



GABRIELA FONTES ALVARENGA

**RELAÇÃO ENTRE A MICROBIOTA PRESENTE NO
PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CACHAÇA E A QUALIDADE
FÍSICO-QUÍMICA DA BEBIDA**

**LAVRAS – MG
2023**

GABRIELA FONTES ALVARENGA

**RELAÇÃO ENTRE A MICROBIOTA PRESENTE NO PROCESSO DE PRODUÇÃO
DE CACHAÇA E A QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DA BEBIDA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora

Prof. Dr. Luís Roberto Batista
Coorientador

**LAVRAS – MG
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Alvarenga, Gabriela Fontes.

Relação entre a microbiota presente no processo de produção
de cachaça e a qualidade físico-química da bebida / Gabriela Fontes
Alvarenga. - 2023.

154 p. : il.

Orientador(a): Maria das Graças Cardoso.

Coorientador(a): Luís Roberto Batista.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Contaminantes de bebidas. 2. Metagenômica. 3. Qualidade
de cachaça. I. Cardoso, Maria das Graças. II. Batista, Luís Roberto.
III. Título.

GABRIELA FONTES ALVARENGA

**RELAÇÃO ENTRE A MICROBIOTA PRESENTE NO PROCESSO DE PRODUÇÃO
DE CACHAÇA E A QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DA BEBIDA**

**RELATIONSHIP BETWEEN THE MICROBIOTA PRESENT IN THE CACHAÇA
PRODUCTION PROCESS AND THE PHYSICAL-CHEMICAL QUALITY OF THE
BEVERAGE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 10 de março de 2023.

Dra. Maria das Graças Cardoso

Dr. Luís Roberto Batista

Dra. Ana Maria de Resende Machado

Dr. David Lee Nelson

Dr. Wilder Douglas Santiago

UFLA

UFLA

Cefet-MG

UFVJM

UFLA

Documento assinado digitalmente
 MARIA DAS GRACAS CARDOSO
Data: 18/06/2023 17:44:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora

Prof. Dr. Luís Roberto Batista
Coorientador

**LAVRAS – MG
2023**

*A Deus e à N.Sra. Aparecida, que nunca me
desamparam.
Aos meus pais, por todo o exemplo de vida.
Dedico*

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus, por sempre iluminar meu caminho, por permitir que as dificuldades sejam superadas, e por colocar pessoas especiais em minha vida.

À Nossa Senhora Aparecida, por me cobrir com seu manto e sempre interceder por mim.

À Universidade Federal de Lavras, ao Programas de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos e ao departamento de Química, pela oportunidade de realização do trabalho.

À Capes, CNPQ e Fapemig pela concessão da bolsa e suporte financeiro para realização da pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso, por todo o conhecimento passado, por sempre estar disponível e se esforçando para que alcancemos nossos objetivos, e por fazer com que a caminhada ao longo dos anos de doutorado não se resuma apenas a uma experiência profissional, por ter sido inspiração para que eu evoluísse como pessoa.

Ao Prof. Dr. Luís Roberto Batista, pela coorientação, direcionamentos e sugestões.

Aos meus pais, Alcione e Ilton, por todo o incentivo e carinho, por nos fazer acreditar que somos capazes de alcançar qualquer objetivo, por serem o meu porto seguro, por muitas vezes abrirem mão de viverem os próprios sonhos para viver os meus! Nenhuma palavra é suficiente para demonstrar a gratidão que tenho por vocês!

Aos meus irmãos, Izabela, Gabriel e Beliza, por cuidarem, incentivarem, e acreditarem em mim. Por vibrarem comigo a cada conquista e realização.

Aos meus sobrinhos, Luiza, Miguel, Helena e Carolina, por trazerem mais amor, carinho e diversão, às minhas idas à Itabira. Vocês são o meu refúgio, são a representação da leveza e simplicidade que a vida precisa.

Aos amigos que fizeram com que a caminhada fosse mais leve, por escutarem os desabafos e proporcionarem momentos de distração, em especial às meninas da Doce Deleite e Livinha.

Aos colegas dos laboratórios de Análise de Qualidade de Cachaça, Óleos Essenciais e Coleção de Cultura, em especial Richard, Renan, Cássia, Vanúzia, Isadora, Pâmela, Maria Augusta, Alex, Gabriela, Ana Paula, Marcus, Fabi, Suzana, Thalissa, Míriam e Fernanda, por toda cooperação, convivência e ensinamentos.

Ao Dreyphus, que me acompanhou durante parte dessa caminhada, pelo estímulo, carinho e ajuda.

Á Cleusa e Maria Luísa, técnicas do Laboratório de Análise de Qualidade de Cachaça e Aguardente de cana-de-açúcar, por toda a disponibilidade para os ensinamentos, auxílio e suporte.

Aos produtores de cachaça, pela disponibilidade e parceria para a realização do trabalho.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem contribuir com este trabalho.

A todos que participaram direta ou indiretamente para a realização deste objetivo.

*“Necessitamos sempre de ambicionar alguma coisa
que, alcançada, não nos torna sem ambição.”*

(Carlos Drummond de Andrade)

RESUMO

A bebida alcoólica obtida da fermentação do caldo de cana-de-açúcar seguida do processo de destilação é denominada cachaça ou aguardente de cana-de-açúcar. O processo de produção da cachaça/aguardente ainda apresenta diferenças e peculiaridades entre os produtores, e isso reflete na qualidade físico-química e sensorial da bebida produzida. Por isso, é necessário o desenvolvimento de pesquisas que contribuam para o entendimento da origem dos compostos presentes na cachaça/aguardente e que permitam estabelecer critérios para a melhoria dos processos e do produto final. Objetivou-se neste trabalho compreender as possíveis vias de formação do contaminante acroleína durante a produção da cachaça/aguardente e as correlações com outros compostos presentes na bebida; identificar os microrganismos presentes no “pé de cuba” (cultura inicial) utilizada por alambiques produtores de cachaça por meio de técnicas de metagenômica, e verificar a influência desses microrganismos na composição físico-química e volátil da cachaça produzida e das demais frações do destilado. Amostras de cachaça produzidas por diferentes processos em todas as regiões do Brasil foram coletadas no comércio varejista e utilizadas para quantificar acroleína e avaliar as possíveis rotas de formação desse contaminante a partir da correlação com outros compostos secundários presentes na bebida usando análise de componentes principais. Além disso, amostras de cachaça e das frações cabeça e cauda foram coletadas em alambiques produtores de cachaça de Minas Gerais e utilizadas para análises físico-químicas e cromatográficas. Também foram realizadas análises microbiológicas e metagenômica para identificação do microbioma presente nas amostras de “pé de cuba”. Os resultados foram interpretados com o auxílio de ferramentas estatísticas. Constatou-se que a origem da acroleína na cachaça/aguardente está relacionada a degradação química e a conversão enzimática do glicerol, podendo ser correlacionada com a de outros compostos que também a compõem, como o butan-2-ol, propan-1-ol e ácidos voláteis. Em relação ao microbioma que constitui o “pé de cuba”, foi observada uma grande diversidade e riqueza microbiológica entre as amostras analisadas, sendo identificados diferentes gêneros de bactérias, leveduras e fungos filamentosos. *Lactobacillus* foi o principal gênero bacteriano identificado em todas as amostras, com alta dominância em relação aos demais. Outros gêneros identificados em todas as amostras foram: *Wolbachia*, *Zymomonas* e *Acetobacter*. Entre os gêneros fúngicos identificados, *Saccharomyces* foi o principal, mas algumas amostras apresentaram uma grande diversidade, com a presença de outros gêneros como *Cladosporium*, *Geastrumia* e *Fusarium*. As amostras da cachaça e das frações cabeça e cauda produzidas nos alambiques em estudo demonstraram uma composição físico-química e volátil diversificada, que é influenciada pela presença dos microrganismos que constituem o “pé de cuba”. As principais correlações positivas foram observadas entre os gêneros bacterianos *Komagataeibacter*, *Bacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e os teores de acidez volátil; os teores de acroleína e os gêneros *Bacillus* e *Lactococcus*; entre as concentrações de butan-1-ol e a presença de *Saccharomyces* e *Lactobacillus*; bactérias *Ruminococcaceae* UCG-014, *Intestinimonas* e *Alloprevotella* e os teores de butan-2-ol e propan-1-ol; os teores dos álcoois isoamílico e isobutílico e o gênero *Pseudomonas*; entre as concentrações de carbamato de etila e os gêneros *Bradyrhizobium*, *Lactobacillus* e *Saccharomyces*.

Palavras-chave: Destilado alcoólico. Contaminantes de bebidas. Qualidade de cachaça. Metagenômica.

ABSTRACT

The alcoholic beverage obtained from the fermentation of sugarcane juice, followed by the distillation, is called cachaça or sugarcane spirit. The cachaça/spirits production process still presents differences and peculiarities among producers, and this difference reflects on the physical-chemical and sensory quality of the beverage produced. Therefore, it is necessary to develop research that contributes to the understanding of the origin of the compounds present in cachaça/spirits and that allows the establishment of criteria for improving processes and the final product. The objectives of this work were to understand the possible pathways of formation of the acrolein contaminant during the production of cachaça/spirits and the correlations with other compounds present in the beverage; identify the microorganisms present in the “pé de cuba” (starter culture) used by cachaça-producing stills through metagenomic techniques; and verify the influence of these microorganisms on the physical-chemical and volatile composition of the cachaça produced and the other fractions of the distillate. Samples of cachaça produced by different processes in all regions of Brazil were collected in retail supermarkets and used to quantify acrolein and evaluate the possible routes of formation of this contaminant based on the correlation with other secondary compounds present in the beverage using principal component analysis. Furthermore, samples of cachaça and the head and tail fractions were collected in cachaça producing stills in Minas Gerais and used for physical-chemical and chromatographic analyses. Microbiological and metagenomic analyses were also performed to identify the microbiome present in the “pé de cuba” samples. The results were interpreted with the aid of statistical tools. It was found that the origin of acrolein in cachaça/spirits is related to the chemical degradation and enzymatic conversion of glycerol, which can be correlated with that of other compounds that also compose the beverage, such as butan-2-ol, propan-1-ol and volatile acids. A great diversity and microbiological richness was observed among the analysed samples of the microbiome that constitutes the “pé de cuba”. Different genera of bacteria, yeasts and filamentous fungi were identified. *Lactobacillus* was the main bacterial genus identified in all the samples, with a high degree of dominance in relation to the others genera. Other genera identified in all the samples were: *Wolbachia*, *Zymomonas* and *Acetobacter*. *Saccharomyces* was the main genus among the fungal genera identified, but a great diversity was observed in some samples, with the presence of other genera such as *Cladosporium*, *Geastrumia* and *Fusarium*. The samples of cachaça and the head and tail fractions produced in the stills under study possessed a diversified physical-chemical and volatile composition, which was influenced by the presence of microorganisms that constitute the “pé de cuba”. The main positive correlations were observed between the bacterial genera *Komagataeibacter*, *Bacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* with volatile acidity levels; acrolein levels with *Bacillus* and *Lactococcus* genera; of butan-1-ol concentrations with the presence of *Saccharomyces* and *Lactobacillus*; of *Ruminococcaceae* UCG-014, *Intestinimonas* and *Alloprevotella* bacteria with the concentrations of butan-2-ol and propan-1-ol; the levels of isoamyl and isobutyl alcohols with the genus *Pseudomonas*; between ethyl carbamate concentrations with the *Bradyrhizobium*, *Lactobacillus* and *Saccharomyces* genera.

Keywords: Alcohol distillate. Beverage contaminants. Cachaça quality. Metagenomics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

PRIMEIRO CAPÍTULO

Figura 1 – Diagrama de produção de cachaça/aguardente em alambiques de cobre.....	19
Figura 2 – Via de formação do etanol durante a fermentação alcoólica.....	24
Figura 3 – Compostos voláteis que podem ser sintetizados pelo metabolismo da levedura <i>S. cerevisiae</i> e influenciam na composição química da cachaça e aguardente de cana-de-açúcar (AGCM: ácidos graxos de cadeia média).....	25
Figura 4 – Estrutura química do acetaldeído (etanal).....	36
Figura 5 – Estrutura química do éster acetato de etila.....	36
Figura 6 – Estrutura química do ácido acético (ácido etanóico).....	37
Figura 7 – Estruturas químicas de alguns ácidos sintetizados pelo metabolismo das leveduras.	38
Figura 8 – Estruturas químicas dos álcoois superiores desejáveis.	39
Figura 9 – Formação de álcoois superiores a partir da Via Catabólica de Ehrlich.....	39
Figura 10 – Principais compostos fenólicos incorporados à cachaça após o processo de envelhecimento e armazenamento.....	41
Figura 11 – Estrutura química do 1,2,3-propanotriol (glicerol).	41
Figura 12 – Estrutura química do metanol.	42
Figura 13 – Estrutura química dos álcoois superiores indesejáveis.....	43
Figura 14 – Estruturas químicas do furfural e 5-hidroximetilfurfural.....	43
Figura 15 – Estrutura química do propen-2-al (acroleína).	44
Figura 16 – Formação da acroleína a partir do catabolismo do glicerol.	44
Figura 17 – Estrutura química do carbamato de etila.	45
Figura 18 – Estrutura química da 2,3-butanodiona (diacetil).....	46
Figura 19 – Estruturas químicas de alguns exemplos de HPA's.	47

SEGUNDO CAPÍTULO

Figure 1 – Metabolic pathways for the production of propan-1-ol, acrolein and butan-2-ol from the enzymatic conversion of substrates with similar chemical structures in bacteria of the genus <i>Lactobacillus</i>	71
Figure 2 - PCA1 x PCA2 biplot graph of scores and loadings of the variables referring to the physicochemical composition of cachaças and sugarcane spirits.....	72

Figure 3 - PCA1 x PCA2 biplot graph of scores and loadings of variables related to acrolein formation in sugarcane cachaças and spirits..... 73

TERCEIRO CAPÍTULO

Figura 1 – a) Gráfico da análise de componentes principais representando os *scores* e *loadings* das amostras das três frações voláteis: cabeça (1), coração (2) e cauda (3) produzidas pelos produtores A, B, C, e D. b) Árvore hierárquica com a separação dos *clusters*, baseado na distância Euclidiana das amostras das frações voláteis dos produtores A, B, C, e D..... 92

Figura 2 – Curvas de rarefação observadas no nível ASV para sequências bacterianas (A) e fúngicas (B).99

Figura 3 – Avaliação da similaridade de comunidades bacterianas e fúngicas entre amostras de cultura “starter” com base na dissimilaridade de Bray-Curtis no nível ASV A) PCoA para bactérias; B) Dendrograma usando o método de junção vizinho para bactérias; C) PCoA para fungos; D) Dendrograma usando o método de junção vizinho para fungos.100

Figura 4 – Composição taxonômica bacteriana das amostras de cultura inicial representada por: A) Bargraph a nível de filo; B) Heatmap a nível de filo; C) Bargraph a nível de gênero; D) Heatmap a nível de gênero; E) Bargraph a nível de espécie; F) Heatmap a nível de espécie. Bargraphs mostram as 20 mais abundantes identificações. Heatmaps mostram todas as identificações com abundância acima de 0,1%, ambos usando abundância relativa. NA = não identificado. Other = identificações com abundância inferior a 0,1%..... 102

Figura 5 – Composição taxonômica fúngica das amostras de cultura inicial representada por: A) Bargraph a nível de filo; B) Heatmap a nível de filo; C) Bargraph a nível de gênero; D) Heatmap a nível de gênero; E) Bargraph a nível de espécie; F) Heatmap a nível de espécie. Bargraphs mostram as 20 mais abundantes identificações. Heatmaps mostram todas as identificações com abundância acima de 0,1%, ambos usando abundância relativa. NA = não identificado. Other = identificações com abundância inferior a 0,1%..... 108

Figura 6 – Correlação entre a composição físico-química e volátil obtida nas frações destiladas e a microbiota presente nas amostras de cultura inicial dos quatro alambiques produtores de cachaça. A intensidade das cores representa o grau de correlação, mensurada pela correlação de Spearman, entre a diversidade microbiana e os compostos identificados, onde a cor roxa indica grau de correlação positiva e a cor vermelha indica grau de correlação negativa..... 120

LISTA DE TABELAS

SEGUNDO CAPÍTULO

Table 1 – Physical-chemical composition of cachaça and sugarcane spirits.	66
Table 2 – Concentration of contaminants present in the samples of cachaça and sugar cane spirits.....	69

TERCEIRO CAPÍTULO

Tabela 1 – Composição físico-química das amostras das frações voláteis cabeça, coração e cauda dos produtores A, B, C, e D.	90
Tabela 2 – Contagem média de bactérias aeróbicas e fungos viáveis das culturas iniciais dos produtores de cachaça A, B, C e D, expressos em log UFC mL ⁻¹	94
Tabela 3 – Índices de diversidade de Shannon, Chao, Equitabilidade e Dominância, e porcentagem de cobertura calculados no nível ASV para sequências bacterianas e fúngicas das amostras de cultura “starter” dos produtores de cachaça A, B, C e D.	98
Tabela 4 – Compostos voláteis identificados por microextração em fase sólida/cromatografia gasosa-espectrometria de massas nas frações voláteis, cabeça, coração e cauda, dos quatro alambiques produtores de cachaça. Resultados expressos em % área relativa de pico.	115

SUMÁRIO

PRIMEIRO CAPÍTULO	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1. A cachaça e a aguardente de cana-de-açúcar	17
2.2. Cadeia produtiva da cachaça/aguardente de cana	18
2.2.1. Matéria-prima	19
2.2.2. Obtenção do mosto	21
2.2.3. Fermentação	22
2.2.4. Destilação	28
2.2.5. Armazenamento e envelhecimento	31
2.2.6. Envase	33
2.3. Compostos secundários e contaminantes	34
2.4. Metodologias de identificação da microbiota	48
REFERÊNCIAS	54
SEGUNDO CAPÍTULO	62
ARTIGO 1 - CORRELATION OF THE PRESENCE OF ACROLEIN WITH HIGHER ALCOHOLS, GLYCEROL AND ACIDITY IN CACHAÇAS	62
TERCEIRO CAPÍTULO	79
COMUNIDADES MICROBIANAS PRESENTES EM CULTURA INICIAL DE ALAMBIQUES PRODUTORES DE CACHAÇA: CORRELAÇÕES COM A COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E VOLÁTIL DAS FRAÇÕES DO DESTILADO	79
CONSIDERAÇÕES FINAIS	142
ANEXO I	143
CACHAÇA SOLD IN POLYETHYLENE TEREPHTHALATE PACKAGING: DETERMINATION OF THE PHYSICAL-CHEMICAL PROFILE, POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS AND ETHYL CARBAMATE	143

PRIMEIRO CAPÍTULO

1 INTRODUÇÃO

A aguardente de cana-de-açúcar/cachaça são bebidas alcóolicas obtidas da fermentação do caldo de cana-de-açúcar seguido da destilação do mosto fermentado. As principais diferenças entre elas estão no local de origem de produção e a graduação alcoólica. Cachaça é a bebida produzida exclusivamente no Brasil, a partir da destilação do mosto de cana-de-açúcar fermentado com graduação alcoólica entre 38 a 48% (v/v) a 20 °C. Já a aguardente de cana-de-açúcar é a bebida produzida em qualquer local com graduação alcoólica entre 38 a 54% (v/v) a 20 °C (BRASIL, 2022a).

