 2002

GÓMEZ-PLAZA, E. et al. Dealcoholization of wine. Behaviour of the aroma components during the process. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.** v. 32, p. 384-386, 1999.

GROB, K.; ROMANN, A. Sample transfer in splitless injections in capillary gas chromatographic. **J. Chromatogr.**, n. 214, p. 118-121, 1981.

HAIR, J.; ANDERSON, R.; TATHAM, R. **Análise multivariada dos dados**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2005. 600 p.

HASHIZUME, T. Tecnologia do Vinho. In: BORZANI, W. et al. **Biotecnologia Industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001, v.4, p.21-68.

HAYASAKA, Y.; BARTOWSKY, E. Analysis of diacetyl in wine using solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. **J. Agric.Food Chem.** v. 47, p. 612-617, 1999.

HISTÓRIA DO VINHO - **O envelhecimento**. Disponível em: <<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/historia-do-vinho/historia-do-vinho-22.php>>. Acesso em: 29 novembro 2009.

IBÁÑEZ, E. et al. Analysis of volatile fruit components by headspace solid-phase microextraction. **Food Chemistry**, v. 63, p. 281-286, 1998.

INCZEDY, J.; LENGYEL, T.; URE, A. M.; **Compendium of analytical nomenclature: definitive rules 1997, "the orange book"**, 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 1998.

IUPAC **Retention index, I in column chromatography**. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org/R05360.html>>. Acesso em: 05 maio 2009.

JACKSON, R. S. **Wine science: principles and applications**. San Diego: Academic Press. 1993. 474p

JANZANTTI, N. S. **Compostos voláteis e qualidade de sabor da cachaça**. 2004. 178 f.. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2004

JANZANTTI; N. S.; FRANCO; M. R. B.; LANÇAS, F. M. Identificação de compostos voláteis de maçãs (*Malus domestica*) cultivar Fuji, por cromatografia gasosa-espectrometria de massas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, p. 164-171, 2000.

JENNINGS, W. G.; RAPP, A. **Sample preparation for gas chromatographic analysis**. Heidelberg: Hüthig, 1983. v. 27-28, p. 89-90.

JENNINGS, W. G.; WOHLEB, R.; LEWIS, M. J. Gas chromatographic analysis on headspace volatiles of alcoholic beverages. **Journal Food Science**, v. 37, p. 69-71, 1972.

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

LIMA, U. A. **Estudo dos principais fatores que afetam os componentes do coeficiente não álcool das aguardentes de cana**. 1964. 141 f. Tese (Concurso efetivo ao cargo de professor catedrático) - Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz, Piracicaba, 1964.

LIMA, U. A. **Biotechnologia: tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. 285 p.

LÓPEZ, R. et al. Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 966, p. 167-177, 2002.

LÓPEZ, R. et al. Impact odorants of different young white wines from the Canary Islands. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p 3419-3425, 2003.

LUZIETOSO, N. **Valorização do Conhecimento Técnico Tradicional: O Exemplo do Vinho da Cana-de-açúcar**. Disponível em: <[www.worldbank.org/afr/ik/pr/ikn24.pdf](http://www.worldbank.org/afr/ik/pr/ikn24.pdf)>. Acesso em: 31 jun. 2008.

MARAFANTE, L. J. **Tecnologia da fabricação do álcool e do açúcar**. São Paulo: Ícone, 1993, 148 p.

MARENGO, E.; ACETO, M.; MAURINO, V. Classification of Nebbiolo-based wines from Piedmont (Italy) by means of solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry of volatile compounds. **J. Chromatogr. A**, v. 943, p. 123-137, 2001.

MAURICIO, J. C. et al. The effects of grape must fermentation conditions on volatile alcohols and esters formed by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Sci. Food Agric.**, v. 75, p. 155-160, 1997.

MCLAFFERTY, F. W. **Interpretation of mass spectra**. Mill Valley, California: N. Turno, 1994. 293 p.

MESTRES, M.; BUSTO, O.; GUASH, J. Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 569-581, 2000.

MINGOTTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada**: uma abordagem aplicada. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005.

MONTECORO, G.; BERTUCCIOLI, M. The flavour of wines, vermouth and fortified wines. In: MORTON, I. D.; MACLEOD, A. J. **Developments in food science**: food flavours. Amsterdam: Elsevier, 1986. Part B, Cap. V, p. 171-238.

MORAIS, P. B. et al. Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian sugarcane. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 13, p. 241-243, 1997.

MORETTO, E. et al. **Vinhos & vinagres**: processamento e análises. Florianópolis: UFSC, 1988 168 p.

MOTTRAM, D. S. Aroma. In: MACRAE, R.; ROBINSON, R.; SADLER, M. (Eds). **Encyclopaedia of food Science, food technology and nutrition**. London: Academic Press, 1993. p.4065-4071.

MULLER, C.J.; KEPNER, R.E.; WEBB, A. D. 1,3-dioxanes and 1,3-dioxolanes as constituents of the acetal fraction of Spanish fino sherry. **Am J. Enol. Vitic.**, v. 29, p.207-212, 1978.

NONATO, E. A. et al. A headspace solid-phase microextraction method for the determination of some secondary compounds of Brazilian sugar cane spirits by gas chromatography. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, p. 3533-3539, 2001.

NOVAES, F. V. et al. **I Curso de extensão em tecnologia de aguardente de cana** Piracicaba, 1974. 104 p. (apostila).

NYKÄNEN, L.; SUOMALAINEN, H. **Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages**. Berlin: Akademik-Verlag, 1983. 413 p.

NYKÄNEN, L.; NYKÄNEN, I. Distilled beverages. In: MAARSE, H. (Ed. ). **Volatile compounds in food and beverages**. New York: Marcel Dekker, Inc, 1991. p.548-580.

PAWLISZYN, J. **Solid phase microextraction: theory and practice**. New York Wiley-VCH, 1997.

REAZIN, G. H. Chemical mechanisms of whiskey maturation. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 32, p. 283-9, 1981.

Regulamento (CE) n° 1493/1999. **Que estabelece a organização comum do mercado vitícola**. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31999R1493:PT:HTML>>.

Acesso em agosto 2009.

Regulamento (CE) nº 479/2008. **Que estabelece a organização comum do mercado vitícola que altera os Regulamentos (CE) nº. 1493/1999, (CE) nº. 1290/2003 e que revoga os Regulamentos (CE) nº. 2392/86 e (CE) nº. 1493/1999.**

Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:125:0052:0053:PT:PDF>>.

Acesso em novembro 2009.

REVEL, G.; BERTRAND, A.; LONVAUD-FUNEL, A. Synthèse des substances acétoïniques par *Leuconostoc oenos*: réduction du diacétyle. **Conn. Vigne Vin.**, v. 23, p. 39-45, 1989.

RIBÉREAU-GAYON, P. et al. **Handbook of oenology**. Paris: Jonh Wiley & Sons, 2000.

ROCHA, S. et al. Headspace solid phase microextraction (SPME) analysis of flavour compounds in wines. Effect of the matrix volatile composition in the relative response factors in a wine model. **J. Agric. Food Chem.** v. 49, p. 5142-5151, 2001.

ROJAS, V.; GIL, V. J.; PIÑAGA, F.; MANZANARES, P. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, 283-289, 2001.

ROSIER, J. P. **Manual de elaboração de vinho para pequenas cantinas**. Florianópolis: Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária, 1988. 62 p.

SANTOS, B. A. C. **Compostos voláteis e qualidade dos vinhos secos jovens varietal cabernet sauvignon produzidos em diferentes regiões do Brasil**. 2006, 155 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2006.

SLU – **Museum of Culture and arts. Sugar cane presser sugar**. Disponível em: <[http://www.slu.edu.ph/offices/arts\\_music\\_culture/museum/collections.jsp](http://www.slu.edu.ph/offices/arts_music_culture/museum/collections.jsp)> Acesso em: 21 set. 2008.

SOLES, R.M.; OUGH, C.S.; KUNKEE, R. E. Ester concentration differences in wine fermented by various species and strains of yeasts. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 33, p. 94-98, 1982.

SLINGSBY, R. W. et al. Some volatile components of vitis vinifera Variety Cabernet Sauvignon Wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 31, n. 4, p. 360-363, 1980.

STEINKRAUS, K. H. **Handbook of indigenous fermented foods**. New York: Marcel Decker, 1996.

THOMAZINI, M.; FRANCO, M. R. B. Metodologia para análise dos constituintes voláteis do sabor. **Boletim da SBCTA**, v. 34, p. 52-59, 2000.

UNICA. **Produção de cana-de-açúcar no Brasil**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>>. Acesso em: 15 out. 2009.

ULRICH, F.; GROSCH, W. Identification of the Most Intensive Volatile Flavour Compounds Formed During Autoxidation of Linolenic Acid. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, v. 184, p. 277-282, 1987.

WADA, K.; SHIBAMOTO, T. Isolation and identification of volatile compounds from a wine using solid phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4362-4366, 1997.

YOKOYA, F. **Fabricação da aguardente de cana**. Campinas, SP: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1995. 92p. (Série fermentações industriais, n. 2).

# **CAPÍTULO 1**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FERMENTADOS ALCOÓLICOS DE  
CANA-DE-AÇÚCAR PRODUZIDOS A PARTIR DE GARAPA NATURAL E  
PASTEURIZADA**



## PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FERMENTADOS ALCOÓLICOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRODUZIDOS A PARTIR DE GARAPA NATURAL E PASTEURIZADA

### RESUMO

Este trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar físico-química e sensorialmente fermentados alcoólicos de cana-de-açúcar obtidos da garapa natural (FN) e obtidos da garapa pasteurizada (FP). Observou-se que a pasteurização proporcionou mudanças significativas ( $p \leq 0,01$ ) nas características físico-químicas da garapa antes da fermentação. Os dois tipos de fermentados apresentaram características físico-químicas (acidez total titulável, acidez volátil, acidez fixa, sólidos solúveis e açúcares) diferentes ( $p \leq 0,01$ ), porém todas as suas concentrações estavam dentro dos limites do padrão estabelecido pela legislação brasileira. A pasteurização influenciou também as características sensoriais fazendo com que a avaliação sensorial do FP fosse superior a do FN na maioria dos atributos

Palavras-chave: vinho de cana; *Saccharum hybrida*; fermentação.

## PRODUCTION AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF SUGAR CANE WINE OBTAINED OF NATURAL AND PASTEURIZED GARAPA.

### ABSTRACT

This work aimed to produce and characterize the physico-chemical and sensorial sugar cane wine obtained from natural garapa (NW) and obtained from pasteurized garapa (PW). It was observed that pasteurization provided significant changes ( $p \leq 0.01$ ) in the physico-chemical characteristics of garapa. The two types of wines presented physical and chemical properties (acidity, fixed acidity, solid and soluble sugars) different ( $p \leq 0.01$ ), but all concentrations were within the standard limits established by the Brazilian legislation. Pasteurization also affected the sensory characteristics causing the sensory evaluation of wine (PW) was superior to the (NW) in most attributes.

Keywords: Sugar cane wine; *Saccharum hybrida*; fermentation.

## 1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*) é uma planta originária do sudeste da Ásia, onde é cultivada desde épocas remotas, principalmente a espécie *Saccharum officinarum*. O surgimento de várias doenças e de uma tecnologia mais avançada exigiu a criação de híbridos através do cruzamento da *S. officinarum* com outras quatro espécies do gênero *Saccharum* e posteriormente, por meio de retrocruzamento foram obtidos híbridos, novas variedades e cultivares híbridas (Marafante, 1993).

Na África, principalmente em Angola, Congo, e República Democrática do Congo (RDC), a cana-de-açúcar além de outros usos é utilizada para produção de vinho de cana a partir do caldo fermentado, o qual é denominado de *Lunguila*, uma bebida de produção artesanal e tradicional nesses locais (Luzietoso et al., 2008; SLU – M. C. A., 2008).

Nas Filipinas, e região circunvizinha, é produzido um vinho de cana denominado de *Basi*, onde o caldo de cana-de-açúcar é extraído, fervido e fermentado por até três meses, e envelhecido por até um ano. O produto final, de cor marrom claro, é doce e meio ácido (Steinkraus, 1996). O envelhecimento é feito em um *burnay* (jarro de barro grande), sendo que quanto mais longo o envelhecimento, melhor e mais encorpado é o vinho. O *basi* é uma das bebidas tradicionais utilizada em cerimônias e rituais, fazendo parte da cultura filipina (Steinkraus, 1996; SLU – M. C. A., 2008).

No México Rivera-Espinoza et al. (2005) elaboraram três vinhos de cana-de-açúcar, um mantendo as características do caldo e em dois utilizaram suco concentrado de maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) e de vinagreira (*Hibiscus sabdarifa*) como aromatizantes. Testaram duas leveduras, quantidades diferentes de inóculos, diferentes temperaturas de fermentação e fizeram a caracterização físico-química e sensorial das bebidas que apresentaram boa aceitação, principalmente as aromatizadas.

Segundo Rosier, (1988) vinho é uma bebida alcoólica, resultante da fermentação do mosto de uvas frescas, sãs e maduras por intermédio de leveduras, as quais transformam o açúcar em álcool e numa série de elementos secundários em quantidades variadas, de modo que o produto adquira características próprias que o identificam como uma das bebidas mais requisitadas no mundo. No Brasil é

proibida a aplicação do termo “vinho” a produtos obtidos a partir de outras matérias-primas (Brasil, 2004).

Pelo Regulamento (CE) N.º 1493/1999 (2008), é permitido aos países membros da organização comum do mercado vitivinícola a utilização da palavra "vinho" acompanhada de um nome de fruto e sob a forma de denominações compostas para a designação de produtos obtidos a partir da fermentação de frutos que não as uvas. Os "vinhos" resultantes são geralmente designados em função do fruto a partir do qual são obtidos (por exemplo, vinho-de-maçã, vinho-de-laranja) e são genericamente conhecidos como vinhos de frutas, entretanto, a partir de abril de 2009 foi publicado novo regulamento (Regulamento (CE) N.º. 479/2008, 2009) que revogou entre outros o regulamento (CE) N.º. 1493/1999.

No Brasil o vinho de cana, é utilizado para produção de bebida destilada (cachaça). Entretanto, a sua produção e comercialização pode ser uma alternativa viável, de baixo custo e alto valor agregado. O maior desafio para o desenvolvimento da tecnologia adequada de produção de uma bebida é a definição da composição química do produto final, pois o conhecimento das características da bebida permite à indústria ter o controle da sua qualidade e do tempo de produção. Segundo a legislação brasileira, fermentado de cana é a bebida com a graduação alcoólica máxima de 14 % em volume a 20 °C, obtida do mosto de caldo de cana-de-açúcar fermentado (Brasil, 2009).

Este trabalho teve por objetivo produzir fermentado de cana de açúcar obtido por dois diferentes processos, caracterizar a caldo de cana, o mosto ao longo do procedimento de produção e avaliar as características físico-químicas e sensoriais das bebidas envelhecidas em garrafas.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### *2.1. Local*

O trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Bioquímica e de Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (CCAAB/UFRB), em Cruz das Almas – BA. Foi utilizada cana de açúcar da espécie *Sacharum sp.* colhida no dia do

processamento, no campus UFRB de Cruz das Almas, Bahia (12°48'38"S e 39°6'26"W), na região nordeste do Brasil.

## 2.2. Produção do fermentado de cana e coleta de amostras

A processo de produção do fermentado de cana-de-açúcar foi adaptada da metodologia de produção de vinhos de frutas descrita por Moretto et al. (1988).

No laboratório, a cana, após seleção inicial, descartando os colmos rachados, contaminadas por insetos, foi raspada, processada e o caldo da cana (garapa) foi extraído através de moenda previamente sanitizada com água fervente e água clorada. Sessenta litros da garapa foram pasteurizados a 80 °C por 3 min e imediatamente resfriado a 5 °C. Um volume igual não foi pasteurizado constituindo o segundo tratamento, ambos foram conduzidos em três repetições. A temperatura e tempo da pasteurização foram estabelecidos em ensaio prévio com caldo de cana (resultados não apresentados).

Na produção do fermentado de cana, os mostos foram sulfitados com metabissulfito de potássio ( $K_2S_2O_5$ ), 0,1 g L<sup>-1</sup>, e a acidez foi corrigida com ácido cítrico, até a obtenção de pH igual a 3,5 para facilitar o desdobramento da sacarose e em conjunto com a sulfitação ser mais efetivo o controle de microrganismos indesejáveis, conforme Moretto et al. (1988). Em seguida foram acrescidos 5 % de *Saccharomyces cerevisiae*, na forma de pé de cuba previamente preparado com o caldo de cana enriquecido com fosfato de amônio (0,3 g L<sup>-1</sup>) e levedura liofilizada comercial para panificação (5 g L<sup>-1</sup>).

Os mostos foram acondicionados em vasilhames plásticos com capacidade para 15 L (Figura 1), adaptados para fermentação, fechados, com sistema de escapamento de gases, com batoque hidráulico e sistema de esvaziamento adequado para separação da borra no momento das trasfegas (transferência de um vasilhame para outro após a decantação – Figura 2).

A fermentação alcoólica inicial durou 9 dias, aos 20 dias foi feita a primeira trasfega. Aos 45 dias após o início da fermentação foi feita a segunda trasfega com a chaptalização (correção dos SST para 15 ° Brix com melado e sacarose: para o Mosto Natural - 600 g de melado e 90 g de sacarose e para o Mosto Pasteurizado - 600 g e 70 g) e nova correção da acidez com ácido cítrico 3,33 g L<sup>-1</sup> para baixar o pH para 3,0. Após a última trasfega, aos 60 dias, os fermentados foram acondicionados em garrafas de vidro para envelhecer por um ano em condições

ambientais à temperatura média de 28 °C. As amostras foram colhidas do caldo de cana, ao longo do processo de produção e após o envelhecimento, em triplicatas, estocadas em frascos de vidro âmbar de 500 mL e congelados a -18 °C.

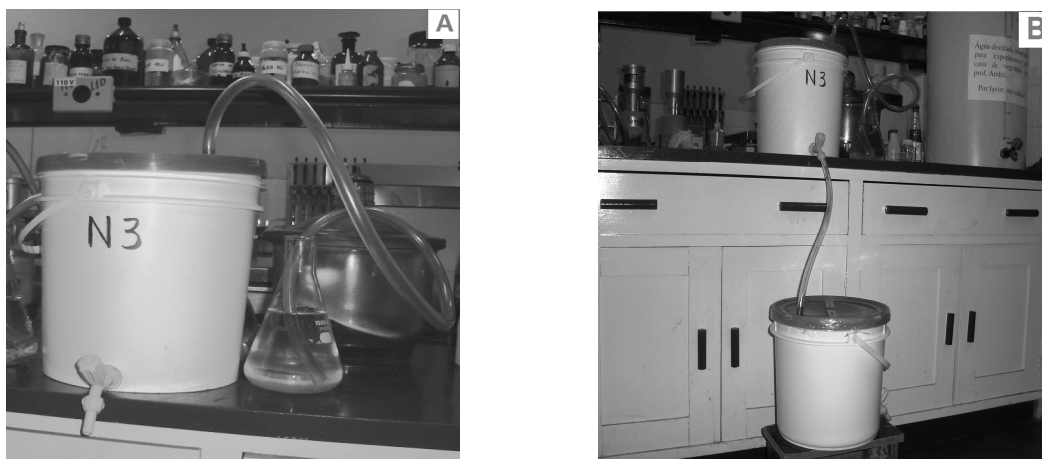


Figura 1 (A) Vasilhame utilizado para fermentação do mosto, (B) trasfega - transferência de um vasilhame para outro após a decantação para separação da borra.

### 2.3. Análises físico-químicas

Análises físico-químicas realizadas nas amostras da garapa natural e pasteurizada, nos mostos das três trasfegas e nos fermentados envelhecidos foram:

- Sólidos solúveis totais (SST) - leituras feitas em refratômetro manual com escala de 0 a 32 °Brix (IAL, 1985).
- O pH foi determinado diretamente através de um potenciômetro digital devidamente calibrado, introduzindo-se o eletrodo em 10 mL da amostra (IAL, 1985).
- Acidez Total Titulável (ATT) feita por titulação volumétrica de 10 mL do mosto, diluído a 50 mL com água destilada, com solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, e 3 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína a 1%. Os resultados foram expressos em meq L<sup>-1</sup> (IAL, 1985).
- Acidez volátil foi baseada na titulação dos ácidos voláteis, separados da amostra por meio de arraste de vapor com aparelho de destilação de Cazenave – Ferré, destilou-se 10 mL de amostra e recuperou-se 100 mL da amostra destilada e

- diluída por vapor. A titulação do destilado foi realizada com NaOH 0,1 M, 3 gotas de fenolftaleína a 1% e o resultado expresso em meq L<sup>-1</sup> (Moretto et al., 1988).
- e) Acidez fixa foi determinada pela diferença entre a acidez total e acidez volátil e expressa em meq L<sup>-1</sup> (Moretto et al., 1988).
  - f) Açúcares Totais e Redutores foram determinados pelo método de Lane & Eynon e os resultados expressos em g L<sup>-1</sup> (IAL, 1985).
  - g) O grau alcoólico real foi determinado por meio da destilação de 200 mL das amostras de fermentado e coleta de  $\frac{3}{4}$  do volume inicial. Após resfriamento em banho de água gelada, transferiu-se para proveta e completou-se o volume com água destilada para 200 mL. A quantificação do teor alcoólico real foi realizada pelo método densimétrico, utilizando-se alcoômetro de Gay-Lussac. O resultado obtido foi expresso em percentagem de álcool em volume ou °GL. Para se obter a percentagem de álcool em peso multiplicou-se o resultado do álcool em volume por 0,8 (Moretto et al., 1988).

#### *2.4. Análise Sensorial*

A análise sensorial foi realizada na UFRB por um grupo de provadores constituído de 54 pessoas não treinadas, de ambos os sexos, com idades variando entre 20 e 50 anos. As amostras codificadas foram servidas (30 mL) em copos plásticos descartáveis de 50 mL, em ambiente claro, uma de cada vez. As amostras estavam acompanhadas de biscoito, copo d'água e da ficha de avaliação.

Foi utilizado um teste afetivo (teste de aceitação ou de preferência), por meio de uma escala hedônica estruturada com valores variando de 1 a 9, na qual os extremos correspondem a “desgostei muitíssimo” a “gostei muitíssimo”, para estimar o aroma, sabor, textura, dulçor, acidez, adstringência, amargo, transparência, cor, aparência e grau alcoólico do fermentado, a aceitação global e teste de intenção de compra com uma escala estruturada variando de 1 a 5, que correspondem nos seus extremos a “certamente não compraria” e a “certamente compraria”.

#### *2.5. Análise estatística*

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Realizou-se a análise de variância (ANOVA), sendo que para os resultados significativos foi feito o teste de Tukey e de Scott-Knott. Também foi utilizada análise multivariada - Análise de Componentes Principais (ACP), para determinar a

distribuição das diferentes características físico-químicas no caldo de cana natural e pasteurizado ao longo da produção dos fermentados, assim como, as análises físico-químicas e sensoriais nos fermentados envelhecidos, utilizando os softwares SISVAR 4.6<sup>®</sup>, STATISTICA 7.1<sup>®</sup> e SPSS 17.0<sup>®</sup>.

As componentes foram extraídas a partir da matriz de correlação, adotando-se o critério Kaiser (HAIR et al., 2005); assim, foram mantidas no sistema apenas as componentes relacionadas aos autovalores  $\lambda \geq 1$ . Aliado a isto, considerou-se a percentagem da variância acumulada (que deve ser superior a 70 %) na seleção das componentes.

Os autovalores são as variâncias das componentes principais, enquanto que os autovetores dão os coeficientes das variáveis padronizadas usadas para calcular as componentes principais (MANLY, 2008). Utilizou-se a rotação normalizada Varimax (HAIR et al., 2005), que maximiza as variâncias dos loadings (cargas fatoriais), promovendo um rearranjo dos autovalores.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### *3.1 Caldo de cana (Garapa)*

Os resultados das análises das características físico-químicas da garapa natural e pasteurizado podem ser observados na Tabela 1.

Pode-se observar na Tabela 1 que o processo de pasteurização promoveu modificações significativas nas características físico-químicas da garapa. Houve redução do pH, aumento da acidez total titulável (ATT), aumento dos sólidos solúveis totais (SST) e aumento do teor de açúcares redutores (AR). Apesar de terem ocorrido alterações no teor de açúcares totais (AT) e dos açúcares não redutores (ANR) estas diferenças não foram significativas.

O tipo e a forma de pasteurização da garapa possivelmente pode ter promovido a aceleração inicial da atividade enzimática e a promoção de diversas reações, entre elas as de oxidação de aldeídos e hidrólise da sacarose e do amido. Conseqüentemente houve aumento das concentrações de açúcares redutores e de ácidos orgânicos, com isso afetou direta e significativamente o pH, a ATT e os AR. Quanto aos SST, o aquecimento em sistema aberto pode ter promovido a perda de umidade e aumento da concentração dos sólidos solúveis no caldo.



Tabela 1. Características físico-químicas da garapa natural e pasteurizada.

Características	Garapa	
	Natural	Pasteurizada
pH**	5,14 b	4,86 a
ATT (meq L <sup>-1</sup> )**	5,0 a	8,67 b
SST (° Brix)**	22,58 a	23,08 b
AR (g L <sup>-1</sup> )**	14,4 a	25,0 b
AT (g L <sup>-1</sup> ) <sup>ns</sup>	205,2	197,8
ANR (g L <sup>-1</sup> )*	190,8 b	172,8 a

ATT – acidez total titulável, SST – sólidos solúveis totais, AR – açúcares redutores, AT – açúcares totais, ANR- açúcares não redutores; \*p<0,05, \*\*p<0,01, ns – diferença não significativa; médias seguidas da mesma letra na mesma linha não diferem significativamente (p<0,05) pelo teste de Tukey.

Contrariamente Amaro, Bonilha & Monteiro (2002) ao estudarem o efeito do tratamento térmico nas características físico-químicas de polpa de maracujá pasteurizada nas temperaturas de 70,75 e 80 °C por 30 seg, observaram que o processamento não afetou o pH, nem a acidez do produto. Houve aumento significativo do teor de SST, que foi explicado pelos autores como perda de água durante o processamento com conseqüente aumento da concentração.

Resultados similares foram obtidos por Oliveira et al. (2007) ao estudarem o efeito do processamento térmico (75 °C por 25 min) e da radiação ionizante na conservação de caldo de cana. Os autores observaram que o aquecimento não promoveu alterações nas características físico-químicas (pH, acidez e SST) da garapa. As alterações significativas do pH e da acidez detectadas foram decorrentes da adição de ácido cítrico. Neste estudo o caldo de cana estava envasado em embalagens de polietileno de alta densidade (PEAD), com capacidade volumétrica de 300 mL onde foi pasteurizado, por imersão em pasteurizador modelo Mar-Girius Continental, o que tornou o efeito do aquecimento mais imediato e não permitiu a ocorrência das reações que pudessem afetar as características físico-químicas do produto.

A composição centesimal da garapa, assim como as características físico-químicas variam com a variedade da cana, região, clima, tipo de solo, manejo da cultura, adubação, época da colheita, grau de maturação, o tempo de transporte, a forma e tempo de processamento e outros fatores (Delgado *apud* Oliveira et al., 2007).

Rivera-Espinoza (2005) relatam em seu trabalho as características do caldo de cana como: pH - 5,1, SST - 19,7 ° Brix, AT- 200 g L<sup>-1</sup>; ATT (ácido cítrico) - 1,16 g L<sup>-1</sup> ou 54 meq L<sup>-1</sup> de NaOH.

Oliveira et al. (2007) descreveram as características do caldo de cana natural como: pH - 5,28, SST - 22,74, ATT - 0,04 % de ácido cítrico ou 6,25 meq L<sup>-1</sup> de NaOH.

Prati & Camargo (2008) no estudo das características do caldo de cana encontraram pH - 5,46, SST - 24,50 ° Brix, AR - 8 g L<sup>-1</sup>, ANR - 230 g L<sup>-1</sup>; ATT - 0,047 % de ácido cítrico ou 7,34 meq L<sup>-1</sup> de NaOH.

### 3.1.1 ACP da garapa

A partir da matriz de correlação entre as características físico-químicas dos dois diferentes tipos de caldo de cana ou garapa (natural e pasteurizada), calcularam-se as componentes principais, o que possibilitou integrar as múltiplas informações extraídas e identificar quais as características que melhor distinguem as garapas estudadas. A representação da distribuição dos casos de dispersão das garapas e das características das duas primeiras componentes principais podem ser observadas nas Figuras 1 A e B.

Na ACP da garapa natural (GN) e pasteurizada (GP) a primeira das duas componentes explicou 70,16 % do total da variância, e as duas componentes explicaram 94,83 %.

A análise das amostras de GP significativas mostrou tendência a se agruparem assim como as amostras de GN, como pode ser observado na Figura 1B (projeção dos casos no plano). Em relação ao Fator 1, rotulado como açúcares, três coeficientes fatoriais significativos foram positivos, SST (0,870), AR (0,972) e ATT (0,984) e um coeficiente negativo, pH (-0,936), o fator 2 rotulado como acidez apresentou dois coeficientes fatoriais significativos negativos AT (-0,999) e ANR (-0,902) o que pode ser observado na Figura 1 A (projeção das variáveis no plano). As amostras de GP apresentaram menor pH, acidez mais elevada e maior teor de

sólidos solúveis totais que foram suficientes para discriminá-las das amostras de GN.

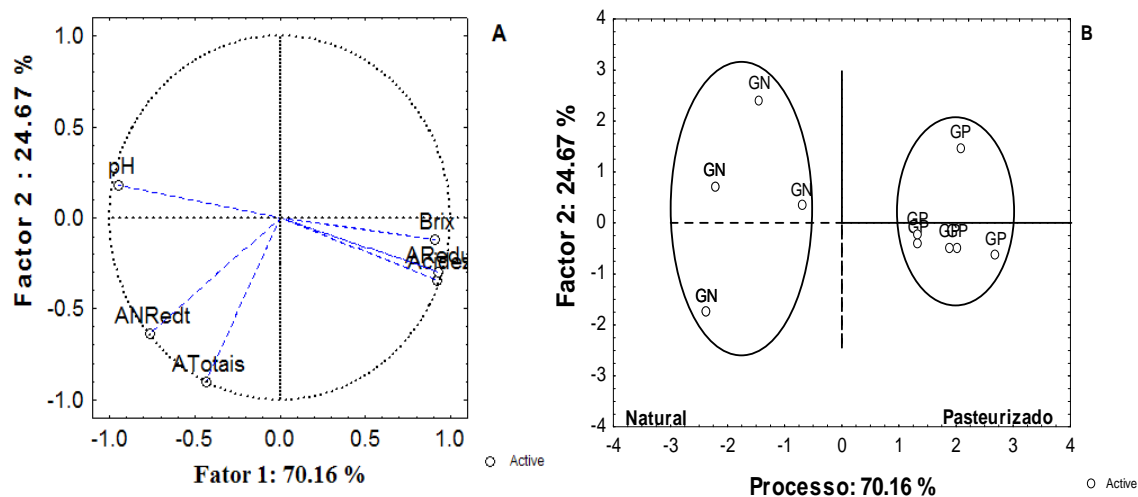


Figura 1. Gráficos da ACP (A. projeção das variáveis no plano; B. projeção dos casos no plano) apresentando os escores significativos baseados nas características físico-químicas do caldo de cana no que diz respeito aos fatores 1 e 2. GN – Garapa Natural; GP – Garapa Pasteurizada.

### 3.2 Mostos e fermentados de cana

Os resultados das análises das características físico-químicas dos mostos (trasfegas 1, 2 e 3) e dos fermentados envelhecidos obtidos da fermentação da garapa natural e pasteurizada podem ser observados na Tabela 2.

Os valores de pH foram decrescentes ao longo do processo de produção do fermentado, sendo que o pH da garapa foi corrigido com ácido cítrico de 5,14 da GN e 4,86 da GP para 3,5, antes do início da fermentação, e na segunda trasfega foi feita a correção com ácido cítrico para baixar o pH para 3, a partir daí a redução ocorreu em função dos ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação e maturação dos fermentados. Os fermentados envelhecidos, FN e FP apresentaram pH de 2,81 e 2,80, respectivamente que não diferiram significativamente pelos testes de médias.

Tabela 2. Características físico-químicas dos mostos e fermentados de cana-de-açúcar, obtidos da garapa natural e pasteurizada, ao longo do processo de produção e após o seu envelhecimento.

Características	MOSTOS E FERMENTADOS							
	T1N	T1P	T2N	T2P	T3N	T3P	FN	FP
pH**	3,31Dd	3,36De	3,08Cc	3,06Cc	2,95Bb	2,93Bb	2,81Aa	2,80Aa
ATT** (meq L <sup>-1</sup> )	51,67Aa	50,50Aa	115,00Dd	116,83 Dd	97,50Cc	96,50Cc	82,00Bb	85,12Bb
AV** (meq L <sup>-1</sup> )	9,58Cc	8,82Cc	2,83Aa	6,12A b	5,15Bb	5,73Bb	19,26De	10,25Dd
AF** (meq L <sup>-1</sup> )	42,08Aa	41,68Aa	112,17De	110,72De	92,35Cd	90,78Cd	57,15Bb	74,87Bc
SST** (° Brix)	7,33Aa	10,43Ab	12,67Cc	15,13C d	12,61Bc	14,63Bd	12,60Bc	14,40Bd
AR** (g L <sup>-1</sup> )	0,88Aa	3,97Ab	3,46Bb	6,22B c	5,44Cc	8,33Cd	5,90Cc	7,87Cd
AT** (g L <sup>-1</sup> )	0,89Aa	3,99Ab	6,24Bcd	8,62B f	6,31Bd	8,64Bf	5,90Bc	7,87Be
ANR** (g L <sup>-1</sup> )	0,01Aa	0,03Aa	2,77Bc	2,41Bc	1,04Ab	0,32Aa	0,00Aa	0,00Aa
GA** v/v (GL)	13,00Bb	13,00Bb	13,00Bb	12,90B b	13,25Bb	12,80Bb	11,50Aa	11,50Aa
GA** p/v (GL)	10,40Bb	10,40Bb	10,40Bb	10,32Bb	10,60Bbc	10,24Bb	9,20Aa	9,20Aa

T1N, T2N, T3N, T1P, T2P, T3P – correspondem a 1ª, 2ª e 3ª trasfegas; FN e FP – Fermentados envelhecidos; a letra N e P correspondem aos mostos e fermentados originados da garapa natural e pasteurizada, respectivamente; ATT – acidez total titulável, AV – acidez volátil, AF – acidez fixa, SST- sólidos solúveis, AR – açúcares redutores, AT – açúcares totais, ANR – açúcares não redutores; GA – grau alcoólico; \*p<0,05, \*\*p<0,01, médias dos tratamentos seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem significativamente (p<0,05) pelo teste de Tukey, médias dos tratamentos nos períodos seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem significativamente (p<0,05) pelo teste de Tukey.

Pode-se observar na Tabela 2 que apesar da pequena variação do pH em função da correção com adição do ácido cítrico, a ATT apresentou uma grande variação da trasfega 1 para a 2, o que poderia ser explicado pela presença de substâncias tamponantes.

Os valores da ATT foram crescentes durante o processo da fermentação. Com a adição de ácido cítrico, para a correção da acidez da garapa (de 5,0 meq L<sup>-1</sup> na GN e 8,67 meq L<sup>-1</sup> na GP) a ATT aumentou para 51,67 meq L<sup>-1</sup> e 50,50 meq L<sup>-1</sup>, respectivamente, na primeira trasfega. Com a segunda correção na segunda trasfega os valores médios foram 115,0 meq L<sup>-1</sup> e 116,83 meq L<sup>-1</sup>, com tendência de decréscimo ao longo do processo de produção e do envelhecimento.

Provavelmente esse decréscimo ocorreu devido a reações de esterificação dos ácidos orgânicos com alcoóis com a formação de ésteres e a formação de acetato. Esse último quando na forma de sal sódico pode funcionar como tampão, o

que explicaria a resistência à variação do pH, visto que mesmo com a redução da acidez o pH não aumentou, pelo contrário apresentou uma pequena redução que diferiu significativamente da última trasfega. Os valores médios da ATT ficaram dentro dos teores exigidos pela legislação brasileira para vinhos (BRASIL, 2004), de 55 a 130 meq L<sup>-1</sup>. Para o FN a ATT ficou em 82,0 meq L<sup>-1</sup> e para o FP em 85,12 meq L<sup>-1</sup>.

Para os dois tipos de fermentados, a acidez volátil que indica a presença de ácido acético e seus derivados, ficou abaixo do limite máximo estabelecido pela legislação brasileira que é de 20 meq L<sup>-1</sup> (BRASIL, 2004). O FN apresentou 19,26 meq L<sup>-1</sup> e o FP 10,25 meq L<sup>-1</sup>. Durante as trasfegas houve variação significativa da AV, no início da fermentação, se mantendo constante após a 2ª trasfega, entretanto, os maiores valores foram observados após o envelhecimento, sendo que o FN apresentou valor médio próximo ao limite permitido para vinhos.

A acidez volátil está relacionada principalmente à presença dos ácidos acético, fórmico e butírico. Neste parâmetro valores elevados indicam a presença de microrganismos indesejáveis após a elaboração, principalmente o *Acetobacter*, que eventualmente pode converter o vinho em vinagre (Costa, 1993). Além disto, quanto maior a acidez volátil, menor o teor alcoólico. O autor reforça que para prevenir doenças de azedia no vinho (fermentação acética), um dos principais cuidados é manter o recipiente sempre bem atestado (preenchido até o topo) durante o processo de produção e envelhecimento.