A cachaça/aguardente é uma mistura complexa constituída majoritariamente por etanol, água e compostos secundários, como ácidos carboxílicos, ésteres, aldeídos e álcoois superiores, que são responsáveis pelo aroma e sabor característico da bebida (CARDOSO, 2020; GONÇALVES et al., 2016; PORTUGAL et al., 2017). Além desses compostos secundários que são desejáveis, outros compostos também são formados durante as etapas de processamento da cachaça/aguardente. Entretanto, esses compostos são considerados contaminantes da bebida por apresentarem efeitos maléficos à saúde dos consumidores. Os principais contaminantes encontrados são o metanol, álcoois superiores: butílico (butan-1-ol) e *sec*-butílico (butan-2-ol), furfural e hidroximetilfurfural (HMF), acroleína, carbamato de etila, e o cobre (BRASIL, 2022a; CARDOSO, 2020; LIMA, et al., 2022).

Para que a cachaça e a aguardente produzidas estejam adequadas para o consumo e comercialização, o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAP) estabeleceu os limites de alguns de seus compostos por meio dos Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ's) instituídos pela Portaria do MAP nº 539, de 26 de dezembro de 2022. Os PIQ's estabelecem critérios que garantem que a bebida comercializada tenha um padrão e seja segura para a saúde do consumidor (BRASIL, 2022a).

Entretanto, o processo de produção de cachaça/aguardente no Brasil ainda é diversificado e as diferentes formas de condução refletem na composição físico-química da bebida final produzida. Em relação a essas diferenças, destacam-se as da etapa de destilação e fermentação, visto que essas duas etapas são de grande importância para as características do produto final. Durante a fermentação, a microbiota que está presente no mosto, por meio das reações bioquímicas envolvidas no seu metabolismo primário e secundário, dará origem a diversos compostos. Esses compostos serão a base da composição da cachaça e da aguardente produzida (BORTOLETTO et al., 2018; CARDOSO, 2020).

As diferenças na etapa de destilação consistem principalmente no tipo de equipamento utilizado, podendo a bebida produzida ser inclusive classificada segundo a legislação; por isso. Os principais equipamentos de destilação são os alambiques de cobre e as colunas de destilação em aço-inoxidável. A destilação em alambiques de cobre separa os produtos da destilação em três frações: cabeça, coração e cauda, sendo que a fração coração deverá conter os compostos em concentrações adequadas, visto que ela é a própria cachaça. Além disso, o material de constituição do alambique, o cobre, catalisa reações que podem contribuir na formação de compostos desejáveis e indesejáveis. A destilação em colunas de aço-inox tem por característica a não separação das frações, assim como a ausência de reações catalisadas pelo material de constituição do alambique, pois o aço-inox é um material inerte que não interage com os compostos presentes na destilação (BARBOSA et al., 2022a; CARDOSO, 2020; LIMA et al., 2022).

Portanto, é extremamente necessária a compreensão da origem dos compostos que constituem a cachaça/aguardente, buscando, a partir desse entendimento, ferramentas para o controle e melhoria do processo, originando cada vez mais produtos de alta qualidade, reduzindo principalmente a presença de contaminantes e favorecendo a produção de compostos que agregam características sensoriais desejáveis. Com isso, objetivou-se neste trabalho compreender as possíveis vias de formação do contaminante acroleína durante a produção da cachaça/aguardente e as correlações com outros compostos presentes na bebida por meio de análise de amostras de cachaça produzidas por diferentes processos em todas as regiões do Brasil; coletar amostras diretamente de alambiques produtores de cachaça para identificar os microrganismos presentes no “pé de cuba” (cultura inicial) utilizado por esses alambiques produtores de cachaça por meio de técnicas de metagenômica, e verificar a influência desses microrganismos na composição físico-química e volátil da cachaça produzida e nas demais frações do destilado.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A cachaça e a aguardente de cana-de-açúcar

A bebida alcoólica obtida pela fermentação do caldo de cana-de-açúcar, seguida do processo de destilação, é denominada Cachaça ou Aguardente de cana-de-açúcar. A cachaça/aguardente é uma mistura complexa constituída majoritariamente por etanol e água, e por compostos secundários, como álcoois superiores, ácidos orgânicos, aldeídos, cetonas e ésteres, que são responsáveis pelo aroma e sabor característico da bebida (CARDOSO, 2020).

As diferenças entre a cachaça e a aguardente de cana-de-açúcar estão no local de origem de produção e a graduação alcoólica. Cachaça é a bebida produzida exclusivamente no Brasil, pela destilação do mosto da cana-de-açúcar fermentado com graduação alcoólica entre 38 a 48% (v/v) a 20 °C, podendo ser acrescida de 6 g de açúcar por litro. Já a aguardente de cana-de-açúcar é a bebida produzida em qualquer país, podendo ser obtida tanto pela destilação do mosto de cana-de-açúcar fermentado, como do rebaixamento do teor alcoólico do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar, com graduação alcoólica entre 38 a 54% (v/v) a 20 °C. Além disso, a cachaça pode ser classificada quanto ao processo de destilação em cachaça de alambique (a bebida produzida exclusivamente e em sua totalidade em alambique de cobre e obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar crua), ou em cachaça, quando a bebida é produzida por outro método de destilação ou pela mistura de cachaças oriundas de diferentes métodos de destilação (BRASIL, 2022a).

A relação do Brasil com a produção de cachaça/aguardente vem desde o período colonial com a inserção dos engenhos de açúcar, onde surgiram os primeiros alambiques do país. Entretanto, essa bebida foi desvalorizada durante muito tempo e não havia grandes preocupações com a sua qualidade físico-química e sensorial. Com o passar do tempo, essa realidade mudou e a cachaça/aguardente vem se destacando no mercado nacional e internacional, sendo cada vez mais apreciada. Essa evolução pode ser observada também no seu processo produtivo, que se aprimora e padroniza, com o intuito de alcançar um produto final de qualidade que atenda aos mercados interno e externo (CARDOSO, 2020; SILVA; VERRUMA-BERNARDI; OLIVEIRA, 2020).

Com o intuito de padronizar e assegurar a qualidade das cachaças/aguardentes produzidas no Brasil, foi estabelecido, no ano de 2005, o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ's) de aguardente de cana-de-açúcar e cachaça pelo

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a partir da Instrução Normativa Nº 13, de 2005, determinando os limites de congêneres e contaminantes orgânicos e inorgânicos que podem estar presentes na bebida. Atualmente, esse regulamento foi revogado e atualizado pela Portaria do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAP) nº 539, de 26 de dezembro de 2022, que estabelece os Padrões de Identidade e Qualidade da aguardente de cana e da cachaça (BRASIL, 2022a).

A cachaça/aguardente é a bebida destilada mais consumida no Brasil e o terceiro destilado mais consumido no mundo, principalmente pelo seu uso na formulação da Caipirinha. No Brasil, a produção encontra-se dividida entre pequenos produtores e grandes destilarias espalhados por todo o território nacional. Atualmente, estão contabilizados o registro de 936 estabelecimentos produtores de cachaça. O produto é exportado para 67 países diferentes, totalizando o volume de 7.221.219 L e uma receita de US\$ 13.178.050. Os principais países importadores de cachaça são o Paraguai (1.631.503 L), Alemanha (1.630.407 L) e os Estados Unidos (903.714 L), sendo os Estados Unidos o maior mercado exportador em termos de valores, avaliado em US\$ 3.481.872 (BRASIL, 2022b).

Apesar dessa evolução, a produção de cachaça/aguardente ainda enfrenta dificuldades no aspecto da padronização do processo de produção e dos produtos, visto que existem diversos fatores como variedades de cana-de-açúcar, nutrientes que podem ser acrescentados durante a fermentação para o crescimento da levedura, culturas de microrganismos utilizados na fermentação e equipamentos de destilação que podem ser constituídos de coluna de aço-inoxidável ou alambique de cobre, que interferem nas características do produto final (CARDOSO, 2020; GUERREIRO et al., 2018; MENDONÇA et al., 2016).

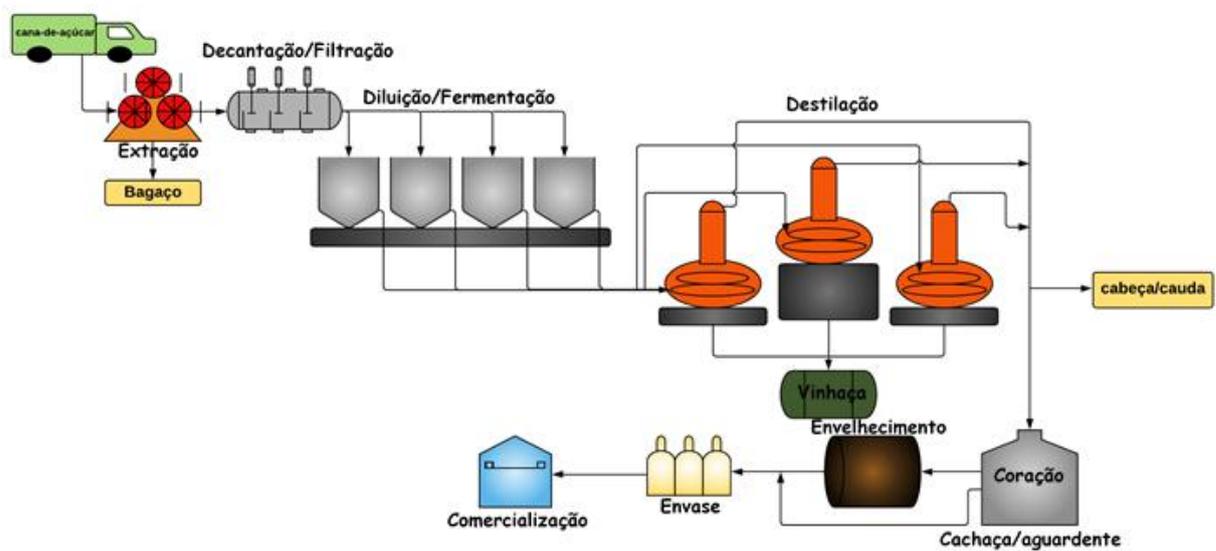
Com isso, é necessária a melhoria constante dos processos produtivos para garantir que o produto final se destaque tanto no mercado interno quanto no mercado externo, vencendo obstáculos como a padronização da bebida e o controle de contaminantes orgânicos e inorgânicos.

2.2. Cadeia produtiva da cachaça/aguardente de cana

A aguardente de cana e a cachaça devem ser produzidas por meio de processos tecnológicos adequados que assegurem a sua apresentação e conservação até o momento do consumo (BRASIL, 2022a). Para a produção de uma bebida de qualidade físico-química e sensorial, todas as etapas do processamento são de grande importância, desde o plantio da

matéria-prima, até que a cachaça/aguardente alcance as mãos dos consumidores. O processo produtivo pode ser dividido em cultivo e colheita da cana-de-açúcar, moagem da cana, filtração e decantação do caldo, diluição do caldo, fermentação, destilação, armazenamento, envelhecimento e envase (Figura 1). Dentre estas etapas, há inúmeras variações que podem ocorrer de acordo com os estabelecimentos produtores. Destacam-se as diferenças entre cachaças/aguardentes produzidas em alambiques de cobre e cachaças/aguardentes produzidas em destilarias com colunas em aço-inoxidável. No processo em alambiques de cobre, o destilado final é separado em três frações – cabeça, coração e cauda – e a fração do coração dará origem à bebida. Além disso, o material da coluna, o cobre, permite que ocorram reações com a formação de compostos favoráveis ao “*flavour*” ou “*bouquet*”. Já nas destilarias com coluna em aço-inoxidável, há um grande volume de produção, não ocorrendo a separação entre as frações e, como o aço-inoxidável é um material inerte, não ocorrem reações que contribuem para a formação de compostos desejados (CARDOSO, 2020; CRAVO et al., 2019, LIMA et al., 2022; MENDONÇA et al., 2016).

Figura 1 – Diagrama de produção de cachaça/aguardente em alambiques de cobre.



Fonte: Adaptado de Cardoso (2020).

2.2.1. Matéria-prima

A principal matéria-prima para a produção de cachaça/aguardente é a cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), uma planta da família Poaceae, tropical, gramínea, originária da Ásia e

Oceania, que se propaga assexuadamente pelo do plantio de colmos maduros (estacas vegetativas). A cana-de-açúcar utilizada atualmente é um híbrido multiespecífico obtido a partir do cruzamento de diversas espécies, como *S. officinarum*, *S. spontaneum* e *S. robustum*. Ela está entre as dez culturas mais plantadas no mundo, constituindo uma das principais culturas comerciais produtoras de açúcar e etanol, devido à sua alta concentração de açúcares, principalmente sacarose (BABU et al., 2022).

No Brasil, a cana-de-açúcar foi trazida pelos primeiros colonizadores no século XVI e obteve uma ótima adaptação ao clima e relevo. Atualmente, o país é um dos maiores produtores de cana-de-açúcar do mundo, com uma área colhida estimada para o ano de 2022/23 de 8,13 milhões de hectares, e uma produção de 579,2 milhões de toneladas. A Região Sudeste ainda é a principal produtora (CONAB, 2022). Em relação ao rendimento para a produção de cachaça, estima-se que são produzidos 120 litros de cachaça/aguardente para cada tonelada de cana-de-açúcar no processo utilizando colunas de destilação em aço-inoxidável, ao passo que o rendimento é de aproximadamente 80 litros de cachaça/aguardente por tonelada de cana-de-açúcar no processo em alambiques de cobre. Esse rendimento inferior é consequência da separação das frações, cabeça, cauda e coração, que é realizada nesse processo (BABU et al., 2022; CARDOSO, 2020).

A composição química da cana-de-açúcar é semelhante em todas as variedades, podendo ocorrer diferenças quantitativas devido a fatores edafoclimáticos, estágio de desenvolvimento da cultura, variedades de cana, adubação, entre outros. A cana-de-açúcar é composta pela fibra, que é a fração de sólidos insolúveis, e pelo caldo, que é constituído de água e sólidos solúveis, que são açúcares e não açúcares. A cana madura, normal e sadia apresenta em sua composição centesimal cerca de 74,5% de água, 14,0% de açúcares, em que a maior fração é de sacarose, 0,9% de fibras, 0,5% de cinzas, 0,4% de materiais nitrogenados, 0,2% de gorduras e ceras, 0,2% de substâncias pécticas, gomas e mucilagem, 0,2% de ácidos, e materiais corantes não dosados (BORTOLETTO; SIVELLO; ALCARDE, 2018; CARDOSO, 2020).

A cana-de-açúcar utilizada para a produção da cachaça e aguardente de cana deve estar limpa, fresca, sadia, colhida em estágio adequado de maturação e produzida segundo as boas práticas agrícolas necessárias para a obtenção de uma matéria-prima de qualidade e que não seja um possível vetor de riscos à qualidade da bebida (BRASIL, 2022a).

Os efeitos da utilização de cana queimada e de cana não queimada durante a colheita na qualidade físico-química da aguardente de cana obtida por um mesmo processo de produção

(fermentação, destilação e equipamentos) foram avaliados por Masson et al. (2007). Os autores constataram que a adoção da queima, com o intuito de facilitar a colheita, tem impactos significativos na concentração de furfural, um contaminante indesejável, na aguardente produzida com essa matéria-prima, apesar de não ter influência nas concentrações de álcoois superiores, ésteres, aldeídos, cobre, acidez volátil e metanol nas amostras analisadas.

2.2.2. Obtenção do mosto

O mosto para fermentação e produção da cachaça é obtido a partir do processo de extração do caldo dos colmos da cana-de-açúcar, utilizando moendas, nas quais ocorre a separação do caldo e do resíduo fibroso (bagaço), podendo ocorrer a repetição dessa etapa até a máxima extração do caldo. O caldo é constituído majoritariamente por água (65-75%) e açúcares (11-18%), e, além desses, vários minerais, vitaminas, ácidos graxos, aminoácidos, amido, polifenóis e gomas estão presentes em quantidades inferiores. O pH do caldo de cana é ligeiramente ácido, variando entre 4,9 e 5,5, o que favorece o desenvolvimento de microrganismos. Após a moagem, o caldo passa pela etapa de decantação e filtração para remoção de bagacilhos. Além disso, podem ser realizadas algumas etapas adicionais, como a diluição para ajuste do teor de açúcares, o tratamento térmico do caldo, entre outras (KAAVYA et al., 2019; PANIGRAHI et al., 2021).

Para garantir a qualidade da fermentação, assim como a qualidade físico-química da cachaça/aguardente, deve-se ter cuidado durante todas as etapas de processamento do caldo de cana, visto que o tempo de armazenamento dos colmos, etapas de esterilização do caldo, qualidade da matéria-prima utilizada, a decantação, filtração, clarificação e diluição do caldo irão influenciar no produto final (OLIVEIRA; BORTOLETTO; ALCARDE, 2016; TEIXEIRA et al., 2019).

Diversos microrganismos podem ser encontrados no caldo de cana-de-açúcar, alguns com efeitos benéficos, como as leveduras selvagens desejáveis, outros considerados contaminantes, como várias bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus*, bem como leveduras contaminantes como *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Candida*, *Pichia* e *Kloeckera*. Esses microrganismos podem ser provenientes do próprio ambiente, como o solo, e dos equipamentos (TEIXEIRA et al., 2019).

Segundo Panigrahi et al. (2021) o intervalo entre o armazenamento dos colmos após a colheita e a moagem é uma oportunidade para a proliferação de microrganismos indesejados,

como algumas bactérias láticas e bactérias heterofermentativas, como *Leuconostoc* spp.. Teixeira et al. (2019) avaliaram o efeito do armazenamento dos colmos e da clarificação do caldo sobre a qualidade da etapa de fermentação e da cachaça obtida e concluíram que, ao armazenar os colmos, há o aumento de contaminação por microrganismos indesejados durante a fermentação e redução da qualidade físico-química da bebida, e que a clarificação pode contribuir para a redução desses impactos negativos.

Ao avaliarem o efeito do processamento térmico do caldo de cana-de-açúcar na condução do processo fermentativo e na qualidade química da cachaça, Alves et al. (2018) constataram que o tratamento térmico foi efetivo para inativação de microrganismos no caldo, mas não influenciou na qualidade química da bebida obtida.

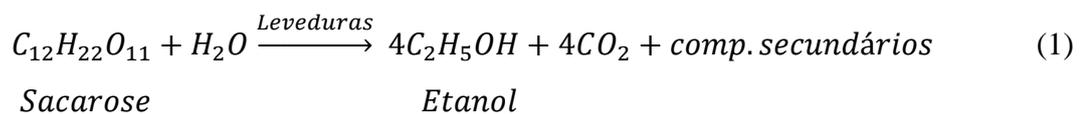
Bortoletto, Silvello e Alcarde (2015) também observaram a influência do caldo de cana-de-açúcar nas características da cachaça, ao avaliarem o efeito do processamento térmico dele e da sua suplementação com ureia na qualidade físico-química de cachaça. Os autores concluíram que a cachaça com a melhor característica físico-química foi a obtida empregando o tratamento térmico do caldo, a não suplementação com ureia e a dupla destilação, pois a bebida apresentou menores teores de aldeído acético, acetato de etila, ácido acético, cobre e carbamato de etila.