Quanto aos açúcares totais estes fermentados envelhecidos podem ser comparados aos vinhos classificados como *demi-sec* ou meio seco, pelos teores de açúcar encontrados 5,90 a 7,87 g L<sup>-1</sup>, que ficaram dentro da faixa de 5,1 a 20 g L<sup>-1</sup> estabelecida pela legislação (BRASIL, 2004).

O tratamento natural, no qual a garapa não sofreu pasteurização, provavelmente apresentou além da *Saccharomyces cerevisiae*, leveduras selvagens e outros microrganismos (que não foram controlados pelo processo de sulfitação), o que possivelmente promoveu maior consumo dos açúcares (AR e AT) ao longo de todo o processo fermentativo em relação ao tratamento pasteurizado.

Os teores de SST foram reduzidos drasticamente da garapa para a primeira trasfega nos dois tratamentos, caindo de 22,58 °Brix na GN para 7,33 °Brix na T1N, e 23,08 °Brix na GP para 10,43 °Brix na T1P, devido ao consumo dos açúcares pelas leveduras para produção do etanol, sendo que o tratamento natural (que não

sofreu pasteurização), a redução foi significativamente maior, possivelmente devido a presença de leveduras selvagens.

A partir da segunda trasfega, com a correção da acidez e a chaptalização, os teores de SST aumentaram para 12,67 °Brix na T2N e 15,13 °Brix na T2P e praticamente se mantiveram nesses patamares após o envelhecimento dos fermentados. As reduções observadas não diferiram significativamente dos valores da segunda trasfega. Os teores de SST sofreram influência do melado adicionado, assim como do ácido cítrico utilizado na correção da acidez, como podem ser observadas na Tabela 2, as concentrações de AR, AT e da ATT e AV.

Os sólidos solúveis, lidos pelo refratômetro em °Brix representam a soma de todos os sólidos dissolvidos na água como: açúcares, sais, aminoácidos, peptídeos, proteínas, ácidos, e outros compostos solúveis.

Os dois fermentados envelhecidos apresentaram graduação alcoólica dentro das especificações da legislação, FN 11,5 °GL e o FP 11,5 °GL valores comparáveis aos estabelecidos para os vinhos de mesa, na faixa de 8,6 a 14 °GL (Brasil, 1973). Os teores alcoólicos foram superiores aos 10 % v/v de álcool no fermentado de cana sem envelhecimento obtido por Rivera-Espinoza et al. (2005).

O grau alcoólico (GA) após a fermentação inicial alcançou valores médios de 13,0 °GL nos dois tratamentos e foi reduzindo ao longo do processo de envelhecimento provavelmente devido a oxidação à ácido acético e a formação de ésteres.

### *3.2.1 ACP dos mostos e fermentados obtidos da garapa natural e pasteurizada*

A Figura 3 apresenta os resultados da ACP das trasfegas dos mostos e dos fermentados de cana-de-açúcar obtidos da garapa natural e pasteurizada. A ACP das duas primeiras componentes principais representa a distribuição dos casos de dispersão das trasfegas dos mostos e fermentados.

Para a análise das componentes principais dos mostos e fermentados obtidos dos dois processos, duas componentes foram suficientes para explicar 86,80 % do total da variância, a primeira e a segunda componente representaram respectivamente, 49,27 e 37,53 % do total da variação.

Na Figura 3B observa-se que em relação a componente 1, rotulada de açúcares, a sequência do processo de produção do fermentado ficou evidenciada na distribuição dos grupos correspondentes a cada trasfega pelos quadrantes de

acordo com a idade. Na sequência as trasfegas T1, T2 e T3 e posteriormente os fermentados envelhecidos.

Para a componente 1 – açúcares, os coeficientes fatoriais (loadings), significativos  $>0,800$ , que proporcionaram a discriminação das trasfegas e dos fermentados foram cinco, correspondentes as características SST (0,967), AR (0,812), AT (0,969), ATT (0,868) e AF (0,803), ver Figura 3A. Para a componente 2 – álcool, os coeficientes fatoriais que proporcionaram a discriminação das trasfegas e dos fermentados foram três, um negativo correspondente a AV(-0,882) e dois positivos GAv/v (0,904) e GAp/v (0,904).

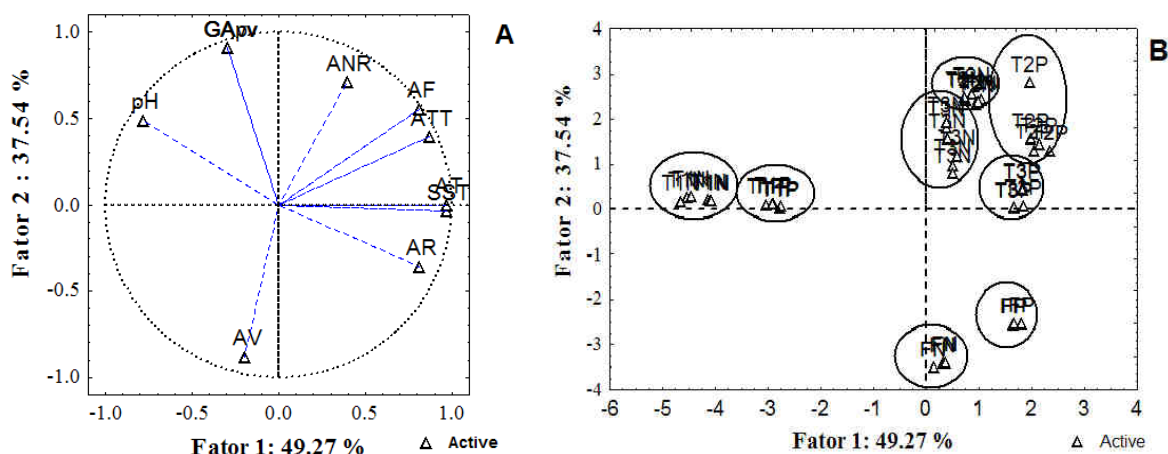


Figura 3 Gráfico da ACP (A. projeção das variáveis no plano; B. projeção dos casos no plano) apresentando os escores significativos baseados nas características físico-químicas dos mostos e fermentados obtidos da garapa natural e pasteurizada. T1N e T1P– 1ª trasfega; T2N e T2P – 2ª trasfega; T3N e T3P 3ª trasfega; FN e FP – Fermentados Natural e Pasteurizado.

### 3.3 Análise sensorial

Na Tabela 3 são apresentadas as médias das notas da avaliação sensorial dos atributos dos fermentados avaliados pelos provadores.

A bebida obtida da garapa pasteurizada (FP) apresentou boa avaliação em quase todos os atributos. Transparência e grau alcoólico ficaram com médias próximas a 7 (“gostei regularmente”), para a maioria dos atributos, aroma, textura,

dulçor, acidez, adstringência, amargor, aparência e cor, sendo que as médias ficaram em torno de 6 (“gostei ligeiramente”). O sabor ficou com média 5 (“Indiferente”).

Tabela 3. Frequência e média das notas para os atributos da análise sensorial dos fermentados natural (FN) e pasteurizado (FP).

Atributo	Amostra	Notas									Total de prov.	Médias
		9	8	7	6	5	4	3	2	1		
Aroma	FN	2	13	9	10	4	4	5	4	3	54	5,7 a
	FP	4	10	17	9	6	2	3	2	1	54	6,3 b
Sabor	FN	0	4	9	9	2	9	12	4	5	54	4,5 a
	FP	1	3	10	14	3	17	2	3	1	54	5,2 b
Textura	FN	1	6	15	13	8	3	2	5	1	54	5,7 a
	FP	2	11	14	11	8	2	4	2	0	54	6,2 b
Doçura	FN	0	1	8	11	9	11	4	5	5	54	4,6 a
	FP	1	8	10	10	7	9	7	1	1	54	5,5 b
Acidez	FN	0	2	7	15	9	7	9	4	1	54	4,9 a
	FP	3	8	10	12	6	7	6	1	1	54	5,8 b
Adstringência	FN	2	10	6	7	10	10	4	3	2	54	5,4 a
	FP	7	10	10	11	8	5	2	0	1	54	6,4 b
Transparência	FN	2	9	10	15	9	4	3	2	0	54	6,0 <sup>ns</sup>
	FP	3	16	11	8	8	7	0	1	0	54	6,5 <sup>ns</sup>
Amargo	FN	1	7	8	9	4	9	11	3	2	54	5,0 a
	FP	5	12	7	9	6	5	7	3	0	54	5,9 b
Cor	FN	3	7	12	16	6	5	3	1	1	54	6,0 <sup>ns</sup>
	FP	5	6	16	7	10	4	1	3	2	54	6,0 <sup>ns</sup>
Aparência	FN	3	7	16	11	8	4	3	1	1	54	6,1 <sup>ns</sup>
	FP	7	6	17	5	8	6	2	1	2	54	6,2 <sup>ns</sup>
Grau Alcoólico	FN	4	9	16	6	5	7	5	2	0	54	6,1 <sup>ns</sup>
	FP	6	10	14	13	5	3	1	1	1	54	6,5 <sup>ns</sup>
<b>Aceitação global</b>	FN	0	6	11	9	8	6	10	4	0	54	5,2 a
	FP	1	9	9	15	7	7	4	2	0	54	5,8 b

9 – Gostei muitíssimo, 8 - Gostei muito, 7 – Gostei regularmente, 6 - Gostei ligeiramente, 5 – Indiferente, 4- Desgostei ligeiramente, 3 - Desgostei regularmente, 2 - Desgostei muito, 1 - Desgostei muitíssimo. ns – não diferem estatisticamente, médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

O FN obteve médias 6 (“gostei ligeiramente”) para os atributos aroma, textura, transparência, grau alcoólico, cor e aparência. O dulçor, acidez, adstringência, amargo e sabor ficaram com média 5 (“indiferente”).

As amostras de FP foram significativamente diferentes das do FN para seis atributos evidenciando melhor aceitação e o efeito do processo de pasteurização



sobre a qualidade da bebida final. Pela avaliação dos provadores a pasteurização melhorou significativamente os atributos da bebida fermentada.

Pelo teste de aceitação global (Tabela 3) os fermentados de cana FN e FP diferiram significativamente entre si ( $p < 0,05$ ), apresentando médias de 5,2 e 5,8, que correspondem a “indiferente” e “gostei ligeiramente”, respectivamente.

Os valores de intenção de compra apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,01$ ), sendo a maior média conseguida pela bebida obtida da garapa pasteurizada (FP) 3,3 (“talvez comprasse”) e a menor pela natural (FN) 2,5 (“provavelmente não compraria”).

A avaliação sensorial dos fermentados de cana-de-açúcar pode ter sido influenciada por dois fatores, o primeiro por ser uma bebida *demi-sec* ou meio seca e o segundo fator pelo fato dos julgadores não serem consumidores habituais de vinhos. Os dados mostraram que o fermentado de cana (FP) foi aceito, podendo ser uma nova forma de investimento para indústrias e/ou pequenos produtores.

#### 4. CONCLUSÕES

As duas garapas GN e GP apresentaram características físico-químicas distintas (pH, ATT, SST, AR) em função da pasteurização. As diferenças de tratamentos nas garapas interferiram nas características SST e AR dos mostos ao longo do processo de produção dos fermentados. Os fermentados de cana de açúcar FN e FP apresentaram características distintas em função do processo. O processo de pasteurização da garapa reduziu a acidez volátil e fixa, aumentou os sólidos solúveis assim como os açúcares e também as características sensoriais de modo que a avaliação do FP foi superior a do FN na maioria dos atributos avaliados.

#### 5. REFERÊNCIAS

Amaro, A. P., Bonilha, P. R. M., Monteiro, M. Efeito do tratamento térmico nas características físico-químicas e microbiológicas da polpa de maracujá. **Alim. Nutr.**, São Paulo, v. 13, pg. 151-162, 2002.

Brasil. Lei Nº. 10.970 de 12 de Nov. 2004. **Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências.** Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2004-2006/2004/Lei/L10.970.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2004/Lei/L10.970.htm)>. Acessado em 22/09/2009.

Brasil. Decreto Nº. 6871, de 04 de jun. 2009. **Que regulamenta a Lei nº 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.** Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm)> Acesso em 22/9/2009.

Costa, R. M. **Elaboração e controle de qualidade de vinho tinto suave de mesa da região de Santa Felicidade.** Curitiba, 1993. 146 p. Dissertação (mestrado em tecnologia química), Universidade Federal do Paraná.

Hair, J., Anderson, R., Tatham, R. **Análise multivariada dos dados.** Porto Alegre: Bookman. 2005. p 101-102

Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físicos e químicos para análise de alimentos.** São Paulo, SP, 1985. 533 p.

Luzietoso, N. Disponível em: <[www.worldbank.org/afr/ik/pr/ikn24.pdf](http://www.worldbank.org/afr/ik/pr/ikn24.pdf)>. Acesso em 31/06/2008.

Manly, B. J. F. **Métodos estatísticos multivariados: uma introdução.** Porto Alegre: Bookman. p 89-94, 2008

Marafante, L. J. **Tecnologia da fabricação do álcool e do açúcar.** São Paulo: Ícone, 1993, 148p.

Moretto, E.; Alves, R. F.; Campos, C. M. T.; Archer, R. M. B. Prudêncio, A. J. **Vinhos & vinagres: processamento e análises.** Florianópolis: UFSC, 1988, 168 p.

Oliveira, A. C. G., Spoto, M. H. F., Canniatti-Brazaca, S. G., Sousa, C. P., Gallo, C. R. Efeitos do processamento térmico e da radiação gama na conservação de caldo de cana puro e adicionado de suco de frutas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 863-873, out.-dez. 2007

Prati, P., Camargo, G. A. Características do caldo de cana e sua influência na estabilidade da bebida. **BioEng**, Campinas, v. 2, n. 1, p. 037-044, jan/abr., 2008.

Regulamento (CE) nº 1493/1999. **Que estabelece a organização comum do mercado vitícola.** Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31999R1493:PT:HTML>>. Acesso em agosto 2009.

Regulamento (CE) nº 479/2008. **Que estabelece a organização comum do mercado vitícola que altera os Regulamentos (CE) nº. 1493/1999, (CE) nº. 1290/2003 e que revoga os Regulamentos (CE) nº. 2392/86 e (CE) nº. 1493/1999.** Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:125:0052:0053:PT:PDF>>. Acesso em novembro 2009.

Rivera-Espinoza, Y., Valdez-López, E. and Hernández-Sánchez, H. Characterization of a wine-like beverage obtained from sugarcane juice **World Journal of Microbiology & Biotechnology** (2005) v. 21, p. 447–452 DOI 10.1007/s11274-004-1878-0.

Rosier, J. P. **Manual de elaboração de vinho para pequenas cantinas.** Florianópolis: Empresa Catarinense de Pesquisa agropecuária S.A., 1988. 62p.

SISVAR Sistema para Análises Estatísticas, 4.6: DEX - UFLA - Lavras, 2003.

StatSoft, Inc. (2005). STATISTICA (data analysis software system), 7.1. Tulsa, [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).

SPSS Inc. (2008). SPSS Statistics 17.0 Chicago

SLU – MUSEUM OF CULTURE AND ARTS. Disponível em:  
<[http://www.slu.edu.ph/offices/arts\\_music\\_culture/museum/collections.jsp](http://www.slu.edu.ph/offices/arts_music_culture/museum/collections.jsp)>

Acesso em 21/09/2008

Steinkraus, K. H. **Handbook of Indigenous Fermented Foods**. Marcel Decker, New York. 1996

## **CAPÍTULO 2**

**ANÁLISE DE COV POR MEFS-HS E CG-EM EM FERMENTADOS DE  
CANA-DE-AÇÚCAR NATURAL E PASTEURIZADO, ENVELHECIDOS EM GARRAFAS  
E BARRIS DE CARVALHO**

## **ANÁLISE DE COV POR MEFS-HS E GC-EM EM FERMENTADOS DE CANA-DE-AÇÚCAR NATURAL E PASTEURIZADO, ENVELHECIDOS EM GARRAFAS E BARRIS DE CARVALHO**

### **RESUMO**

Foi desenvolvido um método por MEFS-HS e análise por GC-EM para avaliar e identificar os perfis de COV que contribuem para o aroma de fermentados de cana produzidos a partir do mosto de cana natural e pasteurizado e envelhecidos em barris de carvalho e garrafas de vidro. Para avaliar o resultado das análises dos COV foi empregada a Análise de Componentes Principais (ACP). O método desenvolvido por MEFS-HS e GC-EM foi eficiente na extração e identificação de 104 COV comuns aos quatro tipos de fermentados – tais como, pirazinas, aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres, alcanos e ácidos orgânicos. O tipo de preparação e de estocagem dos fermentados promoveu diferenças em suas composições químicas finais e em seus perfis de COV. Quando foi aplicada a ACP foi possível discriminar os quatro tipos de fermentados.

Palavras chave: Vinho-de-cana, MEFS-HS-CG/EM, COV, ACP

## **HS-SPME AND GC-MS ANALYSIS OF VOCs IN SUGAR CANE WINE WITH AND WITHOUT PASTEURIZATION AGED IN BOTTLES AND BARRELS OF OAK**

### **Abstract:**

A Method was developed based on HS-SPME extraction and analysis by GC-MS to assess and identify the profiles of VOCs that contribute to the aroma of wines produced from sugar cane juice pasteurized and unpasteurized and aged in oak barrels or glass bottles. To evaluate the outcome of the analysis of VOCs, Principal Component Analysis was employed. The method developed was able to extract and identify 104 VOCs, such as pyrazines, aldehydes, ketones, alcohols, esters, alkanes and organic acids, which were common to the four types of wine. The modes of preparing and aging wines promoted differences in their chemical composition and in their final VOCs profiles, such that, when PCA was applied to them, it was possible to discriminate the four types of wines.

Keywords: Sugar cane wine, HS-SPME-GC/MS, VOC, PCA

## 1- INTRODUÇÃO

No Brasil o vinho de cana é utilizado para produção de bebida destilada (cachaça). Entretanto, a sua produção e comercialização pode ser uma alternativa viável, de baixo custo e alto valor agregado. Para isso é necessário conhecer suas características químicas, como a presença de compostos voláteis responsáveis pelo aroma. Milhares de compostos voláteis podem ser detectados e diferenciados pelo olfato. Considera-se que o processo de percepção pelo olfato (aroma) é mais sensível do que pelo paladar (sabor) (Mottram, 1993).

O impacto sensorial está relacionado com as interações entre compostos voláteis e entre estes e outros componentes presentes na matriz. Tais interações são responsáveis por características importantes dos compostos, a exemplo o valor do limiar de odor (limiar de detecção ou *threshold*), que pode ser definido como a concentração mínima pela qual um composto pode ser detectado pelo olfato (Belitz & Grosch, 1999). Estas concentrações podem variar de  $\mu\text{g L}^{-1}$  a  $\text{mg L}^{-1}$ , porém não necessariamente por encontrar-se em maior concentração sua incidência será maior. Os COV presentes nas bebidas alcoólicas podem ser oriundos da matéria-prima usada na fabricação e que permanecem inalterados ou formados durante o processo da fermentação e do envelhecimento (Faria, Loyola, López & Dufour, 2003).

O principal produto na fermentação alcoólica é o etanol, os demais compostos são ésteres, álcoois, ácidos graxos, aldeídos e outros, geralmente encontrados em pequenas quantidades, apesar de extremamente potentes quanto a sua contribuição ao aroma e sabor. Álcoois superiores (óleo fusel), ácidos graxos e ésteres formam quantitativamente os maiores grupos presentes nas bebidas alcoólicas, sendo os álcoois superiores os mais abundantes. Álcoois superiores possuem mais de dois átomos de carbono e geralmente constituem 50 % dos componentes aromáticos do vinho. Sendo os hexanóis responsáveis pelos odores herbáceos presentes em certos vinhos. A maioria dos álcoois fúseis é formada como produtos secundários da fermentação (Santos, 2006).

Um método para o isolamento e concentração de voláteis deve ser simples, rápido, eficiente, de baixo custo e com mínima manipulação da amostra sem modificar a composição total do produto estudado (Janzantti, 2004). Diferentes métodos analíticos têm sido desenvolvidos para determinar os componentes que



contribuem para o aroma de alimentos, vinhos e bebidas alcoólicas, tais métodos baseiam-se na análise do *headspace* (espaço de cabeça) ou na análise total.

Para Quinteiro, Nobre, Ferreira, Godoy & Castro (2003) a extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction* - SPE) além de exigir pequena quantidade de solvente, apresenta baixo custo, rapidez e fácil automação, também possibilita concentrar vários analitos de interesse simultaneamente e permite determinações em níveis de detecção da ordem de  $\text{ng L}^{-1}$ , sendo apropriada e eficiente para substituir extrações clássicas, como a extração líquido-líquido (ELL). Uma variante mais recente é a micro-extração em fase sólida- MEFS (*Solid Phase Micro-extraction* - SPME).

A MEFS-HS engloba a maioria dos passos necessários para a preparação de amostras, na análise de compostos voláteis em alimentos, devido à sua simplicidade, sem uso de solventes, pequena manipulação da amostra, alta sensibilidade, rapidez e facilidade de automação (Sousa, Rodrigues, Martins, Oliveira, Pereira & Andrade, 2006). No *headspace*, a fibra é posicionada na fase gasosa em equilíbrio com a amostra, sob temperatura constante para que os COV sejam absorvidos ou adsorvidos e, posteriormente, por exposição da fibra no injetor do cromatógrafo a gás ocorre a dessorção térmica.

O acoplamento da cromatografia gasosa com a espectrometria de massas – CG-EM (Gas Chromatography-Mass Spectrometry GC-MS) é uma poderosa ferramenta na análise qualitativa e auxilia na identificação dos COV eluídos da coluna cromatográfica. Os espectros de massas são usados na identificação de vários compostos orgânicos, onde as relações massa/carga ( $m/z$ ) obtidas podem ser transformadas em informação estrutural (McLafferty, 1994). Bibliotecas eletrônicas modernas auxiliam a identificação de compostos desconhecidos por comparação com espectros padrões (Franco & Janzanti, 2004). Em certos casos o uso do índice de retenção junto com o espectro de massa, pode ajudar na identificação de compostos isolados de misturas complexas.

A identificação de COV que são os principais contribuintes do aroma de certos tipos de alimentos ou bebidas é dificultada, por causa do grande número de compostos detectados nesse tipo de matriz. Nesses casos, a análise de componentes principais (ACP) é uma poderosa ferramenta que pode ser aplicada para identificar similaridades entre amostras complexas nas quais vários componentes são medidos.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método baseado na extração por MEFS-HS e análise por CG-EM, para determinação do perfil de COV que podem contribuir para o aroma de fermentados de cana obtidos do caldo de cana natural e do caldo de cana pasteurizado e dos fermentados envelhecidos em garrafas de vidro e em barris de carvalho. Os perfis determinados foram então tratados por ACP e as amostras foram classificadas de acordo com seus tratamentos prévios e as condições de estocagem.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Reagente e solvente

O cloreto de sódio (99,0 %) foi adquirido da Nuclear (São Paulo, Brasil) e a água destilada e tratada em um purificador NANOPure Diamond system (Dubuque, USA).

### 2.2 – Instrumentação

O sistema usado na extração dos COV foi um autoamostrador (CTC Combi-PAL, Zwinger - Suécia) acoplado ao CG-EM (Shimadzu QP2010 Plus, Kyoto - Japão) com injetor tipo *split/splitless*, operando no modo *splitless* a 250°C. A separação foi realizada em uma coluna de sílica fundida (Restek Rtx®-1 MS Crossbond® 100 % dimetilpolisiloxano; 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm, Bellefonte, PA - USA) utilizando hélio 99,99 % como gás de arraste a uma vazão de 0,56 mL min<sup>-1</sup> com a seguinte programação na coluna: 35 °C por 1 min, aquecida até 100 °C a 4 °C min<sup>-1</sup>, em seguida aquecida até 190 °C a 5 °C min<sup>-1</sup>, permanecendo por 10 min nesta temperatura com um tempo total de 45,25 min. O MS operou no modo Scan na faixa de 30 a 300 m/z, temperatura da fonte de íons 250 °C, linha de transferência a 250 °C e ionização por impacto de elétrons a 70 eV.

Para a SPME foi utilizado o holder para autoamostrador (Supelco, modelo 23GA, Bellefonte, PA, USA) e fibras recobertas com poliacrilato (85 µm), polidimetilsiloxano (100 µm), polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (65 µm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

### 2.3. Amostra

As amostras de fermentado de cana usadas neste estudo foram obtidas do laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) em Cruz das Almas, Bahia (12°48'38"S e 39°6'26"W), na região nordeste do Brasil. Os fermentados foram produzidos a partir de caldo de cana pasteurizado e natural (sem pasteurização). Depois de prontos os dois tipos de fermentados foram envelhecidos em garrafas de vidro e barris de carvalho por um ano, resultando no final quatro tipos de fermentado. Uma quantidade representativa de cada tipo de fermentado (~500 mL) foi coletada ao final do processamento e transferida para frascos de vidro de coloração âmbar e estocadas sob refrigeração a -18 °C até o momento das análises.

#### 2.4. Procedimento de extração

Para a extração foram pesadas 3 g de NaCl em um frasco (*vial*) de 20 mL, seguida da adição de 5 mL de água ultra pura e 5 mL da amostra de fermentado. O frasco foi selado e deixado em repouso por 30 min, em seguida foi incubado a 60 °C por 10 min. A fibra de SPME utilizada (PDMS, 100 µm) foi inicialmente condicionada conforme a recomendação do fabricante. A extração dos COV foi feita através do modo *headspace* (MEFS-HS), a 60 °C durante 30 min, sob agitação a 250 rpm, (intercalando ciclos de 30 sec sob agitação e 10 sec sem agitação). Após a extração, a fibra foi introduzida no injetor do CG para a dessorção por 10 min a 250 °C. Após cada extração, a fibra foi limpa a 280 °C por 1 min em uma atmosfera de hélio. As análises dos COV para cada tipo de fermentado foi realizada em seis repetições.

#### 2.5. Identificação dos COV no fermentado de cana

Em virtude de não ter padrões disponíveis no laboratório, a identificação dos COV foi feita por meio da espectrometria de massas, por comparação do espectro obtido da amostra com aqueles armazenados na biblioteca eletrônica NIST 147 e Wiley 8.0. Adicionalmente, quando possível, a identificação foi confirmada por comparação do índice de retenção linear (IRL) da substância com aqueles relatados em literatura.

#### 2.6. Análise estatística

Para avaliar o resultado das análises dos COV com o objetivo de estabelecer as semelhanças e diferenças entre os quatro tipos de fermentados foi empregada a Análise dos Componentes Principais (APC), utilizando os softwares STATISTICA 7.1<sup>®</sup> (*data analysis software system*) e SPSS Statistics 17.0<sup>®</sup>

As componentes foram extraídas a partir da matriz de correlação, adotando-se o critério Kaiser (Hair et al., 2005); assim, foram mantidas no sistema apenas as componentes relacionadas aos autovalores  $\lambda \geq 1$ . Aliado a isto, considerou-se ainda a percentagem da variância acumulada (que deve ser superior a 70 %) na seleção das componentes.

Os autovalores são as variâncias das componentes principais, enquanto que os autovetores dão os coeficientes das variáveis padronizadas usadas para calcular as componentes principais (Manly, 2008). Utilizou-se a rotação normalizada Varimax (Hair et al., 2005), que maximiza as variâncias dos loadings (cargas fatoriais), promovendo um rearranjo dos autovalores.

### **3. Resultados e discussão**

#### *3.1- Otimização da MEFS-HS*

A otimização das condições experimentais das etapas de extração e dessorção foram feitas em triplicata com amostras de fermentado envelhecido em barril de carvalho. Os seguintes parâmetros foram avaliados: volume da amostra, tipo de fibra MEFS, efeito da adição de sal, tempo de extração, temperatura de extração e tempo de dessorção. Para a seleção da fibra foi utilizado como parâmetro o número de COV extraídos para cada fibra e para os demais parâmetros de otimização foi utilizada a média da soma das áreas de 21 picos dos COV mais abundantes detectados nos cromatogramas.

##### *3.1.1. Volume da amostra*

Inicialmente foi utilizado o volume da amostra de 10 mL. Entretanto, em função da saturação do sinal do detector, devido a presença do etanol em alta concentração no fermentado de cana, 5 mL da amostra foi diluída em 5 mL de água ultra pura (1:1) e a mistura mostrou ser mais apropriada para análise dos COV.

### 3.1.2. Seleção da fibra

Três fases de revestimento das fibras foram testadas, ou seja: uma fase polar (poliacrilato - PA); uma fase não polar (polidimetilsiloxano - PDMS) e uma fase bipolar (polidimetilsiloxano/divinilbenzeno - PDMS/DVB). Antes do uso, cada fibra foi condicionada no injetor do cromatógrafo seguindo as recomendações dos fabricantes. Na avaliação da eficiência de cada fibra, foi observado que a fibra com revestimento apolar (PDMS) foi mais eficiente por extrair 87 COV, enquanto a fibra com fase bipolar (PDMS-DVB) extraiu 32 COV e a fase polar (PA) somente 28. Dessa maneira, a fibra PDMS foi escolhida para o desenvolvimento do método e aplicação. A Figura 1 mostra um típico cromatograma de uma amostra de fermentado após a extração com SPME-HS.

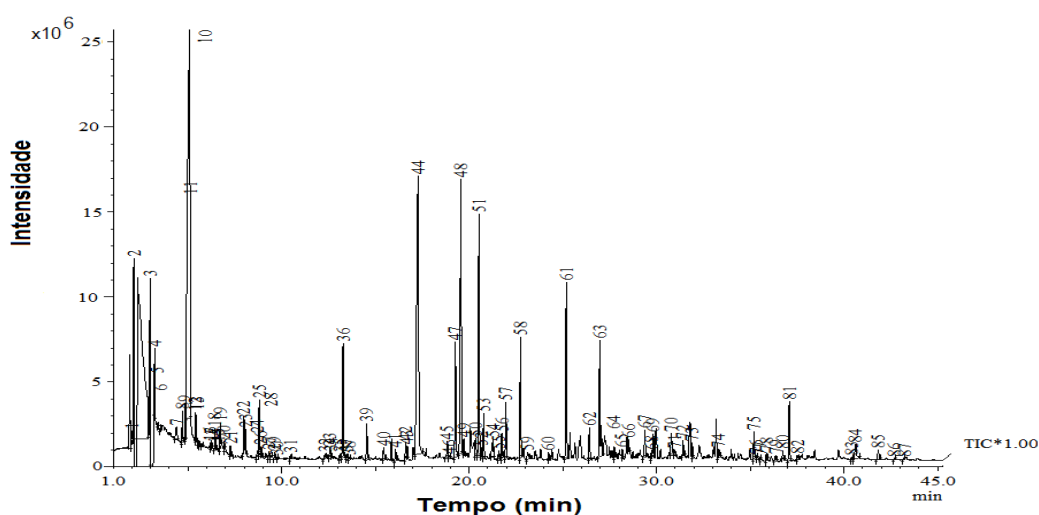


Figura 1 - Cromatograma obtido por MEFS-HS e CG-EM, usando fibra PDMS. 1. Acetaldeído, 2. Etanol, 5. 2-Propanol, 6. Benzeno, 7. Ácido acético, 14. Hexanal, 28. Heptanal, 50. 5,9-Dimetil-2-decanona, 51. 2-Nonenal, 58. 2,3-dimetil-nonano, 62. 2,3-Dietil-5-metil-pirazina, 65. 3,6-dipropil-2,5-dimetil-pirazina, 68. Dietil succinato. Outros compostos correspondentes aos picos numerados podem ser identificados na Tabela 1.

### 3.1.3. Condições de dessorção

Para uma completa dessorção dos analitos no injetor, o tempo e temperatura de dessorção foram otimizados. Esses dois parâmetros junto com a posição da fibra no injetor são os principais responsáveis por render um sinal máximo para cada

analito no detector. Baseado em um trabalho anterior de Wang, Xu, Zhao & Li (2004) a temperatura do injetor foi ajustada a 250 °C durante toda a otimização, enquanto o tempo de dessorção variou de 3, 4, 5 e 10 min. A Figura 2 mostra o efeito do tempo de dessorção na extração dos COV do fermentado de cana.

Dessorção por períodos de tempo longos não são utilizados para prevenir a degradação do revestimento da fibra. O tempo de dessorção de dez minutos foi escolhido e logo após a fibra ter sido limpa a temperatura de 280 °C por 1 min em uma atmosfera de hélio.

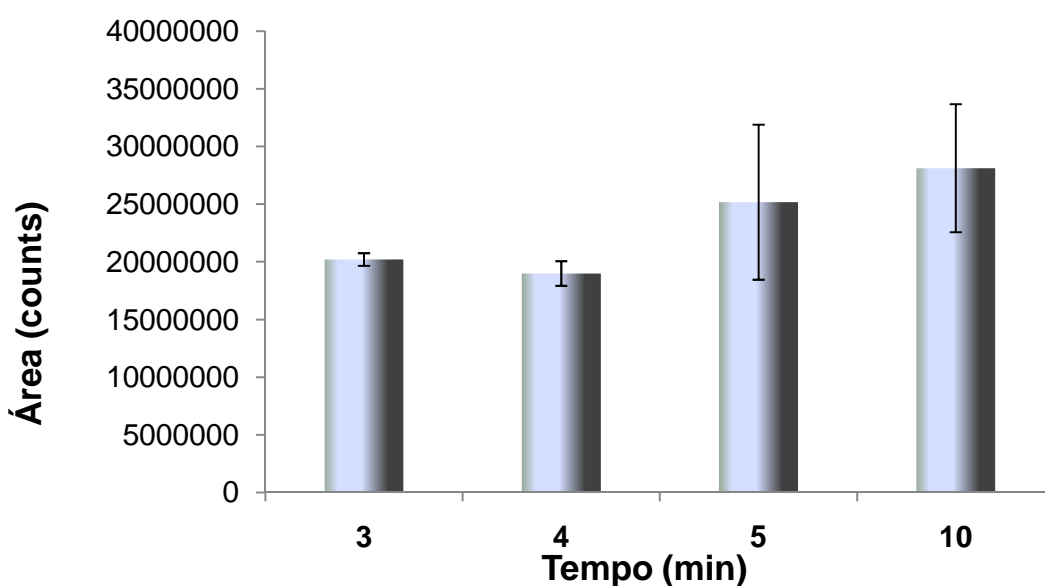


Figura 2. Efeito do tempo de dessorção na eficiência de extração de COV do fermentado de cana por MEFS-HS expresso na média da soma das áreas dos 21 picos mais abundantes dos voláteis detectados.

#### 3.1.4. Força iônica

A influência da força iônica foi avaliada pela adição de diferentes quantidades de NaCl (0 %, 10 %, 20 % e 30 % (m/v)) na solução da amostra. A Figura 3 mostra que o aumento na concentração de NaCl, promoveu também um aumento proporcional na quantidade de COV extraídos. Esses dados são confirmados em literatura que reportam o aumento da eficiência na extração de COV utilizando a fibra PDMS, e aumentando concentrações de NaCl para 30 % (m/v) (Deger,

Gremm, Frimmel & Mendez, 2003, Carrillo, Garrido-López & Tena, 2006, Oliveira, Moura & Coelho, 2007).

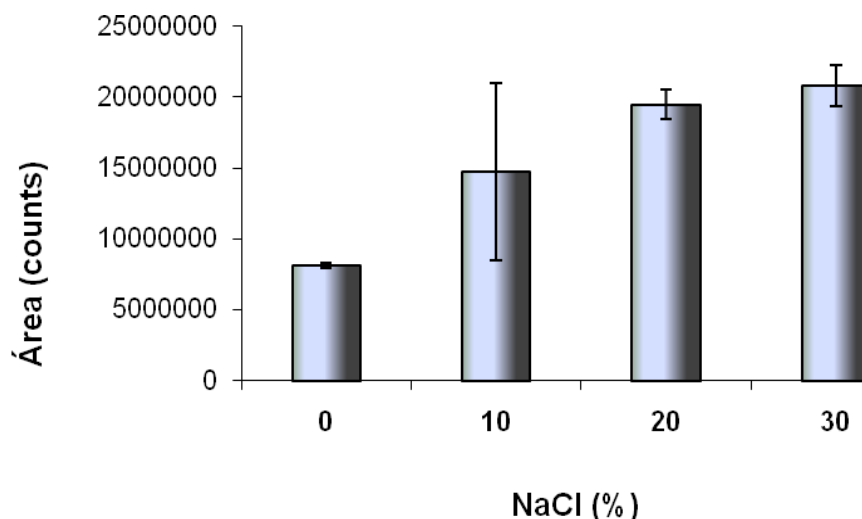


Figure 3. Efeito da adição de NaCl na eficiência de extração de COV do fermentado de cana por MEFS-HS expresso na média da soma das áreas dos 21 picos mais abundantes dos voláteis detectados.

### 3.1.5. Tempo de extração

A técnica de extração por MEFS-HS baseia-se no equilíbrio dos analitos entre a amostra matriz, o *headspace* e o revestimento da fibra, ou seja, uma vez o equilíbrio atingido, a concentração dos analitos pode ser considerada constante nas três fases, e a precisão do método será melhorada. Entretanto, extrações quase chegando ao equilíbrio também podem ser utilizadas para a quantificação dos analitos, a fim de poupar tempo de análise. Tanto a duração do tempo de equilíbrio quanto a duração do tempo do método CG devem ser levados em consideração.