Após a extração do caldo de cana-de-açúcar, a concentração de açúcar geralmente se encontra entre 18% a 22%. Esses teores de açúcar podem ter um efeito deletério na fermentação, sendo necessária a padronização do caldo, a partir da sua diluição para concentrações de açúcar entre 14% a 16%. A diluição deve ser realizada com água potável e isenta de compostos que prejudiquem o desempenho das leveduras. A suplementação nutricional do mosto de fermentação não é usual, visto que o caldo de cana-de-açúcar é considerado um substrato completo para a fermentação. Entretanto, a legislação permite a utilização de substâncias amiláceas, tradicionalmente consumidas como alimentos, para suporte ao início da fermentação (BORTOLETTO; SILVELLO; ALCARDE, 2018; BRASIL, 2022a).

2.2.3. Fermentação

A fermentação do caldo de cana-de-açúcar é considerada uma das etapas de maior impacto nas características físico-químicas e sensoriais da cachaça/aguardente, pois são produzidos os compostos químicos que originarão a bebida durante a fermentação. A fermentação do caldo de cana para a produção de cachaça é a fermentação alcoólica, um

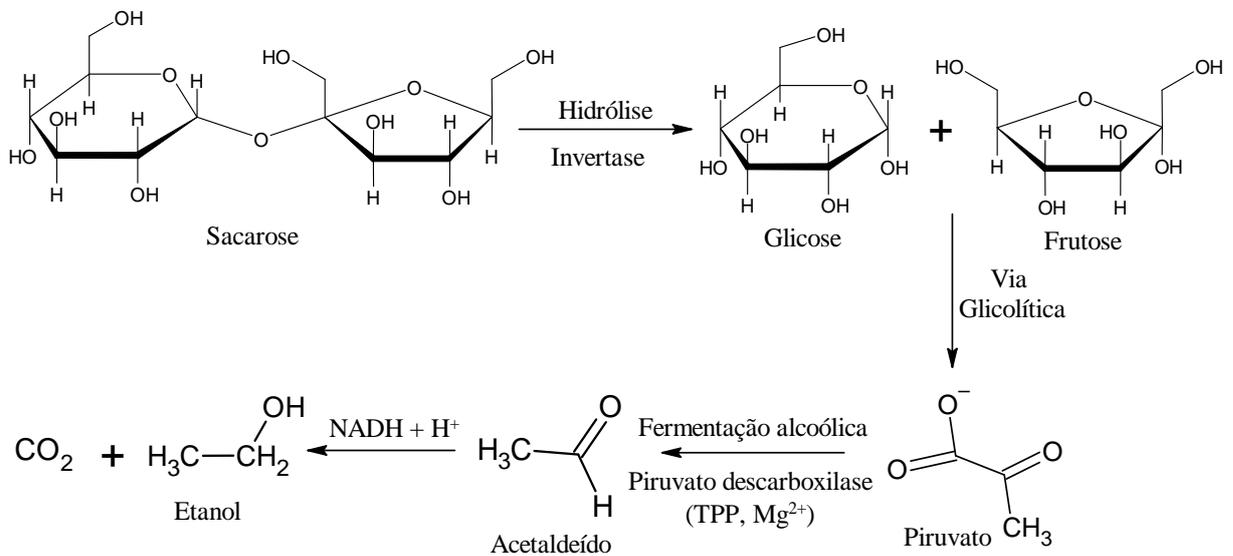
processo de oxidação anaeróbica parcial da glicose. A partir do metabolismo dos microrganismos presentes naturalmente ou adicionados ao mosto, o açúcar é convertido em etanol, gás carbônico e diversos componentes secundários, como álcoois superiores, ésteres, aldeídos, glicerol e ácidos orgânicos (Equação 1), que são responsáveis pelo “*flavour*” característico da bebida. Esses coprodutos, quando presentes em concentrações adequadas, são desejáveis na bebida. Mas, além de compostos desejáveis, o metabolismo das leveduras e de outros microrganismos que estão presentes durante a fermentação também pode proporcionar a produção de compostos indesejáveis ou de seus precursores. O metanol, acroleína, diacetil, álcoois butílico e *sec*-butílico, e o carbamato de etila são alguns contaminantes que têm sua formação relacionada à etapa de fermentação (OLIVEIRA; BORTOLETTO; ALCARDE, 2016; SCHWAN; DIAS, 2020; SILVA; VERRUMA-BERNARDI; OLIVEIRA, 2020).



Fonte: Schwan e Dias (2020).

O caldo de cana, o substrato da fermentação, é rico em sacarose, que é a fonte de carbono. As leveduras utilizadas na fermentação, geralmente *Saccharomyces cerevisiae*, são capazes de sintetizar a invertase, a enzima que hidrolisa esse açúcar em glicose e frutose, sendo a glicose a fonte preferencial para a fermentação. Cada molécula de glicose disponível é convertida em duas moléculas de piruvato através da via glicolítica, por meio de reações catalisadas por diferentes enzimas. As duas moléculas de piruvato são descarboxiladas sob condições anaeróbicas pela ação da enzima piruvato descarboxilase, formando duas moléculas de acetaldeído e duas moléculas de gás carbônico (CO₂). A enzima álcool desidrogenase catalisa a redução das moléculas de acetaldeído em duas moléculas de etanol. O etanol e o CO₂ são os dois principais produtos da fermentação. Já em condições aeróbicas, o piruvato é convertido em acetil-CoA, pela ação da piruvato desidrogenase e encaminhado ao ciclo do ácido cítrico (Figura 2) (ARAÚJO et al., 2018; SCHWAN; DIAS, 2020).

Figura 2 – Via de formação do etanol durante a fermentação alcoólica.



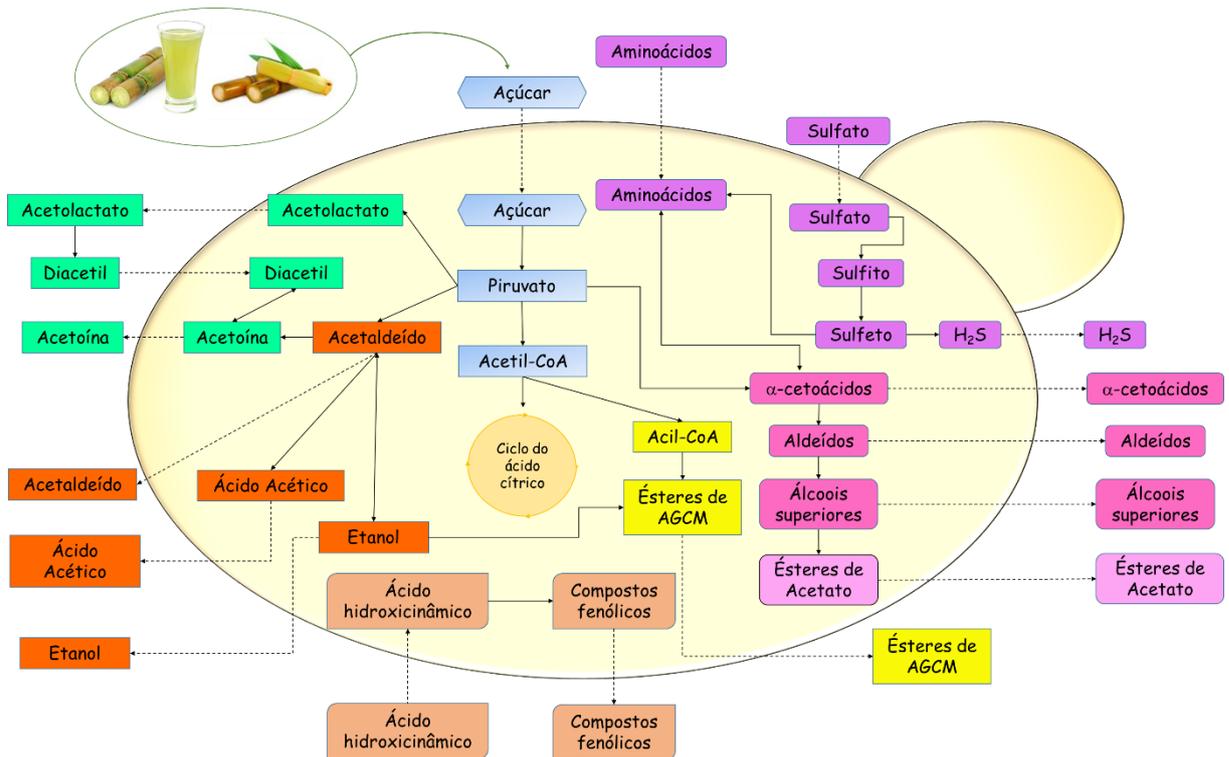
Fonte: Adaptado de Barbosa (2021).

Ao longo da fermentação, as rotas metabólicas da levedura *S. cerevisiae* podem originar diversos compostos secundários voláteis e não voláteis, além do etanol e CO₂, a depender das características do mosto de fermentação. A qualidade nutricional, o pH e a temperatura influenciam e direcionam as rotas metabólicas dos microrganismos presentes no processo fermentativo e determinam quais compostos serão sintetizados. Os compostos não voláteis incluem glicerol, mono e polissacarídeos, compostos fenólicos e ácidos orgânicos. Os compostos voláteis incluem álcoois, aldeídos, acroleína, ésteres, dicarbonil, ácidos graxos de cadeia curta e média, metilcetonas, lactonas, compostos fenólicos e sulfurados, carbamato de etila e terpenos. Como a cachaça/aguardente é uma bebida destilada, os compostos voláteis são os principais responsáveis pelas características sensoriais da bebida final (HIRST; RICHTER, 2016).

Na Figura 3, pode-se observar os diversos compostos voláteis que podem ser sintetizados pelo metabolismo da levedura *S. cerevisiae* e seus principais precursores. A produção desses compostos pode estar associada ao metabolismo primário ou secundário da levedura. O metabolismo primário é essencial para a manutenção e desenvolvimento das células e resulta na produção de etanol, glicerol, acetaldeído e ácido acético, ao passo que o metabolismo secundário é responsável pela produção de substâncias que não são essenciais para

a sobrevivência da levedura, como álcoois superiores, ésteres, compostos carbonílicos, compostos de enxofre, tióis e terpenoides (ARAÚJO, 2018; HIRST; RICHTER, 2016).

Figura 3 – Compostos voláteis que podem ser sintetizados pelo metabolismo da levedura *S. cerevisiae* e influenciam na composição química da cachaça e aguardente de cana-de-açúcar (AGCM: ácidos graxos de cadeia média).



Fonte: Adaptado de Araújo (2018).

Além da levedura *S. cerevisiae*, outros microrganismos podem estar presentes e contribuir para as características do produto final. O mosto de fermentação produzido com o caldo de cana é caracterizado como um ambiente único e de alta competição entre os microrganismos presentes, visto que eles são expostos à alta concentração de etanol e pressão osmótica, e em muitos casos, sem o controle de temperatura ou a reutilização contínua do inóculo. Devido a essas peculiaridades, apesar da predominância da espécie *S. cerevisiae*, ocorre a sucessão de diferentes espécies ao longo de todo o processo fermentativo, como outras espécies desse mesmo gênero (*S. exiguous*, *S. paradoxus*, *S. servazzii* e *S. unisporus*), assim como outros gêneros de leveduras, como *Rhodotorula*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Debaromyces*, *Meyerozyma* e *Hanseniaspora*. Além das leveduras, bactérias também estão presentes durante a fermentação e influenciam nas características do produto final. Os

principais gêneros bacterianos associados à fermentação do caldo de cana para a produção de cachaça são *Micrococcus*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Clostridium* (ARAÚJO et al., 2018; PORTUGAL et al., 2017; SCHWAN et al., 2001).

A qualidade da fermentação é influenciada por diversos fatores, como aeração, concentração de açúcares, acidez (pH), temperatura, nutrientes e a presença de microrganismos contaminantes. Além disso, a forma de condução do processo fermentativo pode variar para cada produtor. Basicamente, é realizado em batelada em dornas de fermentação de aço inoxidável, com duração média 18-30 horas, e com reaproveitamento das células, até a perda de viabilidade. Durante a fermentação, é recomendável o controle da concentração de açúcares, da temperatura (26 °C a 32 °C), do pH e das condições higiênico-sanitárias do processo para alcançar bons rendimentos, geralmente em torno de 8% de etanol, e evitar a proliferação de microrganismos indesejados, como algumas bactérias (COSTA et al., 2021; SCHWAN; DIAS, 2020).

A principal variação na forma de condução da fermentação está associada ao tipo de cultura inicial utilizada, uma vez que muitos produtores, principalmente os de cachaça/aguardente produzidas em alambiques de cobre, utilizam a fermentação natural, com a cultura inicial sendo os próprios microrganismos presentes naturalmente no caldo de cana, ou preparam o seu próprio inóculo a partir de outras matérias-primas. Essa cultura é reconhecida regionalmente como “pé de cuba” ou “fermento-caipira”. Além disso, o caldo de cana adicionado diariamente é uma fonte diversa de leveduras e bactérias que irão participar da fermentação. Ao longo de todo o processo, esses microrganismos se multiplicam, mudam as características do mosto e produzem uma diversidade de compostos secundários. A utilização de cultura inicial natural é única para cada alambique e contribui para características singulares da cachaça produzida (BREXO et al., 2020; COSTA et al., 2021; PORTUGAL et al., 2016).

O preparo do inóculo natural geralmente se inicia junto com a safra. Os produtores utilizam uma pequena quantidade de caldo de cana-de-açúcar, que contém naturalmente linhagens de leveduras e bactérias, e muitos suplementam esse caldo com outras fontes nutricionais, como arroz, fubá, frutas maduras, amido, suco de limão, entre outros. Esse substrato é mantido em repouso por tempo suficiente para que ocorra a fermentação espontânea (12 a 24 horas). Quando se inicia o desprendimento de CO₂, indicando atividade fermentativa, adiciona-se novamente caldo de cana diluído. O processo é repetido até que a concentração celular atinja o volume desejável da dorna de fermentação (ARAÚJO et al., 2018; SCHWAN; DIAS, 2020).

Em contrapartida, em processos em grande escala, como nas destilarias em aço inoxidável, ou quando se deseja uma maior padronização do produto final, há a opção da utilização de cepas selecionadas para a produção de cachaça/aguardente. Essas cepas são isoladas dos processos de fermentação de cachaça/aguardente com base em critérios, como alta capacidade fermentativa, resistência a condições de estresse e qualidade final da bebida produzida. A utilização de cepas selecionadas pode proporcionar rápida fermentação, fácil separação da biomassa do vinho, redução da contaminação e proliferação de microrganismos indesejáveis ao longo do processo, e maior padronização do produto produzido (GONÇALVES et al., 2016; MUTTON et al., 2020; SOARES; SILVA; SCHWAN, 2011).

O isolamento e a identificação de cepas com potencial para utilização como inóculo para a produção de cachaça devem seguir várias etapas e atender a diferentes critérios. As cepas devem ser submetidas a testes morfológicos, bioquímicos e moleculares para detectar isolados com boas características fermentativas e dominância do processo de fermentação natural (SCHWAN; DIAS, 2020). Bernardi et al. (2008) isolaram e identificaram 106 cepas de *S. cerevisiae* provenientes de dez alambiques no sul de Minas Gerais. Esses isolados estão depositados nas coleções de leveduras dos laboratórios de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Lavras (CCMA – Coleção de Culturas da Microbiologia Agrícola). A partir desses resultados, os isolados foram testados quanto à capacidade e velocidade de produção de etanol, utilizando diferentes fontes de carbono (sacarose, glicose e frutose), à produção de glicerol, produção de ácidos orgânicos, álcoois superiores, aldeídos, ésteres e à capacidade de floculação. Dentre esses isolados, aqueles que mais sobressaíram foram selecionados e submetidos à fermentação espontânea em batelada em dornas de 20 L, durante 26 dias consecutivos. Observou-se que três isolados foram predominantes nas dornas de fermentação e produziram bebidas de qualidade. Esses isolados deram origem à levedura selecionada *S. cerevisiae* CA 11, que é disponibilizada no Brasil em sua forma desidratada ativa, podendo ser utilizada prontamente para a fermentação (CAMPOS et al., 2010; SCHWAN; DIAS, 2020).

Diversos estudos relatam a influência da etapa de fermentação nas características da cachaça/aguardente produzida. Portugal et al. (2017) avaliaram as implicações do uso de cepas selvagens e de cepas de leveduras selecionadas na fermentação e observaram que a fermentação natural contribuiu para um perfil físico-químico distinto e de qualidade ao destilado. Também, analisando a utilização de culturas mistas na fermentação do caldo de cana, Amorim, Schwan e Duarte (2016) concluíram que o emprego do inóculo misto de *S. cerevisiae* e *Meyerozyma*

caribbica produzia uma bebida com maior concentração de compostos voláteis associados a bons descritores sensoriais e, conseqüentemente, maior aceitação sensorial. Gonçalves et al. (2016), ao compararem as cachaças obtidas por fermentação espontânea e por linhagens de leveduras selecionadas, constataram que as bebidas produzidas por leveduras selecionadas apresentaram menores valores de acidez volátil e menor variação na composição química. Com o objetivo de verificar os efeitos da utilização de diferentes nutrientes (farinha de milho, farelo de arroz, farinha de milho e farelo de arroz) e do tipo de inóculo (selecionado ou selvagem) durante a fermentação na formação do carbamato de etila, Mendonça et al. (2016) constataram que a bebida produzida com levedura selvagem e farelo de arroz apresentou as maiores concentrações de carbamato de etila.

A etapa de fermentação finaliza quando a concentração de açúcares do mosto esgota-se, momento identificado por meio da determinação do °Brix do vinho, indicando a completa fermentação dos açúcares. Nesse momento, as leveduras presentes no mosto devem estar sedimentadas e permanecerem no fundo da dorna para serem reutilizadas na próxima fermentação. Em seguida, o vinho fermentado é destinado à etapa de destilação para separação dos compostos de interesse que originarão a cachaça/aguardente (CARDOSO, 2020; SCHWAN et al., 2001).

2.2.4. Destilação

O vinho ou mosto fermentado é uma mistura hidroalcoólica com graduação entre 7% a 8% (v/v). A destilação do vinho consiste na separação do etanol e outros compostos voláteis de interesse, baseada na temperatura de ebulição, grau alcóolico e afinidade dos compostos pelo álcool e pela água. O processo ocorre por meio do aquecimento do mosto fermentado, seguido da condensação dos vapores formados, sendo algumas reações químicas induzidas pelo aquecimento, como hidrólise, esterificação e acetilação. O produto final da destilação é a cachaça ou aguardente de cana-de-açúcar, a depender da graduação alcóolica obtida ao final do processo (CARDOSO, 2020; SILVA; VERRUMA-BERNARDI; OLIVEIRA, 2020).