Para os compostos mais voláteis, não há vantagem no aumento do tempo de extração, enquanto que para menos voláteis e/ou compostos mais polares da mistura, aumentando o tempo de extração aumenta a eficiência da extração (WANG *et al.*, 2004). Para avaliar esse parâmetro as extrações foram realizadas em 5, 10, 20, 30 e 45 min. Um aumento na resposta analítica foi observado entre 5 e 30 min, enquanto que entre 30 e 45 min não foi observada diferença significativa (Figura 4).

O tempo de extração de 30 min foi então escolhido para conseguir o máximo de sensibilidade com menor tempo de análise.

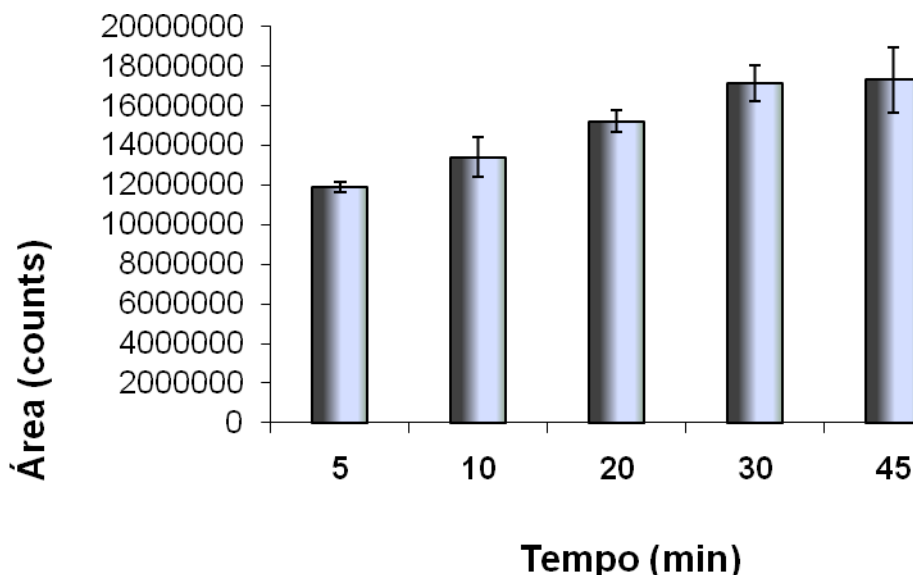


Figure 4. Efeito do tempo de extração na eficiência de extração de COV do fermentado de cana por SPME-HS expresso como média da soma das áreas dos 21 picos mais abundantes dos voláteis detectados.

### 3.1.6. Temperatura de extração

Na técnica SPME-HS, a temperatura de extração influencia no equilíbrio da concentração de COV entre a amostra matriz, o *headspace* e o revestimento da fibra. À medida que a temperatura aumenta, ocorre um aumento na concentração dos analitos na fase de vapor, especialmente os compostos menos voláteis cuja extração é favorecida por altas temperaturas (De Schutter et al., 2008). Entretanto, altas temperaturas podem também reduzir a sorção de analitos na fibra, visto que este é um processo exotérmico.

A influência da temperatura na extração dos COV avaliada a 50, 60 e 70 °C, não apresentou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nas quantidades extraídas nos três valores. Embora a extração feita a 70 °C tenha determinado uma resposta analítica significativamente alta, a precisão foi mais baixa do que a extração a 60 °C, e assim esta última temperatura foi escolhida.



### 3.2. Análise dos COV em fermentado de cana

Para avaliar o perfil de COV no fermentado de cana, as análises foram executadas em 6 amostras de fermentados de cana obtidos da garapa natural e da pasteurizada, ambos envelhecidos em garrafas de vidro e barris de carvalho, assim totalizando 24 amostras. Um total de 104 COV foram identificados como comuns aos quatro tipos de fermentado. Na Tabela 1 estão listados os 104 compostos identificados por comparação dos seus espectros de massas com os dados da biblioteca eletrônica e também por comparação de seus índices de retenção lineares com aqueles disponíveis na literatura.

Suomalainen (1971) relata que em um grupo de mais de 100 componentes voláteis, verificou-se que as mesmas substâncias fazem parte do aroma de cervejas, vinhos e bebidas destiladas. Estes compostos aparecem como principais componentes nas bebidas alcoólicas, independentemente da matéria-prima utilizada, evidenciando a importância das leveduras na formação do sabor da bebida.

Nos fermentados envelhecidos em barris de carvalho foi detectada a presença do octatiocano ( $S_8$ ) e do benzeno. Provavelmente o benzeno está associado à contaminação pela presença de parafina comercial de baixa qualidade utilizada para calafetar os barris. Este procedimento é recomendado por Moretto, Alves, Archer, Campos & Prudêncio (1988). O octatiocano possivelmente pode ter sido produzido por fungos do gênero actinomicete presentes na madeira. Segundo Badoil & Benanou (2009) octatiocano pode ser obtido a partir de caldo de cultura actinomicete, estirpe TO 447 (*Streptomyces albulus*), e este composto é um indicador de atividade microbiológica. Nestes fermentados também foram detectadas as pirazinas [2-(2-metilpropil)-3-(1-metiletil)-pirazina, 2,3-dietil-5-metil-pirazina e 3,6-dipropil-2,5-dimetil-pirazina] e duas cetonas [2-decanona, 5,9-dimetil-2-decanona]. Também foi identificada a cetona  $\beta$ -damascenona, somente no fermentado pasteurizado.

A presença das pirazinas provavelmente deve estar associada a uma contaminação por ação microbiana na madeira do barril, tendo em vista que as pirazinas não foram detectadas nos fermentados envelhecidos em garrafas. Pirazinas são compostos nitrogenados heterocíclicos que contribuem significativamente para o aroma de muitos alimentos. Estão associadas ao

escurecimento não enzimático dos alimentos (reações de aminoácidos com açúcares – reação de Maillard) e sua produção ocorre a partir do aquecimento de aminoácidos ou a partir de microrganismos, como *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum* e outros (LASKIN, 1983).

A  $\beta$ -damascenona pode ser formada pela hidrólise de metabólitos derivados de carotenóides, como a neoxantina. Estudos hidrolíticos com glicosidases mostraram que o triol foi convertido rapidamente em  $\beta$ -damascenona, 3-hidroxi-damascona e megastigma à temperatura ambiente em solução aquosa e pH 3. Dióis como a luteína podem gerar  $\beta$ -damascenona em vinhos durante o envelhecimento (Puglisi, Eley, Prager, Skouroumounis & Sefton, 2001; Enojo, Maróstica Jr. & Pastore, 2007).

Os voláteis 3-metil-butanal e 2-Hidroxi-3-Fenil-Propanoato de etila foram identificados apenas nos fermentados envelhecidos em garrafas, provavelmente nos fermentados envelhecidos em barril houve perdas por oxidação ou volatilização em função da porosidade da madeira.

### 3.3. Análise de componentes principais (ACP)

A análise de componentes principais foi realizada com a média das áreas dos picos de cada um dos 104 COV detectados em todas as amostras de fermentado.

A partir da matriz de correlação entre as áreas dos COV dos dois diferentes tipos de fermentados de cana, e dois tipos de envase calcularam-se as componentes principais, possibilitando identificar compostos que podem melhor caracterizar as amostras analisadas. A distribuição e dispersão das amostras de fermentado relativas às duas primeiras componentes principais (Fator 1 – tipo de estocagem; Fator 2 – tipo de processo) são mostrados na Fig. 5.

Para a ACP dos quatro tipos de fermentado (FNG, FNB, FPG e FPB), seis componentes foram necessárias para explicar 72,36 % da variância total, sendo que a primeira e a segunda componentes são responsáveis por 25,15 e 17,17 % da variação total, respectivamente.

Na Figura 5 observa-se que a ACP foi eficiente na discriminação das amostras, de acordo com o seu processo de preparação e também seu modo de estocagem durante o envelhecimento, mostrando que ambos tem influência no perfil de COV de cada amostra assim como nas características do produto final.

Os compostos com maior contribuição para as diferenças no processo de estocagem, de acordo com a comparação com a biblioteca eletrônica, o espectro de massas e também por comparação de seus índices de retenção linear com os da literatura, foram cymeno, 3-hidroxi etil tridecanoato, 2-octanona, 2-metil-tetraidropirano e 2-metil-1-propanol.

Em relação ao processo de produção, os compostos que tiveram maior contribuição para as diferenças foram 4,5-dimetil-2-ciclohexil-1,3-dioxolano, 3-butil cicloheptanona, etil hexil benzoato, ácido tetradecanóico e eicosano.

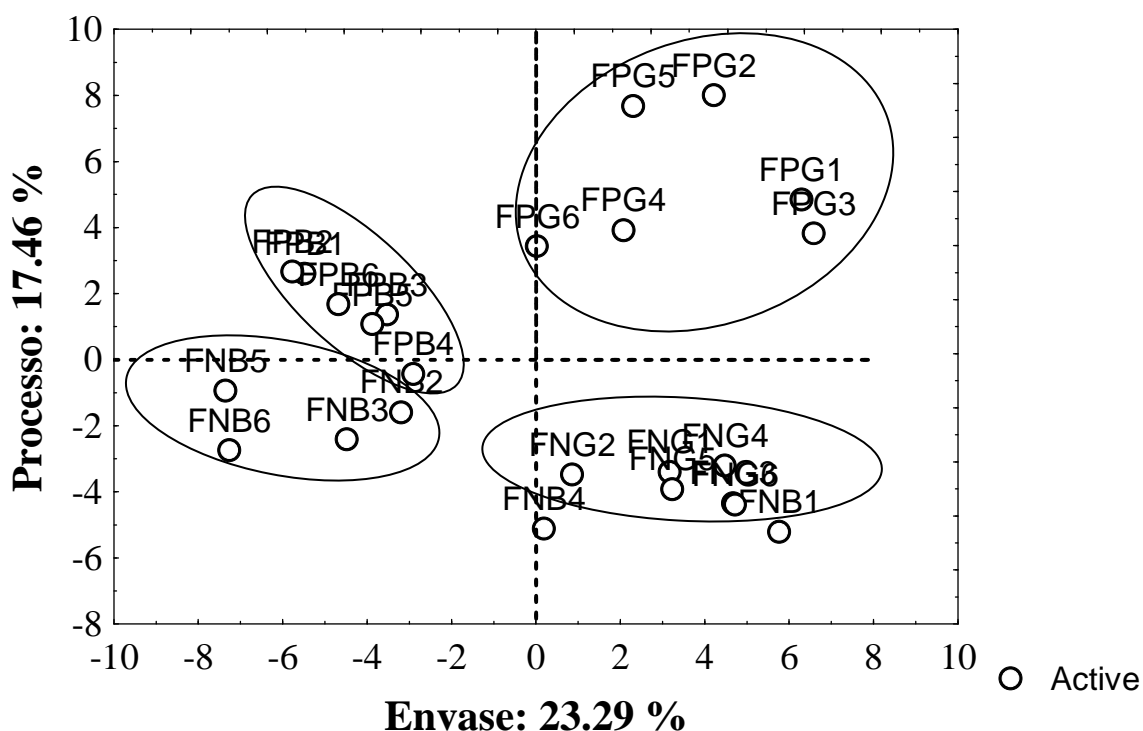


Figure 5 – Gráfico dos escores obtidos da ACP dos fermentados obtidos da garapa natural (não pasteurizada) e da garapa pasteurizada envelhecidos em garrafas de vidro e barris de carvalho. FNG – Fermentado natural envelhecido em garrafa de vidro; FNB - Fermentado natural envelhecido em barril de carvalho; FPG - Fermentado pasteurizado envelhecido em garrafa de vidro; FPB - Fermentado pasteurizado envelhecido em barril de carvalho.

Tabela 1- Compostos orgânicos voláteis de quarto tipos de fermentado de cana-de-açúcar extraídos por MEFS-HS, analisados e identificados por GC-EM.

Nº.	Compostos orgânicos voláteis (COV)*	Fig. 1	MM	T. R.	IRL	IRL**
1	Etil acetato	3	88	2.99	605	640 <sup>(2)</sup>
2	2-Metil 1-propanol (isobutanol)	4	74	3.24	617	670 <sup>(2)</sup>
3	Etil 2-propenoato	6	100	4.09	660	
4	Etil propanoato	7	102	4.37	674	729 <sup>(1)</sup>
5	2,4,5-Trimetil 1,3-dioxolane (metiltiopropanal)	8	116	4.73	693	739 <sup>(1)</sup>
6	1,1-Dietoxi etano	9	118	4.87	700	734 <sup>(2)</sup>
7	Álcool Isoamílico (2-metil-1-butanol)	10	88	5.12	712	759 <sup>(2)</sup>
8	Álcool amílico (3-methyl-1-butanol)	11	88	5.16	715	735 <sup>(3)</sup>
9	2-metil-etil propanoato (etil isobutirato)	12	116	5.45	729	756 <sup>(3)</sup>
10	3-metil-etil propanoato	13	116	5.78	746	
11	Etil 2-oxo-propanoato	15	116	6.31	773	
12	Etil butanoato (etil butirato)	16	116	6.49	781	805 <sup>(4)</sup>
13	2,3-Butanediol	17	90	6.63	788	816 <sup>(2)</sup>
14	Etil 2-hidroxi-propanoato (etil lactato)	18	118	6.88	801	824 <sup>(2)</sup>
15	Pentenil butanoato	19	156	7.31	813	1010 <sup>(1)</sup>
16	4-Metil-1-pentanol	20	102	7.73	826	
17	3-Metil-1-pentanol	21	102	7.98	834	
18	2-metil-etil butanoato	22	130	8.03	835	843 <sup>(1)</sup>
19	3-metil-etil butanoato	23	130	8.11	837	849 <sup>(3)</sup>
20	1-Hexanol	24	102	8.79	858	865 <sup>(2)</sup>
21	Acetato de isoamila	25	130	8.84	859	881 <sup>(1)</sup>
22	2-metil-butil acetato	26	130	8.94	862	883 <sup>(1)</sup>
23	4-Etoxi-pentanona	27	102	9.37	875	898 <sup>(1)</sup>
24	Etil pentaenoato	29	130	9.68	884	905 <sup>(1)</sup>
25	2-Heptanol	30	116	9.81	888	892 <sup>(1)</sup>
26	Etil 2,3-dimetil-butanoato	31	144	10.50	908	896 <sup>(2)</sup>
27	Metoxi-penil oxima	—	151	10.64	912	
28	Benzaldeido	—	106	11.29	929	924 <sup>(4)</sup>
29	1,1-Dietoxi metil 3-butana	32	160	11.94	947	953 <sup>(2)</sup>
30	1-Heptanol	33	116	12.35	958	973 <sup>(2)</sup>
31	2-Heptil-1,3-dioxepano	—	200	12.53	963	
32	1-Etoxi-1-pentoxi ethano	34	160	12.61	965	
33	1-Octen-3-ol	35	128	12.67	967	977 <sup>(4)</sup>
34	2-Octanona	—	128	12.86	972	991 <sup>(1)</sup>
35	2-Metil-5-pentil tetrahidrofurano	36	156	13.13	979	
36	Etil hexanoato	37	144	13.31	984	998 <sup>(2)</sup>
37	2-Metil-tetrahidropirano	38	116	13.50	989	
38	2,5-Dimetil 4-hexenoato	39	142	13.68	994	
39	2-Metil-3-metil butil propanoato	40	158	13.89	999	
40	1-Metil-4-(1-metiletil) benzeno (cimeno)	41	134	14.33	1011	1027 <sup>(1)</sup>
41	2-Etil 1-hexanol	42	130	14.58	1018	1034 <sup>(1)</sup>
42	2,6-Dimetil-4-heptanol	43	144	15.47	1041	
43	2-Octen-1-ol	—	128	16.00	1055	
44	1-Octanol	44	130	16.12	1059	1070 <sup>(1)</sup>
45	1,3-Dimetil-2-vinil-benzeno	45	132	16.68	1073	
46	2-Metoximetil-2,4,5-trimetil 1,3-dioxolano	46	160	16.75	1075	
47	Nonanal	—	142	17.09	1084	1081 <sup>(4)</sup>
48	Fenil-etanol	47	122	17.28	1089	1113 <sup>(3)</sup>
49	4,5-Dimetil-2-ciclohexil-1,3-dioxolano	48	184	17.74	1102	
50	2-Etil-hexanoato	49	144	18.46	1122	1208 <sup>(1)</sup>
51	Etil benzoato	52	150	19.31	1147	1139 <sup>(1)</sup>
52	Butanedioate dietila	53	174	19.61	1156	1192 <sup>(2)</sup>
53	5-Metil-2-(1-metiletil) ciclohexanol	54	156	19.76	1160	
54	Ácido Octanóico	55	144	20.29	1175	1228 <sup>(1)</sup>
55	Octanoato de etila	56	172	20.56	1183	1173 <sup>(4)</sup>
56	Decanal	57	156	20.68	1187	1218 <sup>(2)</sup>

Tab.1. (continuação)

Nº.	Compostos orgânicos voláteis (COV)*	Fig. 1	MM	T. R.	IRL	IRL**
57	3-Metil-3-butil-1 -ciclohexanona	—	184	21.02	1196	
58	Trimetil-tetrahidro-naftaleno (TDN)	59	174	21.20	1202	1364 <sup>(1)</sup>
59	3-Butil cicloheptanona	—	168	21.24	1203	
60	Etil- fenil-acetato	60	164	21.62	1216	1251 <sup>(1)</sup>
61	2-Fenil etil acetato	61	164	22.00	1228	1264 <sup>(1)</sup>
62	Isopentil hexanoato	—	186	22.23	1235	
63	1-Decanol	—	158	22.97	1260	1270 <sup>(2)</sup>
64	Ácido nonanóico	63	158	23.14	1265	1260 <sup>(1)</sup>
65	Nanonoato de etila	—	186	23.63	1281	1296 <sup>(1)</sup>
66	Di-isobutil succinato	64	230	24.27	1302	
67	2-Octil butanoato	—	200	24.47	1309	
68	Ácido decanoico	66	172	25.99	1364	1383 <sup>(1)</sup>
69	Etil decanoato	67	200	26.45	1381	1398 <sup>(1)</sup>
70	Tridecanal	—	198	26.70	1390	
71	2-Tert-butil-5-isopropil-1,3-dioxolan-4-ona	—	186	27.00	1401	1432 <sup>(1)</sup>
72	6,10-Dimetil-5,9-undecadien-2-ona	69	194	27.79	1431	
73	2,6-Ditert-butil-fenil-1,4-quinona	70	220	28.22	1448	
74	1-Dodecanol	71	186	28.54	1461	
75	Etil 9-oxo-nonanoato	—	200	28.79	1471	
76	3,5-di-tert-butil-fenol	72	206	29.39	1494	
77	3-Hidroxi etil tridecanoato	73	258	29.86	1513	
78	Ácido dodecanoico	74	200	30.83	1554	1568 <sup>(2)</sup>
79	1-Tridecanol	75	200	31.03	1562	
80	Etil dodecanoato	76	228	31.45	1580	1591 <sup>(2)</sup>
81	1-[2-(Isobutil-oxi)-1-metiletil-2,2-dimetil propil-]2-propanoato	—	286	31.51	1582	
82	Hexadecano	—	226	31.95	1601	
83	Isopropil dodecanoato	—	242	32.26	1629	1646 <sup>(1)</sup>
84	2,5-Di-tert-amil-p-benzoquinona	—	236	32.86	1682	
85	1-Tetradecanol	77	214	33.36	1726	
86	Etil hexil benzoato	—	234	33.93	1777	
87	Octadecano	—	254	34.19	1800	
88	2,6,10,14-Tetrametil-hexadecano	—	268	34.39	1809	
89	Etil 3-hidroxi-dodecanoato	—	244	34.53	1815	
90	2-(Fenil-metileno) octanal	—	216	34.62	1820	
91	Ácido Tetradecanóico	78	228	35.24	1848	
92	1-Pentadecanol	79	228	35.57	1863	1136 <sup>(1)</sup>
93	Tetradecanoato de etila	80	256	35.90	1877	1797 <sup>(2)</sup>
94	Isopropil miristato	—	270	36.73	1912	
95	5,9,13-trimetil 4,8,12-tetradecatrienal	82	248	36.78	1914	
96	1-Nonadecanol	—	284	38.09	1962	
97	Pentadecanoato de etila	—	270	38.48	1976	
98	Eicosano	83	282	39.13	2000	
99	Methyl hexadecanoato	—	270	39.44	2009	
100	Ácido hexadecanóico	84	256	40.70	2043	1903 <sup>(2)</sup>
101	Etil 9-hexadecenoato	—	282	40.79	2046	
102	Etil hexadecanoato	85	284	41.90	2076	1993 <sup>(2)</sup>
103	Heneicosano	86	296	42.76	2100	
104	Hexadecanoato de metil etila	87	289	43.29	2113	2045 <sup>(2)</sup>

\* COV identificado por espectro de massa usando a biblioteca eletrônica Willey 8.0, NIST147; Fig. 1 - Compostos relacionados aos picos presentes na Fig.1.; MM - Massa Molar; TR – Tempo de Retenção; IRL - Índice de Retenção Linear calculado em relação a n-alcenos (6-22 C) na coluna capilar Rtx-1MS (Crossbond © 100% dimethylpolysiloxano, 30 m x 0.25 mm IDx0.25 m). IRL\*\* - Índice de Retenção Linear encontrado na literatura utilizando coluna DB-5 em vez de DB-1: (1)Setkova et al. (2007), (2) Cardeal & Marriott (2009), (3) Poisson & Schieberle (2008), (4) Nóbrega (2003).

#### 4. Conclusões

O método desenvolvido por MEFS-HS e CG-EM foi eficiente na extração e identificação de 104 COV – tais como, pirazinas, aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres, alcanos e ácidos orgânicos - em amostras de fermentado de cana-de-açúcar obtidos do caldo de cana natural e pasteurizado, envelhecidos em barril de carvalho e garrafas de vidro. Os tipos de preparação e de estocagem promoveram diferenças em suas composições químicas finais e em seus perfis de COV, sendo demonstradas por meio da ACP que permitiu discriminar os quatro tipos de fermentado.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, a FAPESB, PRONEX, FINEP e CAPES.

#### 5. Referências

- Badoil, L., Benanou, D. (2009) Characterization of volatile and semivolatile compounds in waste landfill leachates using stir bar sorptive extraction-GC/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393, 1043-1054.
- Belitz, H-D, Grosch, W. (1999) Aroma substances. In: *Food chemistry*. (pp. 319-377) Berlin; Springer-Verlag.
- Cardeal, Z. L., Marriott, P. J. (2009) Comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry analysis and comparison of volatile organic compounds in Brazilian cachaça and selected spirits. *Food Chemistry*, 112, 747–755.
- Carrillo, D. J., Garrido-López, A., Tena, M. T. (2006) Determination of volatile oak compounds in wine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal Chromatography A*, 1102, 25-36.
- Deger, A. B., Gremm, T. J., Frimmel, F. H. Mendez, L. (2003) Optimization and application of SPME for the gas chromatographic determination of endosulfan and its

major metabolites in the ng L<sup>-1</sup> range in aqueous solutions. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 376, 61-68. doi: 10.1007/s00216-003-1855-8.

De Schutter, D. P., Saison, D., Delvaux, F., Derdelinckx, G., Rockb, Jean-Marie, Neven, H., Delvaux, F. R. (2008) Optimization of wort volatile analysis by headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. *Journal Chromatography A*, 1179, 75 –80.

Enajo, M., Maróstica Jr., M. R., Pastore, G. M. (2007) Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. *Química Nova*, 30, 616-622.

Faria, J. B., Loyola, E., López, M. G., Dufor, J. P. (2003) Cachaça, Pisco and Tequila. In *Fermented Beverage Production* (pp 335-363). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Franco, M. R. B., Janzantti, N. S. (2004) Avanços na metodologia instrumental da pesquisa do sabor. In *Aroma e Sabor de Alimentos: Temas Atuais* (PP 17-27). São Paulo: Editora Varela.

Hair, J., Anderson, R., Tatham, R. (2005) Análise multivariada dos dados.(pp 101-102). Porto Alegre: Bookman.

Janzantti, N. S. (2004) Compostos voláteis e qualidade de sabor da cachaça. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas.

Laskin, Allen I. (1983) *Advances in applied microbiology* (pp 31-34). New York: Academic Press.

Manly, B. J. F. (2008) Métodos estatísticos multivariados: uma introdução (pp 89 - 94). Porto Alegre: Bookman.

Mclafferty, F. W. (1994) *Interpretation of Mass Spectra* (pp 106 -114). Mill Valley, California: N. Turno.

Mottram, D. S. (1993) Aroma. In *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition* (pp 4065-4071). London: Academic Press.

Moretto, E., Alves, R. F., Archer, P. M. B., Campos, C. M. T., Prudêncio, A. J. (1998) *Vinhos & vinagres (processamento e análises)* (pp 20 - 120). Florianópolis: Editora da UFSC.

Nóbrega, I. C. C. (2003) Compostos voláteis da aguardente de cana por concentração dinâmica do “headspace” e cromatografia gasosa-espectrometria de massas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23, 210-216.

Oliveira, E. R. M., Moura, B. dos S., Coelho, G. L. V. (2007) Análise de *flavor* do suco de laranja por microextração em fase sólida (SPME). *Revista Analytica*, 28, 42-51.

Poisson, L., & Schieberle P. (2008) Characterization of the Most Odor-Active Compounds in an American Bourbon Whisky by Application of the Aroma Extract Dilution Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5813–5819.

Puglisi, C. J., Elsey, G. M., Prager, R. H., Skouroumounis, G. K., Sefton, M. A. (2001) Identification of a precursor to naturally occurring b-damascenone. *Tetrahedron Letter*, 42, 6937-6939.

Quinteiro, L. M. C., Nobre, A. L. R., Ferreira, A. B. B., Godoy, R. L. O., Castro, I. M. (2003) Microextração em fase sólida: fundamentos e aplicações em análise de alimentos. *B. CEPPA*, 21, 1-30.

Santos, B. A. C. (2006) Compostos Voláteis e Qualidade dos Vinhos Secos Jovens Varietal Cabernet Sauvignon Produzidos em Diferentes Regiões do Brasil. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas.

Setkova, L., Risticvic, S. & Pawliszyn, J. (2007) Rapid headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic–time-of-flight mass spectrometric method for qualitative profiling of ice wine volatile fraction II: Classification of Canadian and Czech ice wines using statistical evaluation of the data. *Journal of Chromatography A*, 1147, 224–240.

Suomalainen, H. (1971) Yeast and its effect on the flavour of alcoholic beverages. *Journal of the Institute of Brewing*, 77, 164-177.

Sousa, E. T., Rodrigues, F. M., Martinsa, C. C., Oliveira, F. S., Pereira, P. A. de, Andrade, J. B. (2006) Multivariate optimization and HS-SPME/GC-MS analysis of VOCs in red, yellow and purple varieties of *Capsicum chinense* sp. peppers. *Microchemical Journal*, 82, 142-149.



Wang, L., Xu, Y., Zhao, G., Li, J. (2004) Rapid Analysis of Flavor Volatiles in Apple Wine Using Headspace Solid-Phase Microextraction. *Journal of the Institute of Brewing*. 110, 57–65.

## **CAPÍTULO 3**

**EVOLUÇÃO DE COV AO LONGO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO E  
ENVELHECIMENTO DE FERMENTADO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

## **EVOLUÇÃO DE COV AO LONGO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO E ENVELHECIMENTO DO FERMENTADO DE CANA-DE AÇÚCAR**

### **Resumo**

Foram investigados os compostos orgânicos voláteis (COV) do caldo de cana natural e pasteurizado e a evolução deles ao longo do processo de produção e envelhecimento do fermentado de cana em garrafas de vidro. As análises foram feitas por microextração em fase sólida em headspace (MEFS-HS) e cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-EM) utilizando a fibra PDMS. No perfil volátil foram discriminados e identificados 42 COV na Garapa Natural (GN) e 66 na Garapa Pasteurizada (GP), sendo 30 comuns aos dois tipos de garapa. Destes, 18 são comuns aos dois e permaneceram na composição do mosto e dos fermentados produzidos a partir deles. Foram identificados setenta compostos comuns aos dois tipos de fermentados que estavam presentes em todas as etapas da fermentação, da primeira trasfega até o fermentado envelhecido. A ACP evidenciou a evolução do perfil dos voláteis ao longo do processo de produção, caracterizando o aumento da concentração da maioria dos COV.

Palavras-chave: vinho de cana, MEFS-HS, CG-EM, voláteis, envelhecimento de vinho.

## **VOC EVOLUTION ALONG PROCESS OF PRODUCTION AND SUGAR CANE WINE AGING**

### **ABSTRACT**

The volatiles organics compounds (VOC) were investigated from natural sugarcane juice and pasteurized and their evolution along the production process of sugar cane wine and aging in glass bottles. The analysis was made by HS-SPME and GC-MS using the PDMS fiber. In the volatile profile were discriminated and identified 42 VOC in Natural Garapa (GN) and 66 in Pasteurized Garapa (GP), 30 common to both types of sugar cane juice and 18 common to the two remained in the must composition and wines produced from them. Were identified seventy organics compounds commons to the two types of wines and present in all stages fermentation, of first transfer to the aged wine. PCA showed the evolution of the volatile profile along the production process, characterizing the growth of the concentration of most VOC.

Keywords: sugar cane wine, HS-SPME, GC-MS, volatiles, aging wine.

## 1. Introdução

O maior desafio para o desenvolvimento da tecnologia adequada de produção de uma bebida é a definição da composição química do produto final, pois o conhecimento das substâncias responsáveis pelo *flavor* e por outras características da bebida permite à indústria ter o controle da sua qualidade e do tempo de produção.

A fermentação alcoólica, conhecida como fermentação primária, é a principal etapa do processo de produção do fermentado de cana. Nesta etapa as leveduras convertem os açúcares e outros compostos presentes no mosto em etanol, CO<sub>2</sub> e outros produtos que são responsáveis pela qualidade e/ou defeito da bebida. A reação tem como subprodutos aldeídos, ácidos, glicerol, álcoois superiores (ou óleos fúseis), que contribuem para o sabor e aroma do vinho. Nessa fase são formados também ésteres, principais responsáveis pelo buquê, que conferem nota frutal ao vinho (Rosier, 1988).

Alguns compostos orgânicos são oriundos da matéria-prima sem nenhuma modificação, outros podem ser produzidos durante o processo de extração do caldo na moenda, em reações enzimáticas de hidrólise, oxidações, complexações. Podem também ser produzidos no processamento por aquecimento. A grande maioria dos compostos é formada e/ou consumida pela atividade das leveduras inoculadas e de microrganismos contaminantes durante a fermentação. Outros são formados ou modificados ao longo do processo de decantação, estabilização e envelhecimento do vinho quando ocorrem principalmente reações de redução.

Quando se trata de vinho de uva Noble et al.(1984) e Ferreira, López & Cacho (2000) asseguram que o sabor do vinho pode ter diferentes origens: aromas primários ou varietal que são provenientes dos compostos presentes na uva; pré-fermentativos que são formados durante a elaboração do mosto; secundários ou fermentativos que são formados durante as fermentações alcoólica e maloláctica e terciários ou pós-fermentativos que são formados durante o processo de envelhecimento do vinho. Este último se desenvolve mediante reações químicas e/ou bioquímicas a partir dos aromas de etapas anteriores.

O aroma do fermentado de cana é mais complexo do que o aroma do caldo e do mosto, em decorrência das transformações que ocorrem durante o metabolismo

das leveduras, que são responsáveis pela maioria dos compostos orgânicos voláteis (COV) presentes nas bebidas fermentadas. Sabe-se que os COV dos vinhos resultam de ácidos graxos, aminoácidos, ácidos cinâmicos e metabolismos de terpenóides (Ribéreau-Gayon et al., 2002).

Terminada as etapas da fermentação, o vinho se apresenta turvo, necessitando de um repouso para decantar toda a impureza que se encontra em suspensão grosseira. Após a decantação, o vinho deve ser separado da borra formada por meio das trasfegas (Moretto et al., 1988).

O aroma característico do vinho parece dever-se às diferentes proporções que certos compostos podem apresentar dentro do aroma total. Muito dinâmico, o aroma do vinho pode mudar com o tempo, ou seja, depende da idade do vinho e também da safra (Ferreira, López e & Cacho, 2000).

Segundo Lima et al. (1975), durante a maturação do vinho ocorrem fenômenos biológicos como fermentação dos açúcares residuais e fermentação malolática. Fenômenos físicos como eliminação do CO<sub>2</sub> provindo da fermentação, precipitação dos tartaratos, precipitações coloidais (mucilagem de natureza glicídica, substâncias nitrogenadas simples e em combinação com fosfato e substâncias corantes insolubilizadas) e modificação da cor. Ocorrem também fenômenos químicos como autólise de leveduras, oxidações dos álcoois, aldeídos e outras substâncias presentes, assim como formação de ésteres voláteis, resultantes das combinações de ácidos com álcoois, responsáveis pelas qualidades específicas dos vinhos. E prossegue até que o oxigênio se reduza a quantidades insignificantes, sendo prejudicado pelo excesso de CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e outras causas (Lima et al., 1975). O envelhecimento é caracterizado pelo processo de redução, durante essa evolução o vinho torna-se mais agradável de beber, caracterizando-se pela sua longevidade (Moretto et al., 1988).

Rosier (1988) relata que é dentro da garrafa, ao abrigo do ar, que o vinho vai afinar, amaciar, e o seu aroma se transformará em Buquê que evoluirá, devido principalmente as reações de esterificação. Durante o envelhecimento, ocorrem reações que originam aromas mais complexos e agradáveis. O vinho na garrafa está em total ausência de oxigênio (no engarrafamento é retirado todo o ar) e, portanto, as reações benéficas, ocorrem na ausência de ar e são denominadas reações de redução (Moretto et al., 1988).

Na literatura pesquisada só foi encontrada uma citação referente ao estudo dos voláteis no caldo de cana (Tokitomo et al. 1984) e nenhuma no fermentado de cana, sendo a informação importante para elucidar a origem e formação desses compostos, assim como, para uma futura padronização do produto.

O objetivo deste trabalho foi determinar os compostos voláteis do caldo de cana natural e pasteurizado e a evolução dos COV ao longo do processo de produção e envelhecimento do fermentado de cana-de-açúcar.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Reagente e solvente*

O cloreto de sódio (99.0 %) foi adquirido da Nuclear (São Paulo, Brasil) e a água destilada e tratada em um purificador NANOPure Diamond system (Dubuque, USA).

### *2.2. Produção do fermentado de cana e amostragem*

Foi utilizada cana de açúcar da espécie *Sacharum sp.* colhida no dia do processamento, no campus UFRB Cruz das Almas, Bahia (12°48'38"S e 39°6'26"W), na região nordeste do Brasil.

No laboratório de Tecnologia de Alimentos a cana foi selecionada, higienizada, raspada e o seu caldo (garapa) foi extraído por meio de moenda (120 L). Foram realizados dois tratamentos, metade da garapa (60 L) foi pasteurizada e a outra metade não. A pasteurização da garapa de cana foi realizada em banho-maria, com aquecimento feito em batelada e progressivo em sistema aberto, quando alcançou a temperatura de 80 °C, permaneceu nesta por 3 min e em seguida foi resfriada em banho de água gelada a 5 °C. A temperatura e tempo de pasteurização foram determinados em ensaio anterior (dados não apresentados).

Na produção do fermentado de cana, após adição do metabissulfito de potássio ( $K_2S_2O_5$ ), 0,1 g L<sup>-1</sup> nos mostos, conforme Moretto *et al.* (1988), foi feita correção da acidez com ácido cítrico, reduzindo o pH de 5,5 para 3,5, com a finalidade de reduzir a carga microbiológica natural e proporcionar melhores

condições para a fermentação. Em seguida foram acrescentados 5 % de *Saccharomyces cerevisiae*, na forma de pé de cuba previamente preparado com a garapa enriquecida com fosfato de amônio e levedura liofilizada comercial de panificação (5 g L<sup>-1</sup>). Os mostos foram acondicionados em seis vasilhames plásticos com capacidade para 15 L (adaptados para fermentação, fechados, com sistema de escapamento de gases, com batoque hidráulico e sistema de esvaziamento adequado para separação da borra no momento das trasfegas).

A fermentação alcoólica foi realizada na temperatura ambiente (28 °C), durou 9 dias e aos 20 dias foi feita a primeira trasfega. Aos 45 dias após o início da fermentação foi feita a segunda trasfega e a chaptalização ou seja, a correção dos SST para 15 ° Brix com melado comercial (adquirido no comércio local) e sacarose. Para o Mosto Natural foram adicionados 600 g de melado e 90 g de sacarose e para o Mosto Pasteurizado foram adicionados 600 g e 70 g, respectivamente. Em seguida realizou-se nova correção da acidez com ácido cítrico 3,33 g L<sup>-1</sup>. A chaptalização e a correção da acidez foram realizadas para melhorar as características sensoriais dos fermentados.

Após a última trasfega, aos 60 dias, o fermentado de cana foi acondicionado em garrafas de vidro com rolhas de cortiça para envelhecer por um ano. As amostras foram colhidas ao longo do processo de produção do fermentado em triplicatas e estocadas em frascos de vidro âmbar de 500 mL e estocadas a -18 °C até o momento das análises.