A composição da cachaça/aguardente pode variar de acordo com o processo de destilação utilizado, tendo duas opções: as colunas de fracionamento em aço inoxidável e os alambiques de cobre. Nas colunas de fracionamento, o processo é contínuo e amplamente empregada em grande escala, principalmente no estado de São Paulo. Nesse tipo de processo,

não ocorrem separações das frações “cabeça”, “cauda” e “coração” (BORTOLETTO; SILVELLO; ALCARDE, 2018; CARDOSO, 2020;).

Outra forma de destilação é a realizada em alambiques de cobre. Segundo o MAP, o alambique de cobre para a produção de cachaça é o equipamento de destilação por batelada utilizado para realizar o processo de destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, em que as paredes internas da panela, coluna e capitel são constituídas de cobre e as demais peças podem ser constituídas por materiais adequados para o fim que se destinam (BRASIL, 2022a).

A destilação realizada em alambiques de cobre em batelada, associada a um menor volume de produção, é característica das bebidas produzidas em Minas Gerais. Além disso, é realizada a separação das frações “cabeça”, “cauda” e “coração” nesse processo, e ocorrem reações de sulfetos catalisadas pelo cobre presente no alambique, produzindo bebidas com aromas e sabores diferenciados. Em termos do volume de vinho a ser destilado, a fração cabeça representa 10% do volume inicial do vinho; a fração coração, aproximadamente 60% do vinho; e a fração cauda, 30% do volume do vinho que será destilado. A separação das frações “cabeça” e “coração” geralmente é realizada quando a graduação alcóolica atinge entre 70% a 80% (v/v). Entre as frações “coração” e “cauda”, o corte é feito com a graduação alcóolica entre 35% a 50% (v/v), sendo a fração “coração” aquela que originará a cachaça/aguardente (BORTOLETTO; SILVELLO; ALCARDE, 2018; CARDOSO, 2020; SANTIAGO et al., 2015; ZACARONI et al., 2015a).

A separação das frações proporciona a separação de compostos desejáveis e indesejáveis produzidos durante a fermentação. Compostos mais voláteis, que apresentam maior afinidade por álcool-água, como aldeídos, ésteres, metanol e álcoois superiores, tendem a estar presentes em maiores concentrações na fração de cabeça, ao passo que o ácido acético e o furfural podem ser encontrados em maiores proporções na última fração, que tem como característica apresentar um teor alcoólico reduzido. O corte inadequado das frações, com a presença de cabeça e cauda na fração coração, pode culminar em uma bebida de baixa qualidade sensorial e até mesmo prejudicial à saúde do consumidor, devido à presença de substâncias indesejáveis em concentrações inapropriadas (BORTOLETTO; SILVELLO; ALCARDE, 2018; SANTIAGO et al., 2016).

Segundo Baffa Júnior et al. (2011), a correta separação das frações “cabeça”, “cauda” e “coração”, durante a etapa de destilação, contribui para a redução da concentração do contaminante orgânico carbamato de etila, garantindo a maior qualidade do produto final.

Serafim et al. (2012) também relataram que a separação das frações origina bebidas com melhores características sensoriais, pois o correto corte entre as frações cabeça e coração pode reduzir a presença de compostos químicos que afetam a qualidade físico-química da bebida, como acetato de etila e carbamato de etila. Rodrigues et al. (2020) avaliaram a presença dos contaminantes carbamato de etila, 2,3-butanodiona, furfural e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) em cachaças produzidas por destilação em coluna e em alambique de cobre. Os autores observaram que todas as amostras produzidas em alambiques de cobre estavam dentro dos limites estabelecidos para o carbamato de etila. Além disso, as amostras produzidas por destilação em colunas de aço inox apresentaram concentrações mais altas de 2,3-butanodiona, furfural e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF).

Além da diferença associada ao equipamento de destilação, a bebida pode ser submetida à bidestilação ou redestilação, desde que o produto obtido preserve as características sensoriais próprias dos componentes contidos na matéria-prima e daqueles formados durante a fermentação. A bidestilação é um processo no qual é realizada uma primeira destilação, com a formação de um destilado denominado vinho baixo. O processo é realizado até que todo o álcool do vinho seja extraído, que pode ser identificado pela graduação na saída do condensador próxima de 3% de etanol (v/v). Em seguida, o vinho baixo é submetido a uma nova destilação que, quando é realizada em alambique de cobre, devem ser separadas as frações cabeça, cauda e coração. A redestilação consiste em destilar uma segunda vez o produto já obtido, ou seja, o destilado alcoólico industrial (cachaça ou aguardente), sendo recomendado que o destilado alcoólico seja previamente diluído com água potável para redução da graduação alcoólica para, aproximadamente, 30% (v/v) etanol (ALCARDE, SOUZA; BORTOLETTO, 2012; BRASIL, 2022a; SILVA et al., 2020).

Ao final da destilação, é gerada a vinhaça, também conhecida popularmente como vinhoto, garapão, restilo, entre outros. A vinhaça é um coproduto de baixa graduação alcoólica que acumula as substâncias não voláteis e algumas substâncias voláteis do vinho, como sólidos em suspensão, minerais, biomassa das leveduras, açúcares não fermentescíveis, proteínas, ácidos graxos de cadeia longa, entre outros. Esse coproduto é amplamente utilizado na fertirrigação dos canaviais (CARDOSO, 2020; MATTOS; MARGARIDO; CECCATO-ANTONINI, 2018).

A cachaça/aguardente produzida após a destilação ainda não está pronta para o consumo, sendo recomendado um período de armazenamento de dois a três meses em

recipientes apropriados, e em local protegido para estabilização do “*bouquet*” e obtenção de um produto final de qualidade (CARDOSO, 2020).

2.2.5. Armazenamento e envelhecimento

Após a destilação, a cachaça/aguardente deve ser armazenada em barris de madeira de primeiro uso ou que tenham sido utilizados anteriormente para o armazenamento ou envelhecimento de bebidas, em tanques de materiais adequados para estarem em contato com alimentos, como o aço-inoxidável, ou em tanques de aço carbono com isolamento interno para evitar contaminação ou evaporação da bebida. Esse processo de armazenamento antes do envase é denominado maturação e pode ser utilizado para a classificação da cachaça/aguardente, sendo recomendado um período mínimo de armazenamento de dois a três meses para estabilização da bebida, já que o produto recém-destilado apresenta características sensoriais fortes e acentuado sabor alcóolico (BRASIL, 2022a; CARDOSO, 2020; SILVA; VERRUMA-BERNARDI; OLIVEIRA, 2020).

O armazenamento em barris de madeira não é uma etapa obrigatória no processo de produção de cachaça/aguardente e não há um tempo mínimo estipulado para bebidas armazenadas. A bebida que fica armazenada por um período inferior a um ano não se caracteriza como uma bebida envelhecida; mas o armazenamento contribui para mudanças na característica do produto final, pois altera a composição química, o aroma e o sabor. Já o envelhecimento é uma etapa opcional do processo produtivo da cachaça/aguardente de extrema importância para agregação de valor à bebida. De acordo com a Portaria nº 539, de 2022 do MAP, a cachaça envelhecida é aquela que contém, no mínimo, 50% de cachaça/aguardente envelhecida em recipiente de madeira apropriado, com capacidade máxima de 700 L, por um período não inferior a um ano. A bebida que não é armazenada em barris de madeira durante a maturação, deve ser armazenada em tonéis de material adequado e que não se enquadre nos critérios definidos para o armazenamento e envelhecimento (BORTOLETTO; SILVELLO; ALCARDE, 2018; BRASIL, 2022a; CARDOSO, 2020).

Durante o envelhecimento em barris de madeira, ocorrem diversas interações entre a madeira do barril e a cachaça/aguardente armazenada, como a migração de compostos da madeira para a bebida e reações de oxidações que contribuem para alterações da coloração, do perfil sensorial e da complexidade do “*bouquet*” aromático. Durante o envelhecimento, diversos

compostos como ácidos benzoicos, aldeídos cinâmicos e taninos são extraídos da madeira (BARBOSA et al., 2022a; FERNANDES et al., 2019)

Existem diferentes tipos de madeiras que podem ser utilizadas nos barris de envelhecimento. Apesar do uso do carvalho já estar difundido, existem outras opções que também são empregadas, como amburana, amendoim, jatobá, ipê, bálsamo, peroba, entre outras. A espécie e origem geográfica da madeira, tempo de envelhecimento, tamanho e forma do barril, tratamento de tostagem, acabamento dado pelas tanoarias e tempo de utilização do barril também promovem efeitos diferentes em termos de características sensoriais e físico-químicas da bebida (BORTOLETTO; SILVELLO; ALCARDE, 2021; FERNANDES et al., 2019; SANTIAGO et al., 2016).

Bortoletto, Silvello e Alcarde (2021), com o objetivo de determinar o perfil aromático de aguardentes de cana envelhecidas por 12 meses em barris novos com e sem tosta, elaborados com diferentes madeiras tropicais, constataram que o processo de envelhecimento da bebida nos barris preparados das duas formas aumentou a concentração de compostos fenólicos. Além disso, os autores concluíram que as bebidas envelhecidas em barris de diferentes espécies de madeiras tropicais apresentam diferentes perfis de compostos sensoriais. A bebida envelhecida em barris de cerejeira se destacou das demais, pois apresentou a maior complexidade aromática, conferindo mais de 50 compostos à aguardente armazenada, principalmente ácidos orgânicos e compostos fenólicos.

Para avaliar o efeito da tosta (sem tosta, tosta fraca, tosta média e tosta intensa) em barris de carvalho no perfil físico-químico, quantificação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) e na composição fenólica na cachaça envelhecida, Barbosa et al. (2022a) observaram que o nível de tosta influenciou nos tipos e quantidade de compostos formados e extraídos dos barris pela bebida. Além disso, todas as bebidas apresentaram concentrações de HPA's. Entretanto, a bebida armazenada em barris com tosta média apresentou as maiores concentrações desses compostos.

Além dessas possibilidades de armazenamento, a cachaça e aguardente de cana poderão ser acondicionadas em contato com fragmentos de madeira durante essa etapa, com o objetivo de agregar a bebida características sensoriais próprias da madeira utilizada. Esses fragmentos de madeira devem ter tamanho adequado, que garanta que, no mínimo, 95% da massa fique retida em peneira com malha de 5,0 mm. O material utilizado pode ser natural ou torrado, desde que não tenha sofrido combustão, seja isento de demais tratamentos (químico, enzimático ou

físico), seja isento de substâncias que podem aumentar seu poder aromatizante natural e os compostos fenólicos extraíveis (BRASIL, 2022a).

2.2.6. Envase

Após a etapa de armazenamento ou envelhecimento, a cachaça/aguardente deve ser padronizada e filtrada para, em seguida, ser envasada. A etapa de padronização deve ser realizada quando se deseja que o produto final apresente características específicas definidas, como a redução ou aumento da graduação alcoólica. Para isso, deve-se utilizar água potável ou aguardente/cachaça com graduação alcoólica superior e de boa qualidade para evitar defeitos e contaminação do produto final. Em seguida, a bebida deve seguir para a operação de filtragem. Essa etapa é necessária para garantir que partículas em suspensão (contaminantes físicos) não estejam presentes na bebida final, assim como reduzir a contaminação por cobre nas bebidas produzidas em alambiques constituídos desse material. Para evitar a presença desses contaminantes, devem ser utilizados filtros que retiram sujidades e não alteram as características sensoriais da bebida (BARBOSA et al., 2022b; BORTOLETTO; SILVELLO; ALCARDE, 2018; CARDOSO, 2020).

Em seguida, a cachaça/aguardente está pronta para ser envasada. O envase consiste no acondicionamento da bebida em recipientes de volumes de até 1 L, adequados para a comercialização do produto. A embalagem é extremamente importante para a indústria e desempenha papel fundamental na comercialização e segurança do produto, sendo responsável pela proteção, contenção, comunicação e conveniência. A cachaça e aguardente de cana podem ser envasadas em recipientes que são elaborados por materiais inertes, como o vidro, já que embalagens que apresentam materiais capazes de interagir com compostos da bebida, como alguns plásticos, podem alterar a qualidade físico-química e sensorial do produto ao longo da vida de prateleira (CARDOSO, 2020; MACHADO et al., 2014; SOUZA et al., 2022).

O efeito do armazenamento de cachaças envasadas em embalagens plásticas de polietileno tereftalato (PET) foi investigado por Souza et al. (2022), por meio da determinação de HPA's nas bebidas armazenadas por 4 e 8 meses. Os autores constataram que o envase da bebida em embalagens PET, assim como o aumento do tempo de armazenamento, contribuíram para o acréscimo da concentração de HPA's no produto, indicando que embalagens de material inadequado, quando utilizadas para o armazenamento de cachaça, podem interagir com a bebida e alterar a sua composição físico-química ao longo do armazenamento. Barbosa (2021) também

avaliou os efeitos do armazenamento de cachaças em embalagens PET e relatou que 60% das amostras estavam fora dos Padrões de Identidade e Qualidade para algum composto secundário. Além disso, todas as amostras apresentaram concentrações de HPA's acima do relatado na literatura para cachaça envasada em embalagens de outros materiais.

2.3. Compostos secundários e contaminantes

Durante a fermentação, o açúcar presente no mosto é utilizado para o metabolismo dos microrganismos e produz principalmente etanol e dióxido de carbono. Em menores proporções, os compostos secundários, também denominado de congêneres, também são produzidos. Além da etapa de fermentação, ocorrem reações que contribuirão para formação e aumento das concentrações desses compostos na bebida durante etapas posteriores da cadeia de produção da cachaça/aguardente. A presença dos congêneres em quantidades adequadas é de extrema importância para a qualidade sensorial, pois eles são os responsáveis pelo “*flavour*” característico da cachaça/aguardente. Os compostos secundários são compostos voláteis, como ácidos carboxílicos, ésteres, aldeídos e álcoois superiores (CARDOSO, 2020; OLIVEIRA et al., 2020; PORTUGAL et al., 2017).

Apesar de a presença dos compostos secundários ser desejável na bebida final, a sua concentração deve ser limitada, fato fundamental para manter a qualidade adequada do produto. O excesso de compostos secundários pode estar associado a diversos fatores, como manuseio inadequado da cana-de-açúcar, más condições higiênico-sanitárias do alambique, mosto com baixa qualidade nutricional, contaminação por microrganismos indesejados, condições inadequadas de temperatura, pH e aeração durante a fermentação, entre outros. Devido a isso, o MAP estabeleceu por meio da Portaria nº 539, de 26 de dezembro de 2022, os Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ's) para a cachaça e aguardente de cana-de-açúcar, que delimita a concentração que cada composto deve ter na bebida (Quadro 1) (BRASIL, 2022a; CARDOSO, 2020; RIBEIRO et al., 2017).

O etanol é o principal produto da fermentação do mosto do caldo de cana-de-açúcar realizada pelas leveduras. Entretanto, a sua concentração na bebida final deve estar dentro dos padrões estabelecidos pelos PIQ's (Quadro 1). Concentrações inadequadas de etanol na cachaça pode ser atribuída à fermentação incompleta dos açúcares do mosto, ao corte inadequado das frações nas cachaças destiladas em alambique, a perdas durante o período de armazenamento

devido à evaporação e reações com outros compostos secundários, erros de padronização e embalagens impróprias (BRASIL, 2022a; CARDOSO, 2020; OLIVEIRA et al., 2020).

Quadro 1 – Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ's) exigida pela legislação brasileira para cachaça e aguardente.

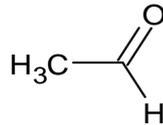
Componente	Unidade	Limite	
		Mínimo	Máximo
Gradação alcoólica (aguardente)	% v/v de álcool etílico a 20 °C	38,0	54,0
Gradação alcoólica (cachaça)	% v/v de álcool etílico a 20 °C	38,0	48,0
Acidez volátil, em ácido acético	mg/100 mL de álcool anidro	-	150,0
Ésteres, em acetato de etila	mg/100 mL de álcool anidro	-	200,0
Aldeídos, em aldeído acético	mg/100 mL de álcool anidro	-	30,0
Furfural	mg/100 mL de álcool anidro	-	5,0
Álcoois superiores*	mg/100 mL de álcool anidro	-	360,0
Congêneres**	mg/100 mL de álcool anidro	200,0	650,0
Butan-2-ol (álcool <i>sec</i> -butílico)	mg/100 mL de álcool anidro	-	10,0
Butan-1-ol (álcool butílico)	mg/100 mL de álcool anidro	-	3,0
Álcool metílico	mg/100 mL de álcool anidro	-	20,0
Acroleína	mg/100 mL de álcool anidro	-	5,0
Carbamato de etila	µg/L	-	210,0
Cobre	mg/L	-	5,0
Açúcares totais (glicose)	g/L	-	≤ 6,0
Açúcares totais (bebida adoçada)	g/L	> 6,0	< 30,0
Fenólicos Totais (bebida envelhecida)	presente		

*Álcoois superiores: isobutílico + isoamílicos + propílico. **Congêneres: acidez volátil + ésteres + aldeídos + furfural + álcoois superiores. Fonte: Brasil (2022a).

Os aldeídos são formados durante a fermentação a partir da ação de leveduras nos estágios iniciais da fermentação, e tende a ser oxidado a ácido acético nas etapas finais, devido, principalmente, à aeração excessiva do mosto. Os PIQ's definem que a concentração de aldeídos na cachaça/aguardente deve ser de até 30 mg/100 mL de álcool anidro (aa) (Quadro 1). O principal aldeído formado é o acetaldeído (Figura 4), que pode representar até 90% dos aldeídos totais. A presença desse aldeído é comum em bebidas fermento-destiladas, pois ele é o último precursor antes da formação do etanol, sendo um dos principais metabólitos intermediários da fermentação, em que o piruvato, o produto final da glicólise, é convertido em

acetaldeído por meio da enzima piruvato descarboxilase (Figura 2). Os demais aldeídos podem ser formados pela oxidação de aminoácidos, dos álcoois superiores ou dos ácidos graxos (BRASIL, 2022a; CARDOSO, 2020; LIMA et al., 2022; SWIEGERS et al., 2005).

Figura 4 – Estrutura química do acetaldeído (etanal).

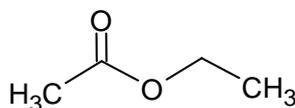


Fonte: Cardoso (2020).

Em altas concentrações, aldeídos podem ser tóxicos ao consumidor, podendo ocasionar problemas relacionados ao sistema nervoso central. Além disso, dependendo da concentração, podem ser responsáveis por aromas desagradáveis. Uma forma de evitar altas concentrações de aldeídos na cachaça/aguardente é realizando a separação da fração “cabeça” do “coração” de forma correta. Em concentrações adequadas, os aldeídos podem ser responsáveis por diversos aromas que dão notas sutis a avassaladoras à bebida, dependendo do teor e do tipo de aldeído (CAETANO et al., 2022; CARDOSO, 2020; LIMA et al., 2022; SANTIAGO et al., 2016).