### 2.3. – Instrumentação

O sistema usado na extração dos COV foi um autoamostrador (CTC Combi-PAL, Zwinger - Suécia) acoplado ao CG-EM (Shimadzu QP2010 Plus, Kyoto - Japão) com injetor tipo split/splitless, operando no modo splitless a 250 °C. A separação foi realizada em uma coluna de sílica fundida (Restek Rtx®-1 MS Crossbond® 100 % dimetilpolisiloxano; 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm, Bellefonte, PA - USA) utilizando hélio 99,99 % como gás de arraste a uma vazão de 0,56 mL min<sup>-1</sup> com a seguinte programação na coluna: 35 °C por 1 min, aquecida até 100 °C a 4 °C min<sup>-1</sup>, em seguida aquecida até 190 °C a 5 °C min<sup>-1</sup>, permanecendo por 10 min nesta temperatura com um tempo total de 45,25 min. O MS operou no modo



Scan na faixa de 30 a 300 m/z, temperatura da fonte de íons 250 °C, linha de transferência a 250 °C e ionização por impacto de elétrons a 70 eV.

Para a MEFS foi utilizado o holder para autoamostrador (Supelco, modelo 23GA, Bellefonte, PA, USA) e fibras recobertas com poliacrilato (85 µm) e poldimetilsiloxano (100 µm), (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

#### *2.4. Procedimento de extração*

Para a extração foram pesadas 3 g de NaCl em um frasco (vial) de 20 mL, seguida da adição de 5 mL de água ultra pura e 5 mL da amostra de fermentado. O frasco foi selado e deixado em repouso por 30 min e, em seguida, foi incubado a 60 °C por 10 min. A fibra de MEFS utilizada (PDMS, 100 µm) foi inicialmente condicionada conforme a recomendação do fabricante. A extração dos COV foi feita através do modo headspace (MEFS-HS), a 60 °C durante 30 min, sob agitação a 250 rpm, (intercalando ciclos de 30 seg sob agitação e 10 seg sem agitação). Após a extração, a fibra foi introduzida no injetor do CG para a dessorção por 10 min a 250 °C. Após cada extração, a fibra foi limpa a 280 °C por 1 min em uma atmosfera de hélio. As análises dos COV para cada tipo de fermentado foi realizada em seis repetições.

#### *2.5 – Identificação dos COV*

Em virtude de não existirem padrões disponíveis no laboratório, a identificação dos COV foi feita por meio da espectrometria de massa, por comparação do espectro obtido da amostra com aqueles armazenados na biblioteca eletrônica NIST 147 e Wiley 8.0. Adicionalmente, quando possível, a identificação foi confirmada por comparação do índice de retenção linear (IRL) da substância com aqueles relatados em literatura.

#### *2.6. Análise estatística*

Para avaliar o resultado das análises dos COV e estabelecer as semelhanças e diferenças entre as diferentes garapas, mostos e tipos de fermentados foi empregada a

Análise dos Componentes Principais (APC), utilizando os softwares STATISTICA 7.1<sup>®</sup> (*data analysis software system*) e SPSS Statistics 17.0<sup>®</sup>

As componentes foram extraídas a partir da matriz de correlação, adotando-se o critério Kaiser (Hair et al., 2005). Assim, foram mantidas no sistema apenas as componentes relacionadas aos autovalores  $\lambda \geq 1$ . Considerou-se ainda a percentagem da variância acumulada (que deve ser superior a 70 %) na seleção das componentes.

Os autovalores são as variâncias das componentes principais, enquanto que os autovetores dão os coeficientes das variáveis padronizadas usadas para calcular as componentes principais (Manly, 2008). Utilizou-se a rotação normalizada Varimax (Hair et al., 2005), que maximiza as variâncias dos loadings (cargas fatoriais), promovendo um rearranjo dos autovalores.

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1- Análise de compostos orgânicos voláteis na garapa

Os resultados da análise dos Compostos Orgânicos Voláteis (COV) da garapa natural (GN) e da garapa pasteurizada (GP), por MEFS-HS e CG/EM, podem ser observados nos cromatogramas apresentados na Figura 1A e B e na Tabela 1.

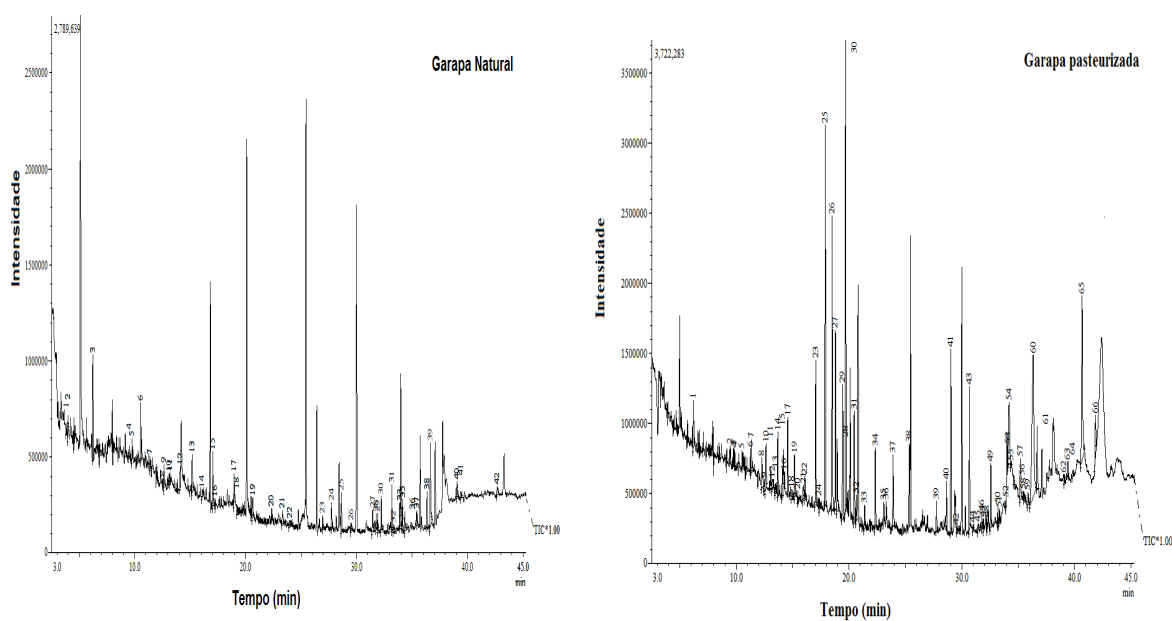


Figura 1 Cromatograma da garapa natural (GN) e da Garapa Pasteurizada (GP) usando MEFS-HS e CG-EM.

No perfil volátil foram discriminados e identificados por MEFS-HS e CG-EM 42 COV na GN (sem pasteurizar) e 66 na GP, dos quais 30 são comuns aos dois tipos de amostras, 10 foram encontrados apenas na GN, assim como, 37 compostos só foram encontrados na GP.

As amostras de caldo de cana pasteurizado apresentaram maior área de picos (o que corresponde a maior concentração dos COV), para a maioria dos COV comuns aos dois tipos de garapa, indicando que o processo promoveu aumentos de concentração para 17 voláteis, com exceção de 12 compostos que apresentaram diminuição na área dos picos. Entretanto, ficou evidenciado que o processamento pelo calor promoveu aumento do número de voláteis e esses novos COV com concentrações elevadas.

O aumento da concentração dos COV está em desacordo com os resultados obtidos por Janzantti, Franco & Wosiacki (2003) que avaliaram o processamento de suco de maçã 'fuji' em garrafas fechada e relataram que a pasteurização (80 °C por 20 min e resfriamento a temperatura ambiente) foi a etapa crítica, onde ocorreu a redução das áreas dos picos de todos os componentes voláteis e perda total do éster octanoato de isoamila e de mais 15 compostos não identificados.

Neste trabalho o processo de pasteurização promoveu a produção de 37 compostos, e perda de 10.

O tipo e a forma de pasteurização da garapa, pode ter promovido a aceleração inicial da atividade enzimática e a promoção de diversas reações, entre elas as de complexação, de oxidação e hidrólise com conseqüente aumento das concentrações da maioria dos voláteis e formação de outros.

Grande parte dos compostos orgânicos voláteis são termolábeis podendo ocorrer a decomposição térmica em temperaturas acima de 60 °C por período de tempo prolongado.

Na Tabela 1 estão relacionados os compostos voláteis identificados nas duas garapas com os respectivos tempos de retenção e índices de retenção linear (IRL).

Tokitomo, Kobayashi & yamanishi (1984), analisaram garapa natural (não pasteurizada) por meio de CG-EM, utilizando coluna de vidro empacotada (10 % SP2100 em 100/120 Chromosorb AW-DMCS; 3 m x 4mm i.d.) e identificaram os COV: ácido hexanóico e 2-metoxifenol; álcool benzílico; 2-feniletanol; ácido heptanóico; fenol; 4-nonanolide; 3-fenil-1-propanol; ácido nonanóico; 4-hidroxi-3-

methoxiestirene; 3-fenil-2-propenol; 4-vinilfenol; 4-hidroxi-2-metoxi-benzaldeído. Destes compostos apenas o ácido nonanóico foi identificado no caldo de cana pasteurizado, neste trabalho.

Do total de compostos encontrados nos dois caldos de cana 15 foram aldeídos, destes o 2,4-decadienal (E,E) apenas na GN e benzaldeído, 2-undecenal, 2-fenil-metileno-octanal e cis-9-hexadecenal encontrados na GP; 15 alcoóis, sendo 11 na GP, 1 na GN (1-hepten-4-ol) e 3 comuns as duas garapas, 1-octen-3-ol, 1-octanol e 1-tetradecanol; 9 ésteres, sendo 6 comuns aos dois tipo de garapa e 3 encontrados apenas no GP, o acetato de etil hexila, o tetradecanoato de etila e hexadecanoato de etila; 9 alcanos sendo 3 comuns as duas garapas, 6 diferentes no GN e 1 na GP o 1,2,3-trimetil ciclopentano; 7 ácidos orgânicos apenas no GP; 6 cetonas, sendo 3 comuns as duas garapas, 5-metil-2-(1-metiletil) Ciclohexanona na GP e na GN 1-octen-3-ona e 4-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-3-buten-2-ona; 3 furanos, dois no GP o 2-pentil-furano e o 3,6-dimetil-2,3,3a,4,5,7a-hexahidro-1-benzenofuran e na GN o 2-metil-5-pentil-tetrahydrofuran. Foram identificados também metoxi-fenil-oxima, e os terpenos  $\alpha$ -felandreno nas duas garapas e  $\beta$ -felandreno na GP.

### 3.2 ACP das garapas

Para a realização da ACP foi feita a seleção dos COV utilizando os dados comuns as duas garapas. A partir da matriz de correlação entre as áreas dos COV dos dois diferentes tipos de garapa (natural e pasteurizada), calcularam-se as componentes principais, possibilitando integrar as múltiplas informações extraídas e identificar quais os compostos melhor caracterizam as garapas estudadas. A representação da distribuição dos casos de dispersão das garapas e dos COV das duas primeiras componentes principais podem ser observadas na Figura 2A e B.

Na ACP da garapa natural (GN) e pasteurizada (GP) a primeira das duas componentes foi suficiente para explicar 73,65 % do total da variância, e as duas componentes 87.05 %.

A análise das amostras GP significativas mostrou uma tendência a se agruparem assim como as amostra GN, como pode ser observado na Figura 2A, em relação ao Fator 1, rotulado como processo, quatorze coeficientes fatoriais foram

positivos, o que pode ser traduzido como maiores concentrações, expressas em áreas dos picos de 14 COV nas amostras GP em relação as GN.

Ocorreram apenas cinco coeficientes fatoriais negativos, do metoxi-fenil-oxima (-0,986), dimetil-nonano (-0,948), dodecanoato de isopropila (-0,958), 1,1-oxibis-octano e benzoato de etil hexila (-0,900), que apresentam uma situação inversa, ou seja, estes compostos apresentam áreas de picos maiores, que se traduzem em maiores concentrações nas amostras GN. Os gráficos de scores, conseguiram discriminar uma formação muito nítida de agrupamentos de amostras, para o Fator 1 dois grupos correlacionados aos tipos de processo, Natural e Pasteurizado.

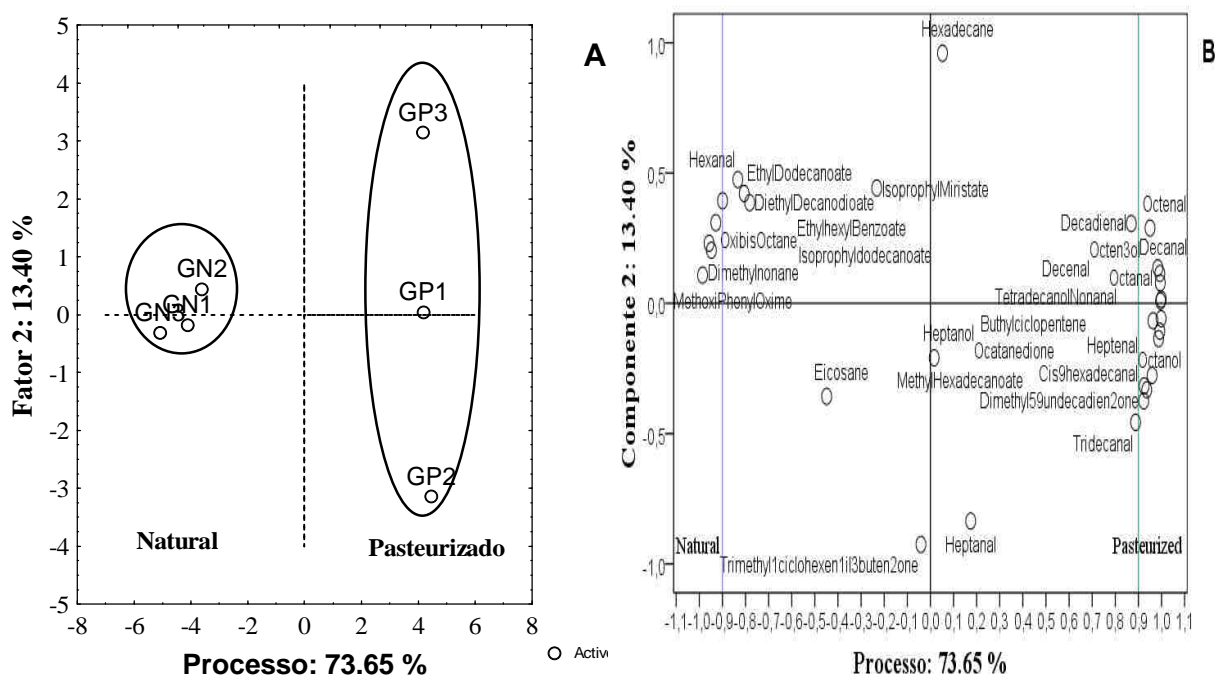


Figura 2 A. ACP dos COV da garapa natural (GN) e da garapa pasteurizada (GP). B. escores significativos da APC baseada nas áreas dos picos cromatográficos dos COV das garapas em relação aos fatores 1 e 2.

Dos 30 COV comuns encontrados nos dois tipos de garapa apenas 18 permaneceram na composição do mosto e dos fermentados produzidos a partir deles: o hexanal, 2-heptanol, metoxi-fenil-oxima, 1-octanol, nonanal, 2-nonenal, decanal, 2-decanal, 6,10-dimetil-5,9-undecadieno-2-ona, dodecanoato de etila,

hexadecano, isopropil dodecanoato, 1-tetradecanol, benzoato de etil hexila, dodecanoato de dietila, miristato de isopropila, eicosano e hexadecanoato de metila. Os encontrados apenas na garapa natural foram quatro: 2-metil-5-pentil tetrahydrofurano, 2-metil-tetrahidropirano, octadecano e nonadecano. Estes correspondem aos aromas considerados primários, originados da matéria prima e/ou extração por moagem da cana.

Os COV identificados apenas na GP que permaneceram nos fermentados foram oito: benzaldeído, 1-metil-4(1-metiletil) benzeno, 2-octen-1-ol, 1-nonanol, ácido nonanóico, ácido tetradecanóico, tetradecanoato de etila e hexadecanoato de etila. Esses aromas podem ser considerados primários, formados durante o processamento (pasteurização).

### *3.3 Análise dos compostos voláteis no mosto e fermentados obtidos da garapa natural e pasteurizada.*

Foram identificados setenta compostos comuns aos quatro tipos de fermentados e presentes em todas as etapas da fermentação, da primeira trasfega até o fermentado envelhecido.

### *3.4 ACP dos mostos e fermentados de cana obtidos da fermentação da garapa natural e da pasteurizada.*

A ACP que representa a distribuição dos casos de dispersão das trasfegas dos mostos e fermentados obtidos da garapa natural e da garapa pasteurizada, das duas primeiras componentes principais pode ser observada na Figura 3. Nesta, as trasfegas são apresentadas como T1N, T2N, T3N, T1P, T2P, T3P e os fermentados como FNG, FPG (fermentado de cana envelhecido em garrafa). A letra N e P correspondem aos mostos e fermentados originados da garapa natural e pasteurizada, respectivamente.

Para a análise das componentes principais dos mostos e fermentados obtidos dos dois processos, 3 componentes são suficientes para explicar 74,69 % do total da variância, a primeira e a segunda componente representaram 32,63 e 29,29 % do total da variação, respectivamente.

Tabela 1 COV\* extraídos e identificados por MEFS-HS (PDMS) e CG-EM na garapa natural e pasteurizada.