Os ésteres são os compostos aromáticos que, em baixas concentrações, são responsáveis pelo aroma agradável de frutas; porém, podem conferir um sabor desagradável e enjoativo à cachaça/aguardente em altas concentrações. A legislação define que esses compostos devem estar presentes na bebida em até 200 mg/100 mL aa (Quadro 1). Os ésteres podem ser formados durante a fermentação, a partir do metabolismo secundário das leveduras, em que é produzido principalmente acetato de etila (aproximadamente 80%) (Figura 5); ou durante a destilação e envelhecimento, por reações de esterificação entre os álcoois e ácidos carboxílicos; ou também durante o envelhecimento, período no qual alguns ésteres são formados pela interconversão dos compostos fenólicos, como o siringato de etila e vanilato de etila, e também pela extração da madeira, como o homovanilato de metila e o siringato de metila (BRASIL, 2022a; CARDOSO, 2020; DIAS, 1997; SANTIAGO et al., 2016; VICHI et al., 2007; ZACARONI, 2009).

Figura 5 – Estrutura química do éster acetato de etila.

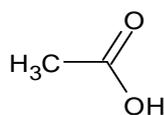


Fonte: Cardoso (2020).

Os ésteres que são formados durante a fermentação são produzidos pelas leveduras em reações de esterificação entre o álcool e ácidos carboxílicos em baixo pH. A reação requer uma molécula de álcool, acetil-CoA e uma enzima sintetizadora de éster, a álcool acetiltransferase (AAT). Os dois principais ésteres produzidos durante a fermentação são acetatos e ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia média (AGCM). Os acetatos são resultados da esterificação de acetil-CoA e um álcool, sendo o acetato de etila o mais encontrado devido às altas concentrações de etanol e à natureza mais reativa dos álcoois primários. Durante a fase de crescimento exponencial tardio, intermediários dos ácidos graxos de cadeia média são liberados prematuramente do complexo citoplasmático de ácido graxo sintase, e essa liberação desencadeia a síntese de éster. Além desses, alguns ésteres, especialmente o lactato de etila, estão ligados à contaminação bacteriana do mosto, como por *Lactobacillus* spp. (HIRST; RICHTER, 2016; WALKER; STEWART, 2016).

Os ácidos carboxílicos também fazem parte dos compostos orgânicos da cachaça/aguardente. Eles são desejáveis, em concentrações reduzidas, pois contribuem para a formação de ésteres a partir de reações de esterificação com álcoois. Mas são responsáveis por um sabor desagradável, em altas concentrações, prejudicando a qualidade da bebida. O limite máximo permitido para acidez volátil na cachaça e aguardente é de 150 mg/100 mL aa (Quadro 1). O principal ácido presente é o ácido acético (Figura 6), sendo o constituinte majoritário da acidez volátil. Altas concentrações desse ácido estão associadas a práticas inadequadas de manuseio da cana-de-açúcar, como estocagem por um longo período, e a contaminação do mosto por bactérias acéticas, devido ao excessivo tempo de descanso entre o processo de fermentação e destilação. Além disso, a presença de ácidos também pode ser relacionada à etapa de envelhecimento, quando pode ocorrer a oxidação do etanol a ácido acético, e a extração de alguns compostos da madeira, como ácidos orgânicos não voláteis, taninos e substâncias fenólicas (BRASIL, 2022a; CARDOSO, 2020; PORTUGAL et al., 2017; SANTIAGO et al., 2016).

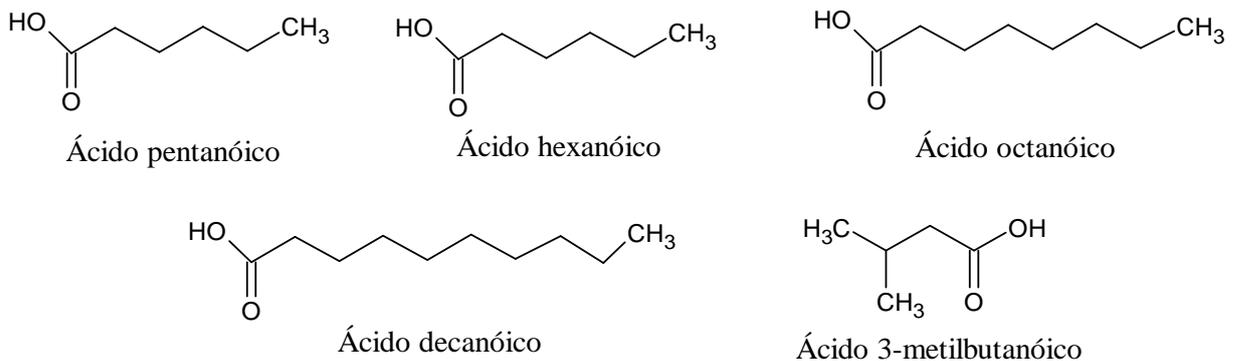
Figura 6 – Estrutura química do ácido acético (ácido etanóico).



Fonte: Cardoso (2020).

Durante a fermentação, além da produção de ácido acético pelo metabolismo de bactérias, esse ácido pode ser produzido pelo metabolismo das leveduras como um intermediário do desvio da piruvato desidrogenase, uma via responsável pela conversão do piruvato em acetil-CoA, por meio de uma série de reações catalisadas pela piruvato descarboxilase, acetaldeído desidrogenase e acetil-CoA sintase (SWIEGERS et al., 2005). Além do ácido acético, ácidos graxos de cadeia média, como o hexanóico, octanoico ou decanoico são produzidos pelas leveduras e constituem o substrato inicial para a formação final dos ésteres etílicos. Entre as leveduras, *S. cerevisiae* é capaz de sintetizar principalmente ácidos hexanoico e octanoico em grandes quantidades, mas também ácidos pentanoico, decanoico e 3-metilbutanoico (Figura 7) (CARPENA et al., 2020).

Figura 7 – Estruturas químicas de alguns ácidos sintetizados pelo metabolismo das leveduras.



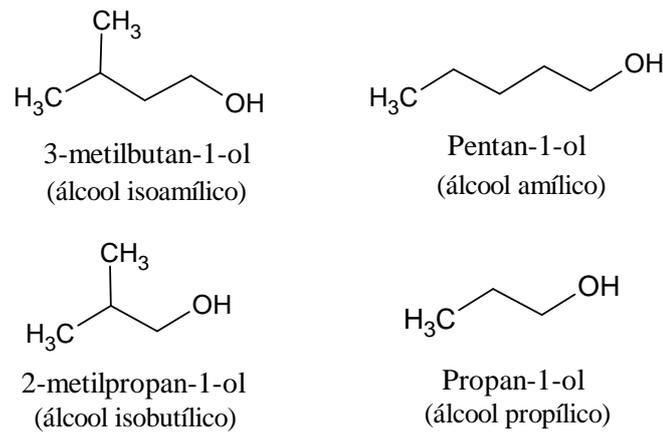
Fonte: Do autor.

Os álcoois superiores são o maior grupo de substâncias voláteis encontradas nas bebidas destiladas e são formados durante o metabolismo natural das leveduras, a partir de aminoácidos ou pela redução de aldeídos no processo de fermentação, sendo afetados pelas condições do meio de fermentação, quantidade e viabilidade do inóculo, pela temperatura, e teor de álcool do mosto, entre outros fatores. Os principais álcoois encontrados em cachaças/aguardentes são álcoois isoamílico (3-metilbutan-1-ol), amílico (pentan-1-ol), isobutílico (2-metilpropan-1-ol) e propílico (propan-1-ol) (Figura 8), que são desejáveis em concentrações adequadas e, juntamente com os ésteres, são responsáveis pelo “*flavour*”, mas em altas concentrações são chamado de óleo fúsel, e diminuem o valor comercial e a qualidade da cachaça/aguardente (CARDOSO, 2020; CRAVO et al., 2019; GONÇALVES et al., 2016; SANTIAGO et al., 2016). Como se pode observar no Quadro 1, o MAP exige que a concentração dos álcoois superiores

isobutílico, isoamílicos e propílico não deva exceder 360 mg/100 mL de álcool anidro na cachaça e aguardente de cana-de-açúcar (BRASIL, 2022a).

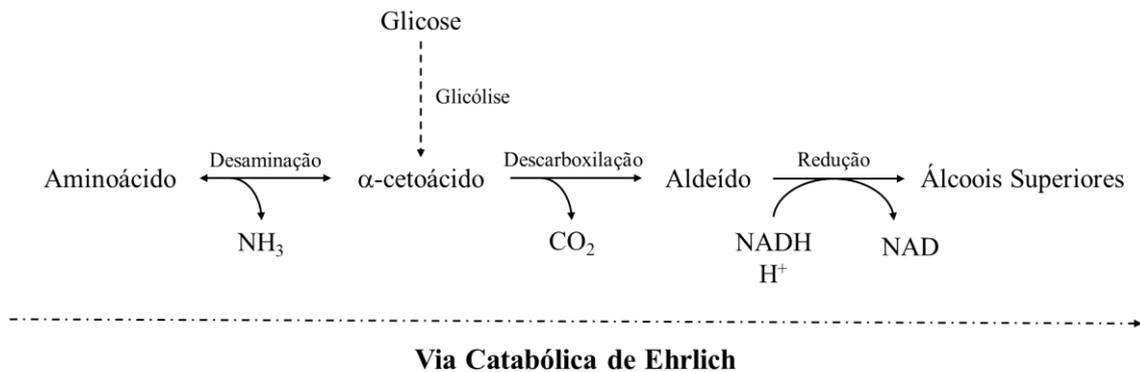
A produção de álcoois superiores durante a fermentação está relacionada à concentração de aminoácidos no mosto e segue a desaminação e descarboxilação de aminoácidos, como a leucina, isoleucina e valina, conhecida como Via de Ehrlich (Figura 9). Essa rota catabólica entra em ação quando há excesso de aminoácidos no meio. Quando esses são deficientes, uma rota anabólica alternativa chamada via de biossíntese torna-se operacional, derivando álcoois superiores de intermediários α -cetoácidos. Outros fatores que contribuem para a formação desses compostos são temperaturas mais altas de fermentação e a presença de leveduras não *Saccharomyces* (SWIEGERS et al., 2005; WALKER; STEWART, 2016).

Figura 8 – Estruturas químicas dos álcoois superiores desejáveis.



Fonte: Cardoso (2020).

Figura 9 – Formação de álcoois superiores a partir da Via Catabólica de Ehrlich.

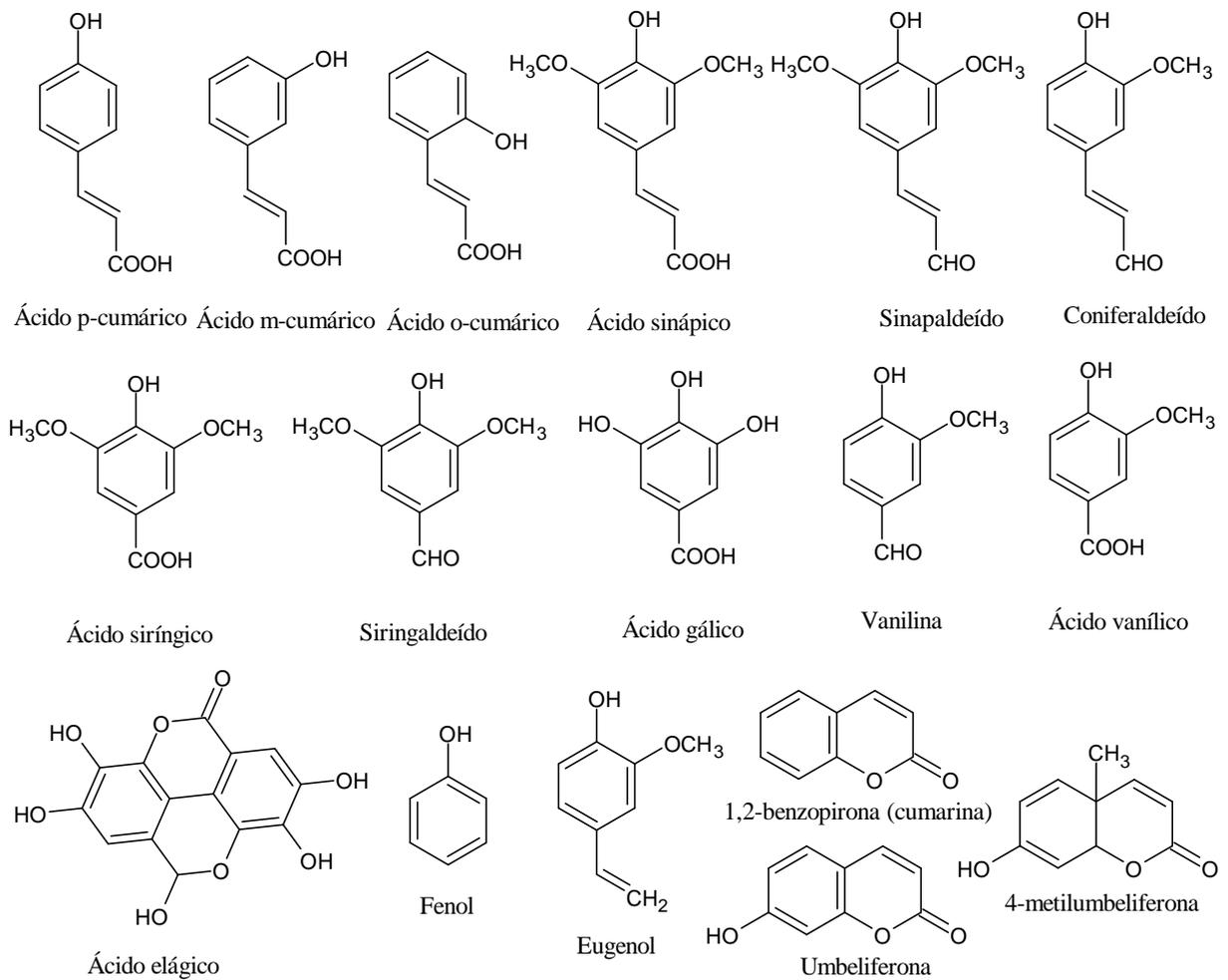


Fonte: Adaptado de Araújo (2018).

Os compostos fenólicos são uma classe de compostos oriundos do processo de armazenamento e envelhecimento da cachaça e aguardente de cana em barris de madeira. Ao longo do período de armazenamento, os compostos fenólicos podem ser incorporados à bebida devido à degradação da lignina, visto que a cachaça/aguardente é uma solução hidroalcoólica com capacidade de extrair diversos compostos da madeira. Entretanto, a concentração e os tipos de compostos fenólicos que estarão presentes na bebida dependem do tipo da madeira, da tosta utilizada na produção do barril, e do processo e tempo de fabricação dos barris. Alguns compostos fenólicos encontrados em cachaça e aguardente envelhecida e armazenada são vanilina, seringaldeído, coniferaldeído, sinapaldeído, ácidos vanílico, gálico, elágico, ferúlico e siringico (Figura 10). A legislação brasileira exige a presença de compostos fenólicos nas cachaças e aguardente de cana-de-açúcar classificadas como envelhecidas, como se pode observar no Quadro 1 (BORTOLETTO; SILVELLO; ALCARDE, 2021; BRASIL, 2022a; CARDOSO, 2020).

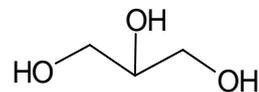
O 1,2,3-propanotriol (glicerol) é um triálcool, como pode ser visto na Figura 11, que pode estar presente na aguardente de cana e na cachaça. O glicerol é um dos produtos majoritários da fermentação alcoólica produzido pelo metabolismo das leveduras, porém, a sua concentração na bebida final tende a ser reduzida, visto que esse composto pode ser degradado durante a fermentação, originando outras substâncias, e ocorre a redução de moléculas de alta temperatura de ebulição na etapa de destilação, como o glicerol, que apresenta uma temperatura de ebulição de 290 °C. Quando a cachaça/aguardente passa pela etapa de armazenamento e envelhecimento em barris de madeira, a concentração de glicerol na bebida pode aumentar. Durante esse processo, ocorrem reações entre o destilado e a madeira, assim como a transesterificação dos triglicerídeos da madeira, que resulta em ácidos graxos e glicerol. Apesar de estar presente na bebida, esse composto orgânico não tem sua concentração delimitada pela legislação nacional (BRASIL, 2022a; CARDOSO, 2020; CARVALHO et al., 2020; TÁBUA et al., 2020).

Figura 10 – Principais compostos fenólicos incorporados à cachaça após o processo de envelhecimento e armazenamento.



Fonte: Adaptado de Santiago (2016) e Zacaroni (2009).

Figura 11 – Estrutura química do 1,2,3-propanotriol (glicerol).



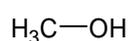
Fonte: Cardoso (2020).

Além desses compostos secundários, que são desejáveis, outros compostos são formados durante as etapas de processamento da cachaça/aguardente. Entretanto, esses compostos são considerados contaminantes da bebida, por apresentarem efeitos maléficos à saúde dos consumidores. Assim, foram estabelecidos pelos PIQ's os limites máximos de alguns desses contaminantes (Quadro 1). Os principais contaminantes encontrados são o metanol e os

álcoois superiores: butílico (butan-1-ol) e *sec*-butílico (butan-2-ol), furfural e HMF, acroleína (propen-2-al), carbamato de etila, e o cobre (BRASIL, 2022a; CARDOSO, 2020).

O metanol ou álcool metílico (Figura 12) é indesejável na cachaça/aguardente, pois a sua ingestão, mesmo que em quantidades reduzidas por um longo período, pode causar cegueira e levar até à morte. Quando presente, a concentração de metanol não deve exceder 20 mg/100 mL aa (Quadro 1). No organismo, a oxidação do metanol origina ácido fórmico e dióxido de carbono, que são responsáveis pela acidose do sangue, ocasionando distúrbios no sistema respiratório. No processo de produção da cachaça/aguardente, o metanol é gerado pela degradação da pectina presente nos bagacilhos da cana-de-açúcar que chegam até as dornas de fermentação, quando não há a filtragem correta do caldo de cana ou pela adição de matérias-primas ricas em pectinas ao mosto. As leveduras são capazes de sintetizar as enzimas pectinolíticas, que são classificadas em esterases e depolimerases (liases e hidrolases). A hidrólise da pectina por liases produz oligo- ou mono-galacturonato, enquanto a hidrólise da pectina por esterases produz ácido péctico e metanol, sendo algumas cepas de *Saccharomyces* capazes de produzir os três tipos de enzimas pectinolíticas. Quando há presença de bagaço de cana-de-açúcar no mosto de fermentação, essa enzima é excretada e hidrolisa a pectina do bagaço, produzindo o metanol (BRASIL, 2022a; CARDOSO, 2020; CRAVO et al., 2019; OHIMAIN, 2016; SANTIAGO et al., 2016).

Figura 12 – Estrutura química do metanol.

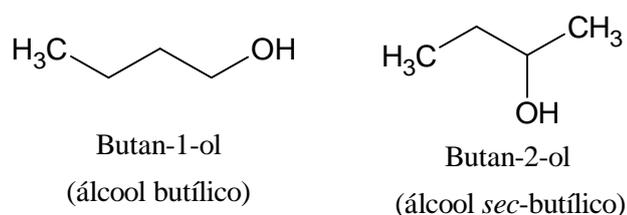


Fonte: Cardoso (2020).

Outros álcoois que também são indesejáveis na cachaça/aguardente são os álcoois superiores butílico (butan-1-ol) e *sec*-butílico (butan-2-ol) (Figura 13). Segundo o MAP, as concentrações máximas desses álcoois devem ser, respectivamente, de até 3,0 e 10,0 mg/100 mL aa (Quadro 1). Esses compostos apresentam alta toxicidade em comparação ao etanol. E são formados pela contaminação do mosto de fermentação pela bactéria *Clostridium acetobutylicum* e bactérias do gênero *Lactobacillus*. O butan-1-ol pode ser formado durante a fermentação devido à contaminação do mosto por bactérias acetobutílicas e pela hidrólise do seu acetato correspondente. O butan-2-ol pode ser formado pelo metabolismo dessas bactérias por redução enzimática do 2,3-butanodiol ou espontaneamente via degradação oxidativa de 2,3-butanodiol. Para reduzir a formação desses compostos, é recomendável evitar que a cana-de-

açúcar seja alocada próxima a estábulos e locais de ordenha para reduzir a contaminação da matéria-prima por esses microrganismos (BRASIL, 2022a; CARDOSO, 2020; DUARTE et al., 2017; LIMA et al., 2022; PORTUGAL et al., 2017; SPAHO et al., 2013).

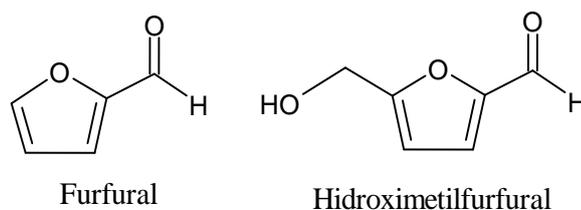
Figura 13 – Estrutura química dos álcoois superiores indesejáveis.



Fonte: Cardoso (2020).

Os aldeídos aromáticos furfural e 5-hidroxiacetilfurfural (Figura 14) são contaminantes da cachaça/aguardente considerados tóxicos e com potencial carcinogênico. A presença desses aldeídos não está associada à etapa de fermentação. Eles são resultantes da desidratação e degradação térmica de pentoses e hexoses, respectivamente, e podem ser formados devido à prática inadequada da queima da cana-de-açúcar, pela presença de resíduos de açúcar e levedura durante o aquecimento na destilação, e durante o processo de envelhecimento da bebida pela ação dos ácidos nas pentoses e seus polímeros (hemiceluloses), que podem estar presentes nos barris de madeira usados para armazenar a bebida. A presença de ácidos e o aumento da temperatura potencializam as reações de formação desses aldeídos, e a redução do teor de sólidos presentes no vinho contribui para minimizar a formação desses compostos. No Quadro 1, pode-se observar o limite máximo de furfural e HMF permitidos na cachaça e aguardente de cana-de-açúcar, 5 mg/100 mL aa. (BRASIL, 2022a; CARDOSO, 2020; FRANCO; SUAREZ; SANTOS, 2017; MASSON et al., 2007; PORTUGAL et al., 2017).

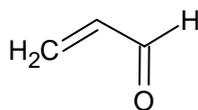
Figura 14 – Estruturas químicas do furfural e 5-hidroxiacetilfurfural.



Fonte: Cardoso (2020).

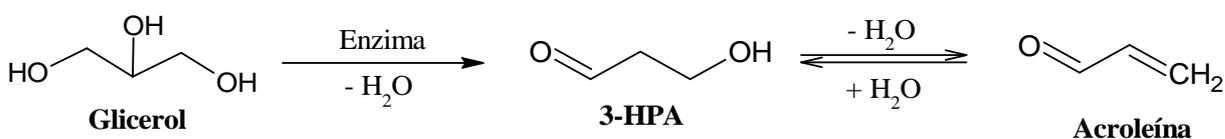
O propen-2-al (acroleína) (Figura 15) é um composto extremamente tóxico por todas as vias de exposição. Devido a isso, a sua concentração na bebida não deve exceder 5,0 mg/100 mL aa (Quadro 1). Entretanto, seu mecanismo de formação ainda não está bem elucidado. No processo de produção de cachaça/aguardente, a formação de acroleína ocorre durante o processo de fermentação por meio da desidratação do glicerol associado a bactérias termofermentativas *Bacillus amaracrylus* e *Lactobacillus colinoides*. O metabolismo dessas bactérias pode converter o glicerol a 3-hidroxi-propionaldeído (3-HPA) em condições anaeróbicas e, em seguida, o 3-HPA é espontaneamente transformado por desidratação térmica em acroleína, sendo esta reação favorecida por baixo pH, altas temperaturas e catalisadores metálicos (Figura 16). A acroleína também pode ser formada a partir de reações químicas que resultam na desidratação do glicerol em condições específicas, como altas temperaturas, meio ácido e catalisadores metálicos. Essas condições podem ser encontradas durante o processo de produção da cachaça, principalmente durante a destilação, a depender das características do vinho a ser destilado. Os ácidos presentes no vinho podem favorecer a protonação do glicerol, com a formação do intermediário 1,3-di-hidroxi-propeno que, após rearranjo ceto-enólico, produz 3-HPA, que pode originar acroleína por desidratação térmica. Acredita-se que o aroma penetrante e apimentado em bebidas recém-distiladas, uísques, conhaques ou rum é causado pela presença de acroleína. Esse composto apresenta características mutagênicas e a exposição prolongada provoca irritação no sistema respiratório de animais e humanos (ABDULLAH et al., 2022; BAUER; COWAN; CROUCH, 2010; BRASIL, 2022a; CARDOSO, 2020; LAGO; WELKE, 2019; LAS HERAS et al., 2020; MASSON et al., 2012).

Figura 15 – Estrutura química do propen-2-al (acroleína).



Fonte: Cardoso (2020).

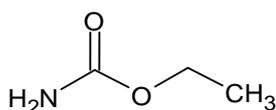
Figura 16 – Formação da acroleína a partir do catabolismo do glicerol.



Fonte: Adaptado de Bauer, Cowan e Crouch (2010).

O carbamato de etila, conhecido como uretana ou etiluretana (Figura 17), também é um composto secundário formado durante o processo de produção da cachaça/aguardente. Do mesmo modo, a origem desse composto ainda não está esclarecida. Alguns autores sugerem que ele pode ser originado pelo metabolismo dos microrganismos durante a fermentação, dependendo do substrato, do tipo de microrganismo empregado e das condições do processo (BORGES et al., 2014; GOWD et al., 2018; RIACHI et al., 2014). Outros pesquisadores sugerem que ele pode ser gerado durante a destilação, dependendo do tipo de destilação que é utilizada (contínua ou descontínua), do material do destilador, da separação das frações e da taxa de refluxo durante o processo (BAFFA JÚNIOR et al., 2011; BORGES et al., 2014; BORTOLETTO; ALCARDE, 2015; BORTOLETTO; SILVELLO; ALCARDE, 2015). Alguns apontam para a formação durante a etapa de envelhecimento em barris de madeira, e do material, condições e tempo de armazenamento (SANTIAGO et al., 2017; ZACARONI et al., 2015a). Existem estudos que relacionam a formação do carbamato de etila com a matéria-prima e composição do mosto de fermentação (BORTOLETTO; SILVELLO; ALCARDE, 2015; CRAVO et al., 2019; GALINARO et al., 2015; MENDONÇA et al., 2016). O limite máximo de carbamato de etila permitido para cachaça e aguardente de cana é de 210 µg/L (Quadro 1) (BRASIL, 2022a).

Figura 17 – Estrutura química do carbamato de etila.

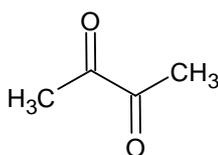


Fonte: Cardoso (2020).

Outros contaminantes orgânicos, que não são regulamentados pela legislação vigente, podem estar presentes na cachaça/aguardente de cana. O diacetil (2,3-butanodiona) (Figura 18), também denominada de dicetona vicinal, é um subproduto da fermentação alcoólica devido ao metabolismo inadequado do piruvato. Pode ser produzido por leveduras do gênero *Saccharomyces* como o produto resultante da descarboxilação oxidativa do α -acetolactato fora da célula de levedura e, então, é reabsorvido pela célula da levedura e convertido em acetoína e, posteriormente, a 2,3-butanodiol pela ação da 2,3-butanodiol desidrogenase e outra(s) enzimas não totalmente caracterizada(s). Alguns gêneros de bactérias, como *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Bacillus*, também são capazes de produzir diacetil durante a fermentação

malolática. Apesar de o diacetil ser geralmente reconhecido como seguro, em inglês “*Generally Recognized As Safe*” (GRAS), em concentrações inadequadas (acima do limiar do odor), esse composto pode ser responsável por características sensoriais indesejadas para cachaça e aguardente, como aroma de amanteigado (CARDOSO, 2020; LI et al., 2020; RODRIGUES et al., 2020; SHIN et al., 2020).

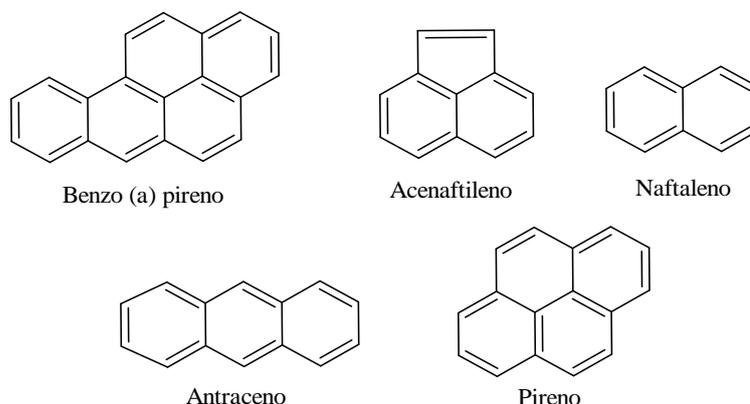
Figura 18 – Estrutura química da 2,3-butanodiona (diacetil).



Fonte: Cardoso (2020).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) são compostos caracterizados por possuir dois ou mais anéis aromáticos condensados e também são contaminantes que podem estar presentes na cachaça/aguardente de cana. Esses compostos podem ser formados por processos naturais ou artificiais por meio da degradação térmica de matéria orgânica. Algumas substâncias desse grupo de contaminantes são considerados tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos. Durante os processamentos térmicos, pode ocorrer a formação de radicais a partir da degradação de estruturas orgânicas. Esses radicais podem reagir entre si para formar estruturas cíclicas, que possuem alta estabilidade e, em contato com o organismo humano, podem se ligar permanentemente ao DNA e causar alterações nas células. Entretanto, apesar da potencial toxicidade, as concentrações desses contaminantes ainda não são delimitadas pela legislação vigente para a cachaça e aguardente. A presença dos HPA's nas bebidas pode ser atribuída à qualidade do ar atmosférico da região de localização da unidade produtora, à queima da cana-de-açúcar antes da colheita, ao contato da matéria-prima com lubrificantes dos equipamentos, assim como aos materiais dos equipamentos e utensílios que entram em contato com o produto ao longo do processamento e armazenamento (ABRANTES, 2022; BARBOSA et al., 2022a; SOUZA et al., 2022; CARDOSO, 2020). Algumas estruturas de HPA's estão apresentadas na Figura 19.

Figura 19 – Estruturas químicas de alguns exemplos de HPA's.



Fonte: Cardoso (2020).

Além desses compostos orgânicos indesejados, alguns íons metálicos também podem ser responsáveis pela contaminação da cachaça/aguardente, como o cobre. Essa fração inorgânica pode ser oriunda do processo de produção, a depender do tipo de equipamento utilizado. O limite máximo permitido na bebida para o cobre está estabelecido nos PIQ's, como pode ser observado no Quadro 1 (BRASIL, 2022a; CARDOSO, 2020).

O cobre é o principal metal constituinte dos alambiques, e apesar de ser considerado um contaminante, a sua presença durante a etapa de destilação é de extrema importância para eliminação de odores desagradáveis derivados da presença de compostos sulfurados, que podem ser observados em cachaça/aguardente destilada em colunas de aço-inoxidável. O teor máximo de cobre na bebida não deve ultrapassar 5,0 mg/L. A contaminação da bebida com o cobre ocorre durante o processo de destilação da bebida, quando os vapores ácidos transportam o carbonato básico de cobre $[\text{CuCO}_3\text{Cu}(\text{OH})_2]$ formado nas paredes internas do alambique até o destilado final. A presença de cobre na cachaça/aguardente pode ser evitada por procedimentos simples, como a assepsia adequada do alambique após a destilação, a separação entre as frações “cabeça” e “coração”, e pela filtragem da cachaça/aguardente recém-destilada utilizando resinas adsorventes para a remoção de cobre (BARBOSA et al., 2022b; BRASIL, 2022a; CARDOSO, 2020; DUARTE et al., 2017).

Além dos filtros de resina tradicionais, existem estudos que relatam a eficiência de opções de adsorventes alternativos obtidos de fontes naturais. Barbosa et al. (2022b) investigaram o uso da fibra de coco como adsorvente de cobre na cachaça e observaram que a biomassa tem potencial para ser utilizada para essa finalidade, pois foi eficiente na remoção do cobre e gerou apenas pequenas alterações na composição físico-química da bebida. Utilizando

argila e carvão ativado como adsorventes para a remoção de cobre de cachaças, Zacaroni et al. (2015b) constataram que a argila apresenta alta especificidade para a remoção dos íons de cobre, sem redução significativa na concentração de congêneres.

2.4. Metodologias de identificação da microbiota

A microbiota ou microbioma é um ecossistema dinâmico que envolve diversas interações entre os microrganismos e o ambiente em que estão inseridos. A microbiota responsável pela produção de alimentos e bebidas fermentadas estão associados ao ambiente de processamento, matérias-primas e aos próprios produtos, devendo ser equilibrada, para permitir a obtenção de produtos seguros e de alto padrão de qualidade, sendo fundamental para impressão de características organolépticas distintas e específicas nos alimentos e bebidas fermentadas (SABATER et al., 2021).

A microbiota presente no processo de produção da cachaça/aguardente de cana-de-açúcar tem influência significativa na qualidade físico-química e sensorial do produto final. Alguns estudos relatam que a fermentação para a produção de cachaça é um processo complexo e de grande diversidade microbiológica, com a presença de leveduras e bactérias. Durante toda a safra, a diversidade dos microrganismos presentes no processo é influenciada pela incorporação de diferentes espécies oriundas da colheita da cana-de-açúcar, transporte e moagem dos colmos, adição de água para padronização do mosto, ambiente de fermentação e fermento utilizado (GOMES et al., 2010; GUARDADO et al., 2022; SEQUINO et al., 2022).

Há diversos estudos “*in vitro*” que relatam a influência da microbiota nas características físico-químicas e sensoriais da bebida produzida, como o realizado por Portugal et al. (2017), objetivando investigar em laboratório a influência de diferentes espécies de leveduras nativas em comparação com outras cepas comerciais, no perfil químico da cachaça. Os autores constataram que a fermentação espontânea contribui para um perfil químico distinto e de qualidade ao destilado.

Realizando uma fermentação com aumento gradual da concentração do mosto de cana-de-açúcar para produção de cachaça, com o intuito de observar a influência da diversidade microbiana nas características organolépticas da bebida produzida, Portugal et al. (2016) concluíram que os microrganismos envolvidos na fermentação têm impactos na qualidade química do produto produzido, podendo contribuir de forma positiva e negativa para a qualidade do produto final.

Duarte, Amorim e Schwan (2013) avaliavam o efeito da cocultura de *Pichia anomala* UFLA CAF70, *P. anomala* UFLA CAF119 e *Pichia caribbica* UFLA CAF733, com *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA11 na fermentação para a produção de cachaça, observando que melhorias claras poderiam ser obtidas no processo de fermentação com cultura mista, em vez de culturas puras de *S. cerevisiae*. Mostraram que essa forma de fermentação pode ser uma alternativa para melhorar a qualidade da cachaça. Anteriormente, Duarte et al. (2011) avaliaram o efeito “*in vitro*” de coinoculação de *Lactobacillus fermentum* com *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA11 sobre a qualidade da cachaça (aguardente de cana-de-açúcar) e observaram que a coinoculação da levedura com a bactéria influenciou na qualidade química e sensorial final da bebida.

Entretanto, são escassos os trabalhos que relatam sobre a diversidade microbiota da produção de cachaça observada em campo, coletando amostras diretamente dos alambiques produtores. Schwan et al. (2001) realizaram um estudo para descrever e detalhar a variabilidade das populações microbianas do processo de produção de cachaça em quinze destilarias do sul de Minas Gerais. Os autores constataram que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi a levedura predominante, mas *Rhodotorula glutinis* e *Candida maltosa* foram predominantes em três casos. A infecção bacteriana foi um problema potencial, e em alguns casos, alcançou uma relação leveduras:bactérias de 10:1 ou menos. Os autores utilizaram métodos de cultivo para a contagem e identificação dos microrganismos, e a maioria dos isolados foi caracterizada por métodos fisiológicos e morfológicos padrão envolvendo 77 testes. Apenas a espécie predominante *S. cerevisiae* foi identificada pela caracterização preliminar usando um método de *Polimerase Chain Reaction* (PCR).

Para que seja possível a realização de trabalhos que avaliam a influência da microbiota na qualidade do produto final, são necessárias a identificação e a caracterização por técnicas específicas. Há uma gama de métodos disponíveis para identificação de microrganismos em alimentos e bebidas, como os métodos de cultura convencional, protocolos imunológicos, métodos moleculares e métodos espectroscópicos. A escolha do método deve ser baseada nas características das amostras, disponibilidade de material e equipamentos, custos e objetivos (FERONE et al., 2020).

O método tradicional de cultivo de cultura é um dos métodos mais utilizados para isolamento e identificação de microrganismos. É um método constituído por diversas etapas, incluindo contagem, isolamento e identificação. Para contagem e isolamento, é necessária a preparação das amostras, enriquecimento, diluição, plaqueamento, contagem e isolamento de

colônias de espécies únicas para posterior caracterização. Em seguida, deve-se seguir para a etapa de identificação que se baseia na estrutura morfológica, bioquímica, fisiológica (fenótipo) e/ou características genéticas (genótipo) do microrganismo usando uma diversidade de abordagens (FERONE et al., 2020; SABATER et al., 2021).

O método de cultivo é uma técnica de relativa confiabilidade, baixo custo, boa eficiência, variabilidade de aplicação e sensibilidade, sendo uma etapa necessária também para determinar a viabilidade e validar as previsões do fenótipo com base na análise genômica. Entretanto, é uma técnica trabalhosa e demorada, visto que são necessários longos períodos de preparo de amostra, crescimento dos microrganismos, execução de testes bioquímicos e rigoroso cuidado em relação à assepsia para evitar a contaminação. Além disso, métodos dependentes de cultura permitem o estudo apenas dos microrganismos cultiváveis nos meios de cultura disponíveis, correndo o risco de não se ter uma visão real da biodiversidade da população microbiana, sendo deficientes para a completa caracterização da microbiota e falhos para detecção de algumas espécies e gêneros (GALIMBERTI et al., 2015; LOPÉZ, BAQUERA, VIVEROS, 2020).