N.	Nome	M.M.	T.R.	IRL	IRL*	GP	GN
1	Hexanal	100	6.24	769	780 <sup>(4)</sup>	+	+
2	Heptanal	114	9.45	776	919 <sup>(2)</sup>	+	+
3	2-Heptanol	116	9.81	888	892 <sup>(1)</sup>	+	+
4	Methoxy-phenyl-oxime	151	10.64	912		+	+
5	Benzaldeide	106	11.29	929	924 <sup>(4)</sup>	+	—
6	2-Heptenal	112	11.34	931	959 <sup>(3)</sup>	+	+
7	1-Octen-3-one	126	12.28	956	977 <sup>(4)</sup>	—	+
8	2,3-Octanedione	142	12.51	962		+	+
9	1-Octen-3-ol	128	12.67	967	991 <sup>(1)</sup>	+	+
10	2-Pentyl Furan	138	13.09	978		+	+
11	2-Methyl-5-Pentyl Tetrahidrofuran	156	13.13	979		—	+
12	Octanal	128	13.23	982	980 <sup>(4)</sup>	+	+
13	2-Methyl-Tetrahidropiran	116	13.50	989		—	—
14	$\alpha$ -Felandreno	136	13.69	994		+	+
15	1-Buthyl Ciclopenten	124	14.11	1005		+	+
16	1-Methyl-4-(1-Methylethyl) Benzene	134	14.33	1011	1027 <sup>(1)</sup>	+	—
17	$\beta$ -Felandreno	136	14.57	1017	1010 <sup>(4)</sup>	+	—
18	3-Ethyl 3-Heptanol	144	14.93	1027		+	—
19	2-Octenal	126	15.18	1034		+	+
20	1,2,3-Trimethyl Ciclopentane	112	15.47	1041		+	—
21	2-Octen-1-ol	128	16.00	1055		+	—
22	1-Octanol	130	16.12	1059	1070 <sup>(1)</sup>	+	+
23	Nonanal	142	17.09	1084	1081 <sup>(4)</sup>	+	+
24	2-Ethoxi-propano	116	17.26	1089		—	+
25	1-Ethyl-4-methoxi benzene	136	17.37	1092	1179 <sup>(2)</sup>	+	—
26	2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, trans	154	17.90	1106		+	—
27	2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, cis	154	18.51	1124		+	—
28	5-Methyl-2-(1-Methylethyl) Ciclohexanone	154	18.80	1132		+	—
29	2-Ethylhexhyl acetate	172	18.97	1137		+	—
30	2-Nonenal	140	18.98	1137	1151 <sup>(4)</sup>	+	+
31	1-Hepten-4-ol	114	19.21	1144		—	—
32	2-Isoprophyl-5-Methyl Ciclohexanol	156	19.50	1152		+	—
33	1-Nonanol	156	19.68	1158	1185 <sup>(2)</sup>	+	—
34	cis 1,3-trans 1,4 -5-Methyl-2-(1-Methylethyl) Ciclohexanol	156	19.75	1160		+	—
35	6-Isoprophyl-3-methyl-2-cyclohexen-1-ol	154	20.45	1180		+	—
36	Decanal	156	20.68	1187	1172 <sup>(4)</sup>	+	+
37	3,6-Dimethyl-2,3,3a,4,5,7a-Hexahydro-1-Benzofuran	152	21.39	1208		+	—
38	2-Decenal	154	22.33	1239	1260 <sup>(3)</sup>	+	+
39	Nonanoic acid	158	23.14	1265	1745 <sup>(4)</sup>	+	—
40	2,4-Decadienal (E,Z)	152	23.31	1271		+	+
41	2,4-Decadienal (E,E)	152	24.00	1293	1315 <sup>(3)</sup>	—	+
42	2-Undecenal	168	25.35	1341		+	—
43	2,3,5-Trimethyl Decane	184	26.95	1399		—	+
44	6,10-Dimethyl-5,9-Undecadieno-2-one	194	27.79	1431		+	+
45	4-(2,6,6-Trimethyl-1-Ciclohexen-1-il)-3-Buten-2-one	192	28.63	1464		—	+
46	Beta-Ionone	192	28.65	1465	1495 <sup>(3)</sup>	+	+
47	2-(4a,8-Dimethyl-2,3,4,4a,5,6,7,8-Octahidro-2-Naphtalenyl)-2-Propanol	222	29.08	1482		+	—
48	3,7-Dimetil-Nonane	156	29.53	1499		+	+
49	Dactilol	222	30.67	1547		+	—
50	1-Tridecanol	200	31.03	1562		+	—
51	Ethyl dodecanoate	228	31.45	1580	1590 <sup>(2)</sup>	+	+
52	1-Tridecanal	198	31.78	1593		+	+
53	Hexadecane	226	31.95	1602		+	+
54	Isopropyl Dodecanoate	242	32.26	1628		+	+
55	5-Isopropenyl-3,8-Dimethyl-1,2,3,3a,4,5,6,7-Octahidroazulene	204	32.57	1656		+	—
56	1,1-Oxybis Octane	242	33.20	1712		+	+

Tabela 1 (continuação)

N.	Nome	M.M.	T.R.	IRL	IRL*	GP	GN
57	1-Tetradecanol	214	33.36	1725		+	+
58	Ethyl hexhyl Benzoate	234	33.93	1778		+	+
59	Cis-9-Hexadecenal	238	34.08	1790		+	+
60	Octadecane	254	34.19	1800		—	+
61	9-Octadecenoic acid	282	34.20	1800		+	—
62	6-Octadecenoic acid	282	34.35	1807		+	—
63	2,6,10-Trimethyl Dodecane	212	34.36	1808		—	+
64	2-(Phenylmetilene) Octanal	216	34.62	1819		+	—
65	Tetradecanoic acid	228	35.24	1848		+	—
66	Diethyl decanodioate	258	35.41	1855		+	+
67	Ethyl tetradecanoate	256	35.90	1877	1797 <sup>(2)</sup>	+	—
68	Nonadecane	268	36.41	1900	1900 <sup>(4)</sup>	—	+
69	Octadecanoic acid	284	36.50	1904		+	—
70	Isoprophyl Myristate	270	36.73	1912	1835 <sup>(4)</sup>	+	+
71	Pentadecanoic acid	242	37.59	1944		+	—
72	Eicosane	282	39.13	2000		+	+
73	Methyl hexadecanoate	270	39.44	2009		+	+
74	Cis-9-Hexadecenal	238	39.84	2020		+	—
75	Hexadecanoic acid	256	40.70	2043	1903 <sup>(2)</sup>	+	—
76	Ethyl Hexadecanoate	284	41.90	2070	1963 <sup>(2)</sup>	+	—
77	Heneicosane	296	42.76	2100		—	+

\* VOC identificados por espectrômetro de massa usando a biblioteca NIST147 e NIST 127, MM - Massa Molar; TR – Tempo de retenção; IRL - Índice de retenção Linear na coluna capilar Rtx-1MS; IRL\* - Índice de retenção Linear da literatura (1 - Setkova et al. (2007), 2 - Cardeal et al. (2009), 3 - Poisson & Schieberle (2008), 4 – Liaw (2005); GN - garapa natural; GP - garapa pasteurizada; + presença; — ausência.

Na Figura 3A observa-se que em relação a componente 1, rotulada de Envelhecimento, a sequência do processo de produção do fermentado ficou distribuída em um plano de acordo com a idade, ou seja, primeiro as trasfegas T1, T2 e T3 e posteriormente os fermentados envelhecidos, sendo as amostras T3P, apresentaram comportamento anômalo (*outlier*), se distanciando das demais formando um grupo à parte. Ao analisar as variáveis pode-se afirmar que a causa deste distanciamento foi ocasionada pela diferença na proporção das áreas dos picos das amostras.

Para todos os picos dos COV detectados e identificados nas amostras da terceira trasfega do tratamento pasteurizado (T3P), observaram-se áreas dos picos cromatográficos reduzidas em relação as das demais amostras, provavelmente devido a algum problema de vedação no frasco durante o armazenamento que pode ter promovido a perda dos voláteis.

Como pode ser observado na Figura 3B, para a componente 1 – envelhecimento, os coeficientes fatoriais (loadings), significativos >0,800, que proporcionaram a discriminação das trasfegas e dos fermentados foram correspondentes aos COV: (1) 2,4,5-Trimetil-1,3-dioxolano, (2) 2,3-Butanediol, (3) 2-Hidroxi-propanoato de etila, (4) Acetato de isoamila, (5) Acetato de 2-metil-butila, (6) 1-



Heptanol, (7) 2-Octanona, (8) Fenil-etanol, (9) 1-Nonanol, (10) 2-Fenil-acetato de etila, (11) Decanol, (12) 6,10-Dimetil-5,9-undecadieno-2-ona, (13) hexadecano. Analisando os cromatogramas correspondentes (não apresentados) ficou evidenciado o aumento gradual das áreas dos picos destes compostos ao longo do envelhecimento, sendo que, cinco destes compostos influenciaram na discriminação dos fermentados envelhecidos (os compostos numerados como: 2, 3, 6, 8 e 13) e sete influenciaram na separação das trasfegas (1, 4, 5, 7, 10, 11 e 12).

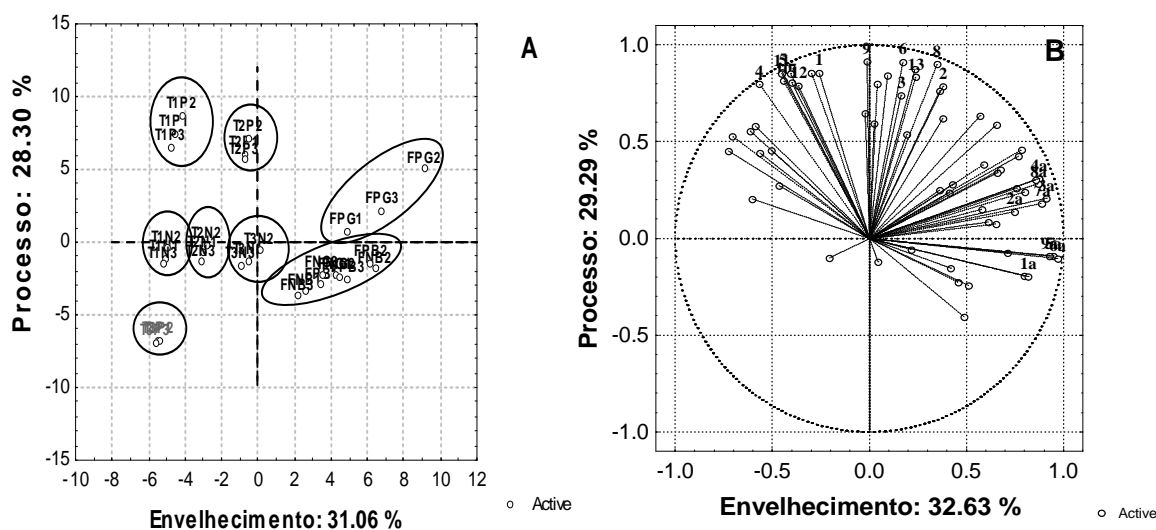


Figure 3 A. ACP dos COV dos mostos e fermentados. T1N e T1P-1<sup>a</sup> trasfega, T2N e T2P – 2<sup>a</sup> trasfega, T3N e T3P 3<sup>a</sup> trasfega, FNG e FPG – Fermentado de cana Natural e Pasteurizado envelhecidos em garrafa de vidro; FNB e FPB – Fermentado de cana Natural e Pasteurizado envelhecidos em barril de carvalho. Médias de três repetições; B. Gráfico de escores obtidos da ACP.

Francioli et al. (2003) e Riu-Aumatell et al. (2006) estudando a evolução de voláteis ao longo do envelhecimento de cavas (vinho espumante espanhol) como indicadores de envelhecimento, observaram que, 2-fenil etanol, Hexil acetato e álcool isoamílico diminuíram significativamente ao longo do tempo, podendo ser considerados marcadores de vinhos novos, enquanto 1,2-dihidro-1,1,6-trimethylnaphthalene (NDT), vitispirano e dietil succinato aumentaram significativamente durante o envelhecimento. Etil succinato pode ser um marcador de idade ao longo do período de envelhecimento.

Loyaux, Roger & Adda (2006) avaliaram a evolução de voláteis ao longo do envelhecimento de champanhe observaram um rápido aumento do nível de voláteis no primeiro período. Com o envelhecimento houve diminuição lenta do nível de nerolidol, butirato, álcool isoamílico e acetato de hexila e as concentrações de vitispirano e de benzaldeído aumentaram.

Para o fator 2, os coeficientes fatoriais que proporcionaram a discriminação das trasfegas e dos fermentados foram correspondentes aos COVs: (1a) 3-Metil-butanoato de etila, (2a) Dietoxi-metil-3-butano, (3a) 2-Metil-5-pentil-tetrahydrofurano, (4a) 2-Metil-tetrahidropirano, (5a) 2,6-Dimetil-4-heptanol, (6a) Dietil butanodioato, (7a) Decanal, (8a) Fenil-acetato de etila, (9a) 2-Tert-butil-5-isopropil-1,3-dioxolano-4-ona. Como pode ser observado na Figura 3B, quatro compostos proporcionaram a separação dos mostos e fermentados obtidos da garapa natural (1a, 5a, 6a e 9a) e cinco compostos influenciaram na discriminação dos mostos e fermentados obtidos da garapa pasteurizada (2a, 3a, 4a, 7a e 8a).

#### **4. Conclusões**

A pasteurização do caldo de cana promoveu aumento da concentração da maioria dos compostos voláteis e ampliação do número de COV. Na garapa natural foram detectados e identificados 42 COV, na garapa pasteurizada 66, com 30 compostos comuns aos dois tipos de garapas. Dos 30 COV comuns encontrados nos dois tipos de garapa apenas 18 comuns as duas permaneceram na composição do mosto e dos fermentados produzidos. A pasteurização promoveu aumento do número de voláteis e esses novos COV com concentrações elevadas. Quatro COV encontrados apenas na garapa natural. Oito COV identificados apenas na GP que permaneceram nos fermentados. A ACP baseada na área média dos picos obtidos na análise por MEFS-HS e CG-EM discriminou os dois tratamentos, natural e pasteurizado. Ao longo do processo de produção do fermentado foram identificados setenta compostos comuns aos quatro tipos de fermentados presentes em todas as etapas da fermentação. A ACP evidenciou a evolução do perfil dos voláteis ao longo do processo de produção, caracterizando o aumento da concentração da maioria dos COV.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, FAPESB, PRONEX, FINEP e CAPES.

## 5. Referências

Ferreira, V.; López, R.; Cacho, J. F. Quantitative determination of the odorants of young red wine from different grape varieties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1659-1667, 2000.

Francioli, S.; Torrens, J.; Riu-Aumatell, M.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. Volatile compounds by SPME–GC as age markers of sparkling wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, 2003. v. 54, n. 3, p. 158–162.

Hair, J., Anderson, R., Tatham, R. **Análise multivariada dos dados**. Porto Alegre: Bookman. 2005. p 101-102

Janzantti, N. S.; Franco, M. R. B., Wosiacki, G. Efeito do processamento na composição de voláteis de suco clarificado de maçã Fuji. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas v. 23 n. 3, p. 523-528. set-dez, 2003.

Janzantti, Natália Soares **Compostos Voláteis e Qualidade de Sabor da Cachaça**. 2004. 178p. Tese (doutorado em ciência de alimentos) – Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 2004.

Loyaux, D., Roger, S., Adda, J. The evolution of champagne volatiles during ageing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 32, n. 12, p. 1254-1258, sep. 2006.

Liaw, I. W. R., **Comparison of the Flavor Chemistry and Flavor Stability of Mozzarella and Cheddar whey**. 2009. 181 p. Thesis (Master of Science in Food Science) Faculty of North Carolina State University, 2009.

Lima, U. A *et al.* **Biotecnologia – tecnologia das fermentações**. V. I, São Paulo: Edgard Blücher, 1975.

Manly, B. J. F. (2008) Métodos estatísticos multivariados: uma introdução (pp 89 - 94). Porto Alegre: Bookman.

Moretto, E.; Alves, R. F.; Archer, P. M. B.; Campos, C. M. T.; Prudêncio, A. J. **Vinhos & vinagres (processamento e análises)**. Editora da UFSC. Florianópolis, 1988. 167 p.

Noble, A. C.; Arnold, R. A.; Masuda, B. M.; Pecore, S. D.; Schimdt, J. O.; Stern, P. M. Progress Towards a Standardized System of Wine Aroma Terminology. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 35, n. 2, p. 107–109, 1984.

Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A. e Dubordier, D. **Aging: Red wine in vat and barrel: Phenomena occurring during aging**. In: Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A. e Dubordier, D. Handbook of Enology. The chemistry of the wine stabilization and treatments. John Wiley & Sons. New York. 2002.

Riu-Aumatell, M., Bosch-Fusté, J., López-Tamames, E., Buxaderas, S. Development of volatile compounds of cava (Spanish sparkling wine) during long ageing time in contact with lees. **Food Chemistry**, v. 95, n. 2, p. 237-242, mar. 2006.

Rosier, Jean Pierre. **Manual de elaboração de vinho para pequenas cantinas**. Florianópolis: Empresa Catarinense de Pesquisa agropecuária S.A., 1988. 62 p.

Tokitomo, Y.; Kobayashi, A.; Yamanishi, T. Aroma Components of Fresh Sugar Cane Juice. Note 2870, **Agric. Biol. Chem.**, v. 48, n. 11, p. 2869-2870, 1984

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ficou evidenciado neste trabalho que a pasteurização da garapa, como foi realizada, proporcionou significativas mudanças nas características físico-químicas, na composição dos compostos orgânicos voláteis, em termos quantitativos e qualitativos. Essas mudanças ocorreram a partir da matéria-prima, aumentando nesta, o número de voláteis em mais de 50 %, interferindo também, nas características sensoriais dos fermentados produzidos, que foram percebidas pelos provadores no momento da avaliação, o que levou a melhor aceitação da bebida alcoólica de cana originada da garapa pasteurizada.

O método desenvolvido por MEFS-HS e CG-EM foi eficiente na extração e identificação de 104 COV comuns aos quatro tipos de fermentados estudados – tais como, pirazinas, aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres, alcanos e ácidos orgânicos.

O tipo de preparação e de estocagem promoveu diferenças nas composições químicas finais e nos perfis de COV dos fermentados estudados. Ao longo do processo de produção do fermentado foram identificados setenta compostos comuns aos quatro tipos de fermentados presentes em todas as etapas da fermentação e envelhecimento. A maior parte dos COV foi originada no processo fermentativo pelas leveduras, seguida pelo processo de envelhecimento quando ocorrem importantes reações.

ACP foi uma ferramenta muito eficiente para discriminar os diferentes tratamentos utilizados.

Buscando o aperfeiçoamento do produto se faz necessário, a continuidade dos estudos para incluir metodologias não contempladas neste trabalho, como utilização pasteurizadores e fermentadores industriais com controle de temperatura; utilização de outros tipos de vasilhame para envelhecimento, como o utilizado nas Filipinas, o *burnay* (vasilhame de cerâmica); utilizar componentes nutritivos no mosto, principalmente uma fonte nitrogenada, não protéica (fosfato de amônio), testando doses diferentes para avaliar a melhoria na produção de voláteis e conseqüentemente nas características sensoriais; fazer testes com fermentos naturais para identificar e desenvolver fermentados regionais (varietais), utilizar leveduras selecionadas para melhorar o rendimento e a qualidade do

fermentado produzido e fazer o controle microbiológico ao longo do processo de produção do fermentado.

A aromatização da bebida, na forma de *blender*, utilizando polpas ou extratos de frutas e plantas regionais com a produção de produtos diferenciados seria outra alternativa que poderia ser utilizada para o desenvolvimento da tecnologia do fermentado alcoólico de cana-de-açúcar.

No Brasil o vinho-de-cana é utilizado para produção de bebida destilada (cachaça). Para os produtores de cana-de-açúcar e proprietários de alambiques é possível conseguir um produto comercial de baixo custo e alto valor agregado que seria uma alternativa a mais para aproveitamento da cana-de-açúcar em época de safra. Fazendo uso de uma tecnologia de fácil aplicação acessível a todos os produtores, a produção e comercialização de fermentado de cana pode ser uma alternativa viável, de baixo custo e alto valor agregado, proporcionando renda, empregos e arrecadação de tributos. Será um novo produto com grande potencial de mercado.