A espectrometria de massas (EM) é uma técnica analítica precisa baseada na identificação e quantificação de compostos químicos ionizados a partir da determinação da relação massa/carga (m/z) desses compostos. A técnica de espectrometria de massas se desenvolveu ao longo dos anos, permitindo a ampliação da gama de aplicações, como o surgimento da técnica Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI), que permitiu a aplicabilidade da EM para grandes moléculas, como as proteínas. Essa técnica permite a análise de uma matriz constituída por uma solução orgânica com alta capacidade de absorção de energia. A matriz se cristaliza ao secar, assim como a amostra que fica cristalizada e aprisionada dentro da matriz. Ao receber um feixe de laser, a amostra é ionizada, gerando íons protonados isoladamente a partir dos analítos da amostra. Esses íons são separados dos demais íons baseados em suas diferenças da relação entre a massa e a carga (m/z). Os analítos carregados são detectados e medidos usando diferentes analisadores, como o analisador de tempo de voo (*time of flight*) (TOF), o principal para aplicações microbiológicas. Nessa técnica, um espectro característico conhecido como Impressão Digital em Massa de Peptídeos (*Peptide Mass Fingerprinting*) (PMF) é gerado para os analítos da amostra com base nas informações do TOF. A identificação microbiana usando MALDI-TOF envolve a comparação do PMF do microrganismo desconhecido com o PMF contido no banco de dados, ou comparando a massa do biomarcador do microrganismo desconhecido com o banco de dados de referência do

proteoma (FERONE et al., 2020; JANG; KIM, 2018; SINGHAL et al., 2015; VALENTE, SOUZA, 2020;).

Dentre as vantagens da espectrometria de massas MALDI-TOF, cita-se que essa técnica permite a obtenção de resultados rápidos e confiáveis para a identificação de diversos microrganismos, incluindo bactérias, fungos e leveduras, pois apresenta elevada sensibilidade, exatidão e precisão. Porém, a principal limitação do método está na identificação do espectro característico de cada espécie, que é obtido a partir da comparação com um banco de dados (espectro de referência), que pode ser limitado em determinados laboratórios e para novos microrganismos. Além disso, há a necessidade do cultivo prévio dos microrganismos, o que acarreta as mesmas limitações dos métodos tradicionais de cultivo (HAN; JEONG; CHOI, 2021; VALENTE; SOUZA, 2020).

Para monitorar o inóculo misto de leveduras durante o processo fermentativo para a produção de cachaça, Amorim, Schwan e Duarte (2016) utilizaram a técnica MALDI-TOF MS, que se mostrou adequada e eficiente na identificação das leveduras *S. cerevisiae* e *M. caribbica*, tanto para culturas puras como para culturas mistas.

As análises baseadas no sequenciamento do DNA, como a metagenômica, são metodologias utilizadas para analisar a diversidade de genomas microbianos em amostras ambientais a partir de técnicas de biologia molecular. Os métodos moleculares permitem analisar a diversidade microbiana sem a dependência de técnicas de cultivo, permitindo a obtenção de informações mais completas e precisas sobre os genomas microbianos. Esses métodos são baseados principalmente na análise de macromoléculas, como o ácido desoxirribonucleico (DNA), que permitem a identificação dos microrganismos presentes na microbiota sem a necessidade de cultivá-los (LOPÉZ, BAQUERA, VIVEROS, 2020; SABATER et al., 2021).

As etapas para realização da análise metagenômica consistem na extração do DNA presente na amostra, seguido da amplificação dos fragmentos de DNA de interesse (*amplicons*) a partir da PCR e posterior separação usando eletroforese ou técnicas cromatográficas. Após essas etapas, os *amplicons* extraídos das amostras são sequenciados, e as leituras são comparadas a bancos de dados de referências para identificação das Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs). A partir desse método, é possível estimar a abundância relativa dos microrganismos presentes na microbiota, baseado no número de *reads* (sequência de fragmentos de pares de bases) associado a um determinado táxon. Esse táxon será proporcional aos seus níveis na amostra. A escolha da região de interesse do DNA depende dos gêneros que

se deseja identificar. O gene 16S rRNA é considerado um marcador universal para tipagem a nível de espécie para bactérias, pois possui propriedades específicas, como estar presente em todas as espécies bacterianas, conter informações suficientes para diferenciar espécies (1500 pb de comprimento) e, em alguns casos, possibilita até a diferenciação de cepas. Já para identificação de fungos filamentosos e leveduras, o alvo mais utilizado é o Espaçador Transcrito Interno (*Internal Transcribed Spacer*) (ITS). Entretanto, o comprimento de ITS desigual entre as espécies de fungos pode levar à amplificação preferencial de fragmentos mais curtos, distorcendo os resultados. Apesar dessa limitação, o ITS é considerado o banco de dados mais completo para fungos, sendo o mais utilizado (CHEN; CHEN; LEI, 2017; FILIPPIS; PARENTE; ERCOLINI, 2018; GALIMBERTI et al., 2015; RIZO et al., 2020).

Não há trabalhos que utilizam a técnica de sequenciamento do DNA para caracterização da microbiota presente no processo de produção de cachaça e aguardente de cana-de-açúcar. Entretanto, a técnica já é utilizada para outras bebidas fermentadas. Citam-se as pesquisas realizadas por Hong et al. (2016) para investigar a influência da composição microbiana na qualidade do vinho de arroz chinês, utilizando o sequenciamento de alto rendimento de 110 amostras de vinho no gene bacteriano 16S rRNA e no fúngico *Internal Transcribe Spacer II* (ITS2). Os autores concluíram que o metabolismo dos microrganismos influencia na qualidade do vinho, sendo o cultivo de microrganismos benéficos e a inibição dos indesejados importantes para a produção de uma bebida de qualidade e segura para o consumo.

Com o intuito de avaliar os efeitos da microbiota presente na fermentação do vinho de arroz coreano nas alterações das características físico-químicas da bebida produzida, Song, Lim e Baik (2022) utilizaram métodos dependentes e independentes de cultura. Os autores observaram que *S. cerevisiae* e *Saccharomycopsis fibuligera* foram dominantes em todos os estágios da fermentação, mesmo em altas concentrações de etanol. Apesar dessa dominância, outras espécies de leveduras estiveram presentes ao longo da fermentação. Além disso, a composição de compostos voláteis da bebida é influenciada pela microbiota e apresentou diferenças significativas entre alguns produtos analisados.

A dinâmica das comunidades microbianas durante a fermentação e os possíveis papéis dos microrganismos na determinação da qualidade e sabor do saquê foi investigada por Nguyen et al. (2022), usando análise metagenômica amplificando a região do gene 16S rRNA e ITS. Os autores observaram que, através de diversas vias biossintéticas, *Aerococcus* e outras bactérias funcionais podem contribuir para o sabor do saquê.

Pesquisas realizada por Fentie et al. (2022) com comunidades bacterianas e fúngicas de amostras de 21 *Tej* (fermentado de mel etíope) de diferentes áreas da Etiópia foram estudadas usando sequenciamento de amplicon 16S rRNA e ITS. Foi observado que, na fermentação espontânea, é difícil o controle e previsibilidade do processo fermentativo. As amostras coletadas em diferentes áreas apresentaram uma comunidade bacteriana com uma variação considerável, mas com predominância de bactérias lácticas, assim como a predominância de leveduras do gênero *Saccharomyces*, com uma menor riqueza de espécies em relação à comunidade fúngica para todas as amostras.

REFERÊNCIAS

- ABRANTES, A. P. **Identificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em cachaça mantida em embalagens de poli(tereftalato) de etileno, sob diferentes condições de armazenamento.** 2022. 112 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2022.
- ALCARDE, A. R.; SOUZA, L. M.; BORTOLETTO, A. M. Ethyl carbamate kinetics in double distillation of sugar cane spirit. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 118, n. 1, p. 27-31, 2012.
- ALVES, T. M. et al. Influência do tratamento térmico do caldo de cana no desenvolvimento do processo fermentativo e na composição química da cachaça. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, p. e2017126, 2018.
- AMORIM, J. C.; SCHWAN, R. F.; DUARTE, W. F. Sugar cane spirit (cachaça): Effects of mixed inoculum of yeasts on the sensory and chemical characteristics. **Food Research International**, v. 85, p. 76–83, jul. 2016.
- ARAÚJO, T. M. **Análises genômicas para otimização da produção de compostos aromatizantes por estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* isolada de produção de cachaça.** 2018. 202 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.
- ARAÚJO, T. M. et al. Cachaça yeast strains: alternative starters to produce beer and bioethanol. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 111, n. 10, p. 1749-1766, 2018.
- BABU, D. K. S. et al. A short review on sugarcane: its domestication, molecular manipulations and future perspectives. **Genetic Resources and Crop Evolution**, p. 1-21, 2022.
- BAFFA JÚNIOR, J. C. et al. Ethyl-carbamate determination by gas chromatography-mass spectrometry at different stages of production of a traditional Brazilian spirit. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1383–1387, 2011.
- BARBOSA, R. B. et al. Physical–Chemical Profile and Quantification of Phenolic Compounds and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Cachaça Samples Aged in Oak (*Quercus* sp.) Barrels with Different Heat Treatments. **Food and Bioprocess Technology**, v. 15, n. 9, p. 1977-1987, 2022a.
- BARBOSA, R. B. et al. Kinetic, thermodynamic and physical-chemical study of the removal of copper from cachaça using coconut fibers. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 39, n. 9, p. 1544-1554, 2022b.
- BARBOSA, R. B. **Chemical composition of and quantification of PAHs in cachaças commercialized in pet bottles and in cachaças aged in oak (*Quercus* sp.) casks with different thermal treatments.** 2021. 87 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2021.
- BAUER, R.; COWAN, D. A.; CROUCH, A. Acrolein in wine: Importance of 3-hydroxypropionaldehyde and derivatives in production and detection. **Journal of Agricultural**

and **Food Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 3243-3250, 2010.

BERNARDI, T. L. et al. *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with the production of cachaça: identification and characterization by traditional and molecular methods (PCR, PFGE and mtDNA-RFLP). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 2705-2712, 2008.

BORGES, G. B. V. et al. Selected *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains and accurate separation of distillate fractions reduce the ethyl carbamate levels in alembic cachaças. **Food Control**, v. 37, n. 1, p. 380–384, 2014.

BORTOLETTO, A. M.; SILVELLO, G. C.; ALCARDE, A. R. Aromatic profiling of flavor active compounds in sugarcane spirits aged in tropical wooden barrels. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 24, 2021.

BORTOLETTO, A. M.; SILVELLO, G. C.; ALCARDE, A. R. Good manufacturing practices, hazard analysis and critical control point plan proposal for distilleries of cachaça. **Scientia Agricola**, v. 75, p. 432-443, 2018.

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

BORTOLETTO, A. M.; SILVELLO, G. C.; ALCARDE, A. R. Chemical and microbiological quality of sugar cane juice influences the concentration of ethyl carbamate and volatile congeners in cachaça. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 121, n. 2, p. 251–256, 2015.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 539, de 26 de dezembro de 2022**. Diário Oficial [da] União, Seção I, p.13. Brasil, DF, 27 de dez. 2022a.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Anuário da Cachaça 2021**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/AECS, 2022b, 29p.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento; **Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005**. Diário Oficial [da] União, Seção I, p. 3-3, Brasil, DF, 30 de jun. 2005.

BREXO, R. P. et al. Yeasts from indigenous culture for cachaca production and brewer's spent grain: Biodiversity and phenotypic characterization for biotechnological purposes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 124, p. 107-120, 2020.

CAETANO, D. et al. Descriptive screening and lexicon development of non-aged artisanal cachaça sensorial profile using principal component analysis and Kohonen artificial neural networks. **Journal of Sensory Studies**, v. 36, n. 3, p. e12645, 2022.

CAMPOS, C. R. et al. Features of *Saccharomyces cerevisiae* as a culture starter for the production of the distilled sugar cane beverage, cachaça in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 6, p. 1871-1879, 2010.

CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana**. 4. ed. Lavras: Editora UFLA, 2020. 444 p.

CARPENA, M. et al. Secondary aroma: Influence of wine microorganisms in their aroma

profile. **Foods**, v. 10, n. 1, p. 51, 2020.

CARVALHO, D. G. et al. Determination of the concentration of total phenolic compounds in aged cachaça using two-dimensional fluorescence and mid-infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 329, p. 127142, 2020.

CHEN, D. et al. Ethyl carbamate in alcoholic beverages from China: Levels, dietary intake, and risk assessment. **Food Control**, v. 72, p. 283–288, 2017.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. Brasília, DF, v. 9, n. 2, agosto 2022.

COSTA, A. C. T. et al. Complete genome sequence and analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* strain used for sugarcane spirit production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 1087-1095, 2021.

CRAVO, F. D. et al. Composition of Cachaças Produced from Five Varieties of Sugarcane and the Correlation of the Presence of Dhurrin in the Cane with That of Ethyl Carbamate in the Product. **American Journal of Plant Sciences**, v. 10, n. 02, p. 339–350, 2019.

DIAS, S. M. B. C. **Efeito de diferentes tipos de madeira sobre a composição físico-química da aguardente de cana envelhecida**. 1997. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

DUARTE, F. C. et al. Brazilian organic sugarcane spirits: Physicochemical and chromatographic profile. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 48, n. 2, p. 288–295, 2017.

DUARTE, W. F.; AMORIM, J. C.; SCHWAN, R. F. The effects of co-culturing non-*Saccharomyces* yeasts with *S. cerevisiae* on the sugar cane spirit (cachaça) fermentation process. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 1, p. 175-194, 2013.

DUARTE, W. F. et al. Effect of co-inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus fermentum* on the quality of the distilled sugar cane beverage cachaça. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 9, p. C1307-C1318, 2011.

FENTIE, E. G. et al. Physicochemical properties, antioxidant activities and microbial communities of Ethiopian honey wine, Tej. **Food Research International**, v. 152, p. 110765, 2022.

FERNANDES, D. D. S. et al. Simultaneous identification of the wood types in aged cachaças and their adulterations with wood extracts using digital images and SPA-LDA. **Food Chemistry**, v. 273, n. February 2018, p. 77–84, 2019.

FERONE, M. et al. Microbial detection and identification methods: Bench top assays to omics approaches. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 6, p. 3106-3129, 2020.

FILIPPIS, F.; PARENTE, E.; ERCOLINI, D.. Recent past, present, and future of the food microbiome. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 9, p. 589-608, 2018.

FRANCO, M.; SUAREZ, W. T.; SANTOS, V. B.. Digital image method smartphone-based for furfural determination in sugarcane spirits. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 2, p. 508-515, 2017.

GALIMBERTI, A. et al. Emerging DNA-based technologies to characterize food ecosystems. **Food Research International**, v. 69, p. 424-433, 2015.

GALINARO, C. A. et al. Cyanate as an active precursor of ethyl carbamate formation in sugar cane spirit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 33, p. 7415–7420, 2015.

GOMES, F. C. O. et al. Identification of lactic acid bacteria associated with traditional cachaça fermentations. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 486-492, 2010.

GONÇALVES, R. C. F. et al. Compostos voláteis em cachaças de alambique produzidas por leveduras selecionadas e por fermentação espontânea. **Magistra**, v. 28, n. 3, p. 285–293, 2016.

GOWD, V. et al. Ethyl carbamate: An emerging food and environmental toxicant. **Food Chemistry**, v. 248, n. December 2017, p. 312–321, 2018.

GUARDADO, R. T. et al. Microbial interactions in alcoholic beverages. **International Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 1-15, 2022.

GUERREIRO, T. M. et al. New Approach of QuEChERS and GC-MS Triple-Quadrupole for the Determination of Ethyl Carbamate Content in Brazilian cachaças. **Frontiers in Nutrition**, v. 5, n. April, p. 1–9, 2018.

HAN, S. S.; JEONG, Y. S.; CHOI, S. K. Current scenario and challenges in the direct identification of microorganisms using MALDI TOF MS. **Microorganisms**, v. 9, n. 9, p. 1917, 2021.

HIRST, M. B.; RICHTER, C. L. Review of aroma formation through metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in beverage fermentations. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 67, n. 4, p. 361-370, 2016.

HONG, X. et al. Metagenomic sequencing reveals the relationship between microbiota composition and quality of Chinese Rice Wine. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.

JANG, K. S.; KIM, Y. H. Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications. **Journal of Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 209-216, 2018.

KAAVYA, R. et al. Sugarcane juice preservation: A critical review of the state of the art and way forward. **Sugar Tech**, v. 21, n. 1, p. 9-19, 2019.

LAGO, L. O.; WELKE, J. E. Carbonyl compounds in wine: factors related to presence and toxic effects. **Ciência Rural**, v. 49, 2019.

LAS HERAS, E. et al. Quantitative determination of acrolein in cider by ¹H NMR spectrometry. **Foods**, v. 9, n. 12, p. 1820, 2020.

- LI, P. et al. Effect of ILV2 deletion and ILV3 or/and ILV5 overexpression in *Saccharomyces uvarum* on diacetyl and higher alcohols metabolism during wine fermentation. **European Food Research and Technology**, v. 246, n. 3, p. 563-572, 2020.
- LIMA, C. M. G. et al. A state-of-the-art review of the chemical composition of sugarcane spirits and current advances in quality control. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 106, p. 104338, 2022.
- LÓPEZ, N. G. C.; BAQUERA, P. L. O.; VIVEROS, J. D. Molecular tools used for metagenomic analysis. Review. **Revista Mexicana de Ciências Pecuarias**, v. 11, n. 4, p. 1150-1173, 2020.
- MACHADO, A. M. D. R. et al. Contamination of cachaça by PAHs from storage containers. **Food Chemistry**, v. 146, p. 65–70, 2014.
- MASSON, J. et al. Parâmetros físico-químicos e cromatográficos em aguardentes de cana queimada e não queimada. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1805–1810, 2007.
- MASSON, J. et al. Determination of acrolein, ethanol, volatile acidity, and copper in different samples of sugarcane spirits. **Food Science and Technology**, v. 32, n. 3, p. 568–572, 2012.
- MATTOS, D. S.; MARGARIDO, L. A. C.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Influence of sugarcane variety and management on the mineral composition of vinasse from alembic cachaça. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 40, p. 1–6, 2018.
- MENDONÇA, J. G. P. et al. Determination of ethyl carbamate in cachaças produced by selected yeast and spontaneous fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, n. 1, p. 63–68, 2016.
- MUTTON, M. J. R. et al. The clarification of sugarcane juice and the use of CA-11 yeast produces better quality cachaça. **Revista Ciência Agronômica**, v. 51, 2020.
- NGUYEN, N. T. H. et al. Metagenomics analyses of microbial dynamics associated with putative flavor development in mash fermentation of sake. **LWT**, p. 113570, 2022.
- OHIMAIN, E. I. Methanol contamination in traditionally fermented alcoholic beverages: the microbial dimension. **Springerplus**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2016.
- OLIVEIRA, J. H.; BORTOLETTO, A. M.; ALCARDE, A. R. Qualidade pós-colheita de colmos de cana armazenados e seus reflexos na produção de cachaça. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 19, 2016.
- OLIVEIRA, R. E. S. et al. Physicochemical parameters and volatile composition of cachaça produced in the state of Paraíba, Brasil. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e504974409, 2020.
- PANIGRAHI, C. et al. A technological review on processing of sugarcane juice: Spoilage, preservation, storage, and packaging aspects. **Journal of Food Process Engineering**, p. e13706, 2021.

PORTUGAL, C. B. et al. The role of spontaneous fermentation for the production of cachaça: a study of case. **European Food Research and Technology**, v. 242, n. 9, p. 1587–1597, 2016.

PORTUGAL, C. B. et al. How native yeasts may influence the chemical profile of the Brazilian spirit, cachaça? **Food Research International**, v. 91, p. 18–25, 2017.

RIACHI, L. G. et al. A review of ethyl carbamate and polycyclic aromatic hydrocarbon contamination risk in cachaça and other Brazilian sugarcane spirits. **Food Chemistry**, v. 149, p. 159–169, 2014.

RIBEIRO, M. L. D. et al. Tratamento físico-químico do caldo de cana produz cachaça de qualidade. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 48, n. 3, p. 458–463, 2017.

RIZO, J. et al. Omics in traditional vegetable fermented foods and beverages. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 5, p. 791-809, 2020.

RODRIGUES, L. M. A. et al. Organic contaminants in distilled sugar cane spirits produced by column and copper alembic distillation. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e930974879-e930974879, 2020.

SABATER, C. et al. Novel methods of microbiome analysis in the food industry. **International Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 593-605, 2021.

SANTIAGO, W. D. et al. Multivariate analysis for the characterization of physico-chemical profiles of cachaça produced in copper stills over a period of six years in Minas Gerais state. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 121, n. 2, p. 244–250, abr. 2015.

SANTIAGO, W. D. et al. Physicochemical profile and determination of volatile compounds in cachaça stored in new oak (*Quercus* sp.), amburana (*Amburana cearensis*), jatoba (*Hymenaeae carbouril*), balsam (*Myroxylon peruiferum*) and peroba (*Paratecoma peroba*) casks by SPME-GC-MS. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, n. 4, p. 624–634, 2016.

SANTIAGO, W. D. **Perfil físico-químico, compostos voláteis, carbamato de etila e compostos fenólicos de cachaças armazenadas em tonéis recém-confeccionados de carvalho e madeiras nativas brasileiras**. 2016. 221 p. Tese (Doutorado em Agroquímica). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

SANTIAGO, W. D. et al. Determination of ethyl carbamate in cachaça stored in newly made oak, amburana, jatobá, balsa and peroba vats and in glass containers. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, n. 4, p. 572–578, 2017.

SCHWAN, R. F.; DIAS D. R. Fermentação In: CARDOSO, M. G. **Produção de Aguardente de Cana**. 4 ed. Lavras: Editora UFLA, p. 93 - 119. 2020.

SCHWAN, R. F. et al. Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 79, n. 1, p. 89-96, 2001.

SEQUINO, G. et al. Omics-based monitoring of microbial dynamics across the food chain for the improvement of food safety and quality. **Food Research International**, p. 111242, 2022.

SERAFIM, F. A.T. Quantitative chemical profile and multivariate statistical analysis of alembic distilled sugarcane spirit fractions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 8, p. 1506-1514, 2012.

SHIN, N. et al. Micelle-stabilized olfactory receptors for a bioelectronic nose detecting butter flavors in real fermented alcoholic beverages. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2020.

SILVA, J. H. D. N. E.; VERRUMA-BERNARDI, M. R.; OLIVEIRA, A. L. DE. Cachaça Production in Brazil and its Main Contaminant (Ethyl Carbamate). **Scientia Agricola**, v. 77, n. 2, 2020.

SILVA, A. P. et al. Chemical composition of sugar cane spirit produced from different distillation methods. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 23, p. e2018308, 2020.

SINGHAL, N. et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 791, 2015.

SOARES, T. L.; SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F. Acompanhamento do processo de fermentação para produção de cachaça através de métodos microbiológicos e físico-químicos com diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae*. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 184-187, 2011.

SONG, Y. R.; LIM, B. U.; BAIK, S. H. Microbial Diversity and Volatile Flavor Changes during Gayangju Fermentation, a Traditional Korean House Rice Wine. **Foods**, v. 11, n. 17, p. 2604, 2022.

SOUZA, R. H. Z. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in cachaças packed in bottles of polyethylene terephthalate. **Journal of Food Science**, v. 87, n. 4, p. 1906-1915, 2022.

SPAHO, N. et al. Effects of distillation cut on the distribution of higher alcohols and esters in brandy produced from three plum varieties. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 119, n. 1-2, p. 48-56, 2013.

SWIEGERS, J. H. et al. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 11, n. 2, p. 139-173, 2005.

TÁBUA, M. C. M. et al. Identification of volatile compounds, quantification of glycerol and trace elements in distilled spirits produced in Mozambique. **Journal of food science and technology**, v. 57, n. 2, p. 505-512, 2020.

TEIXEIRA, V. et al. Using Moringa oleifera Lamarck seed extract for controlling microbial contamination when producing organic cachaça. **International Journal of Food Microbiology**, v. 308, n. August, p. 108287, 2019.

VALENTE, G. L. C.; SOUZA, M. R.. Utilization of MALDI-TOF Mass Spectrometry for microbiological evaluation of milk and dairy products. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, 2020.

VICHI, S. et al. Volatile and semi-volatile components of oak wood chips analysed by Accelerated Solvent Extraction (ASE) coupled to gas chromatography-mass spectrometry (GC-

MS). **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1260–1269, 2007.

WALKER, G. M.; STEWART, G. G. *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. **Beverages**, v. 2, n. 4, p. 30, 2016.

ZACARONI, L. M. **Compostos fenólicos e cumarinas: certificação de um método analítico para caracterização e quantificação em aguardentes de cana envelhecidas em barris de diferentes espécies de madeira**. 2009. 138 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

ZACARONI, L. M. et al. Effect of light on the concentration of ethyl carbamate in cachaça stored in glass bottles. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 121, n. 2, p. 238–243, 2015a.

ZACARONI, L. M. et al. Natural clay and commercial activated charcoal: Properties and application for the removal of copper from cachaça. **Food Control**, v. 47, p. 536-544, 2015b.

SEGUNDO CAPÍTULO

ARTIGO 1 - CORRELATION OF THE PRESENCE OF ACROLEIN WITH HIGHER ALCOHOLS, GLYCEROL AND ACIDITY IN CACHAÇAS

Artigo aceito na revista Journal of Food Science

Artigo DOI: [10.1111/1750-3841.16523](https://doi.org/10.1111/1750-3841.16523)

Received: 20 September 2022 | Revised: 26 January 2023 | Accepted: 17 February 2023

DOI: 10.1111/1750-3841.16523



ORIGINAL ARTICLE

Toxicology and Chemical Food Safety

Correlation of the presence of acrolein with higher alcohols, glycerol, and acidity in cachaças

Gabriela Fontes Alvarenga¹ | Ana Maria de Resende Machado² |
 Richard Bispo Barbosa³ | Vanuzia Rodrigues Fernandes Ferreira³ |
 Wilder Douglas Santiago³ | Maria Luiza Teixeira³ | David Lee Nelson⁴ |
 Maria das Graças Cardoso³ 

¹Department of Food Science, Federal University of Lavras (UFLA), Lavras, Brazil

²Department of Chemistry, Federal Center for Technological Education of Minas Gerais (CEFET-MG), Campus I, Belo Horizonte, Brazil

³Department of Chemistry, Federal University of Lavras (UFLA), Lavras, Brazil

⁴Postgraduate Program in Biofuels, Federal University of Vale do Jequitinhonha and Mucuri, Diamantina, Brazil

Correspondence

Maria das Graças Cardoso, Department of Chemistry, Federal University of Lavras (UFLA), CEP 37200-900, Lavras, Minas Gerais, Brazil.
 Email: mcardoso@ufla.br

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Abstract

Acrolein is a toxic aldehyde that can be present in various beverages, such as cachaça and other distilled spirits from sugarcane. The objective of this work was to detect and quantify acrolein in samples of cachaça produced by different processes in all regions of Brazil and to evaluate the possible routes of formation of this contaminant from the correlation with other secondary compounds present in the beverage using principal component analysis. Approximately 27.0% of the samples analyzed were outside the limit established by Brazilian legislation for this contaminant, with an average acrolein concentration of 14.01 mg 100 mL⁻¹ anhydrous alcohol (aa). In the other samples, the average concentration was 0.97 mg 100 mL⁻¹ aa. After selecting the variables that most closely correlated with the presence of acrolein in beverages, a positive correlation was found with the presence of butan-2-ol, propan-1-ol and volatile acids, and a slight correlation with the presence of phenolic compounds. Therefore, the presence of acrolein in cachaça can be associated with contamination of the fermentation must by bacteria of the genus *Lactobacillus*, as a result of the chemical degradation and enzymatic conversion of the glycerol produced during fermentation.

KEYWORDS

contaminants, Principal Component Analysis, sugarcane spirit

1 | INTRODUCTION

The alcoholic beverage obtained by fermenting sugarcane juice, followed by distillation, can be called cachaça or sugarcane spirits. The differences between them are in the place of origin or production, in the distillation process, and in the alcohol content. Cachaça is a beverage produced exclusively in Brazil from the distillation of fermented sugarcane must with an alcohol content between 38% and 48%

(v/v) at 20°C, whereas sugarcane spirits is a beverage produced anywhere, with an alcohol content between 38% and 54% (v/v) at 20°C (Brasil, 2005a).

Cachaça/spirits is a complex mixture consisting mostly of ethanol and water and a hundred secondary compounds such as carboxylic acids, esters, aldehydes, and higher alcohols, which act synergistically to influence the flavor of the beverage. In addition to these secondary compounds that are desirable, other compounds are also formed during

the processing stages of cachaça/spirits that are considered to be contaminants because they have harmful effects on the health of consumers. The main contaminants found in the beverage are methanol, butyl and *sec*-butyl alcohols, furfural, hydroxymethylfurfural (HMF), acrolein, ethyl carbamate, and the metals copper (in excess), arsenic, and lead (Brasil, 2005a; Cardoso, 2020; Lima et al., 2022; Portugal et al., 2017).

Among these contaminants, propen-2-al (acrolein), a highly reactive α,β -unsaturated aldehyde, is a compound that humans are exposed to in many situations and might be responsible for triggering different neurodegenerative diseases, such as cardiovascular diseases, diabetes, cancer, atherosclerosis, and Alzheimer's (Chang et al., 2022; Crowley et al., 2022; Igarashi et al., 2018; Jiang et al., 2022; Liu et al., 2019; X. Zhang et al., 2022; Zirak et al., 2019). Acrolein can be found mainly in foods and beverages that are rich in lipids, carbohydrates, and certain amino acids that are heated during processing, or in fermented products produced by the metabolism of lactic acid bacteria (Drakula et al., 2019; Lago & Welke, 2019; Muguruma et al., 2020; D. Zhang et al., 2020).

The Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) defined, through Normative Instruction No. 13, of June 2005, a limit of 5 mg of acrolein per 100 mL of anhydrous alcohol (aa) for cachaça and sugarcane spirits (Brasil, 2005a). However, the routes for the formation of this substance in the beverage are not yet fully elucidated. Its formation can be associated with the dehydration of glycerol, one of the main products of alcoholic fermentation, during distillation in the presence of acids and metallic catalysts. In addition, the contamination of the must by lactic acid bacteria such as *Bacillus amaroxylicus* and *Lactobacillus colinoides* can also be related to the production of acrolein because these bacteria can convert glycerol to 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) under anaerobic conditions, and the 3-HPA is spontaneously transformed by thermal dehydration into acrolein. This reaction is favored by low pH, high temperatures, and metallic catalysts (de Las Heras et al., 2020; Kächele et al., 2014; Lago & Welke, 2019; Masson et al., 2012).

Principal component analysis (PCA) can be used to identify possible correlations between the presence of acrolein and other secondary compounds present in cachaça and sugarcane spirits. PCA is a tool for initial exploration of multivariate data and investigation of central trends. It facilitates the analysis of the presence of clusters of samples in the original dataset and detects the variables that are indicative of the structuring or clustering between the samples. From the principal components (PC) generated by the PCA analysis, one expects to capture the maximum variation of the original data set through the use of scores, the location of samples in the generated matrix, and

the loadings, which are the contributions of the original variables to the PC (Bro & Smilde, 2014; Buvé et al., 2022).

This study sought to detect and quantify acrolein in samples of cachaça and sugarcane spirits produced by different processes throughout Brazil and to evaluate the possible pathways of formation of this contaminant through the correlation with other secondary compounds present in the beverage using the PCA method.

2 | MATERIALS AND METHODS

The 27 samples of cachaça/sugarcane spirits were acquired in retail stores in several Brazilian states. Seven samples were aged in oak barrels (product made with at least 50% cachaça stored in 700 mL oak barrels for a period of not less than one year) and coded as EC1 (distilled in a stainless steel column), EA2, EA3, EA4, EA5, EA6; and EA7 (distilled in a copper still). Six samples were stored in oak barrels (product for which the minimum storage period and the volume of the wooden barrels are not defined): AA8, AA9, AA10, AA11, AA12, and AA13 (distilled in copper stills). Fourteen samples were stored in stainless steel tanks: IA14, IA15, IA16, IA17, IA18, IA19, IA20, IA21, IA22, IA23, IA24 (distilled in copper stills), IA25, IA26 (sweetened), and IA27 (distilled through stainless steel columns). All the analyses were performed at the Laboratory of Quality Analysis of Sugarcane Spirits at the Federal University of Lavras, in Lavras, Minas Gerais, Brazil.

2.1 | Physicochemical analysis

The determinations of the alcohol concentration, volatile acidity, esters, aldehydes, furfural, copper, and dry extract were performed according to the specifications established by MAPA through Normative Instruction No. 24 of September 8, 2005 (Brasil, 2005b). Glycerol concentrations were determined by spectrophotometry according to the colorimetric method proposed by Amerine and Ough (1980) and modified by Tábuca et al. (2020) and Bortoletto et al. (2016). The method consists of the oxidation of glycerol by metaperiodate to form formaldehyde, which is then condensed with acetylacetone and ammonia to yield a colored complex. Readings were performed in a Shimadzu UV-1601 spectrophotometer at 420 nm. The concentration of glycerol (mg/L) in the samples was determined from the standard curve previously constructed using glycerol at concentrations between 1.87 and 60 mg L⁻¹.

The determination of total phenolic compounds was performed by the Folin-Ciocateu spectrophotometric method described by Rodrigues et al. (2016). Readings were taken at 725 nm (Shimadzu UV-1601 PC).

Concentrations were determined from the standard curve using gallic acid in 40% ethanol (v/v) at different concentrations (1 to 1000 mg L⁻¹). Results were expressed in mg equivalent of gallic acid per liter.

2.2 | Chromatographic analysis

The quantification of acrolein was performed according to the method of Nascimento et al. (1997), Zacaroni et al. (2011), and Caetano et al. (2022). The samples were derivatized by the formation of 2,4-dinitrophenylhydrazones without previous treatment. After filtering through membranes, 20 µL of each sample and the standard were analyzed by HPLC on a Shimadzu HPLC chromatograph equipped with two model SPD-M20A high pressure pumps, a model DGU-20A3 degasser, a model CBM-20A interface, and a model SIL-10AF automatic injector with an SPD-M20A diode array detector (DAD) at 365 nm, using a flow rate of 0.9 mL min⁻¹. An Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 (250 × 4.6 mm × 5 µm) column coupled to an Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 4-Pack pre-column (12.5 × 4.6 mm × 5 µm) was used for separation. The mobile phase consisted of a solution of water:acetic acid (98:2% v/v) (Solvent A) and methanol (Solvent B). The gradient elution system was as follows: 0–3 min (70%–85% B), 3–10 min (85%–80% B), 10–12 min (80%–70% B), and 12–15 min (70%–70% B).

Ethyl carbamate was determined using the method described by Anjos et al. (2011), Machado et al. (2013), and Santiago et al. (2017). The samples were previously derivatized and analyzed in the same HPLC described above using a model RF-10AXL (FLD) fluorescence detector. An Agilent-Zorbax Eclipse AAA (4.6 × 150 mm, 5 µm) column connected to an Agilent-Zorbax Eclipse AAA pre-column (4.6 × 12.5 mm, 5 µm) was employed. The mobile phase consisted of 20 mmol L⁻¹ sodium acetate solution (Solvent A) and acetonitrile (Solvent B). A flow rate of 0.75 mL min⁻¹ was used throughout the analysis, and the injected volume of samples and standard was 20 µL. A gradient elution system was employed: 0–5 min (40%–60% B), 5–10 min (60%–70% B), 10–18 min (70%–80% B), 18–19.5 min (80%–90% B), 19.5–25 min (90%–40% B), and 25–30 min (40% B). Quantification was achieved using the external standardization method. The excitation and emission wavelengths employed were 233 and 600 nm, respectively.

The concentrations of higher alcohols (3-methylbutan-1-ol, 2-methylpropan-1-ol, propan-1-ol) and the contaminants (methanol, butan-1-ol and butan-2-ol) were determined by gas chromatography using a flame ionization detector (GC-FID) according to the method of Vilela et al. (2007) and Santiago et al. (2016). A DB Wax (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm) column was used. The separation condi-

tions were the following: split ratio (1:10), inlet and detector temperatures (150 and 170°C, respectively), and heating rate (1°C min⁻¹ from 55 to 70°C, totaling 17 min). Hydrogen gas was the carrier gas with a flow rate of 1.4 mL min⁻¹. The identification of compounds was performed by comparing the retention times of the samples with the standards, and quantification was achieved by external standardization.

2.3 | Statistical analysis

All the analyses were performed in triplicate, and the results were expressed as mean ± standard deviation. The PCA was used to investigate the possible correlations between the presence of acrolein and the other variables analyzed that make up the cachaça/sugarcane spirits. Results were defined as means for further analysis. The analysis was performed using the R statistical program.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

The results of the physical-chemical analyzes are shown in Table 1. With the exception of four samples, the beverages could be called cachaça because their alcohol concentrations were between 38% and 48% v v⁻¹ at 20°C (Brazil, 2005a). The concentrations of ethanol in the aged samples EC1 (37.98 ± 0.04%) and EA7 (37.17 ± 0.02%) were lower than the minimum limit required by legislation. To be called aged, cachaça must be stored in wooden barrels with a maximum capacity of 700 L for a minimum period of 1 year, and as much as 50% of non-aged cachaça can be added. This process must be monitored by the inspecting organs. The storage period necessary for the aging of the beverage might have contributed to the slight reduction in the alcohol content of the beverages as a result of the partial evaporation of ethanol through the pores of the wooden barrel. In addition, ethanol can also react with other secondary compounds present in cachaça throughout the storage period to reduce its concentration in the final product (Brasil, 2005a; Cardoso, 2020; Santiago et al., 2016).

Samples IA21 (31.58 ± 0.01%) and IC27 (31.07 ± 0.06%), which were stored in stainless steel tanks before bottling, also had an alcohol content lower than the legal limit (Table 1). This fact can be related to incomplete fermentation of the wort sugars and, consequently, low ethanol production. In addition, errors or lack of standardization of the beverage to be marketed and inadequate packaging can result in an alcohol concentration lower than that required by current legislation (Cardoso, 2020; Oliveira et al., 2020). The concentration of aldehydes in the IA21 sample was also outside the legal limit.

TABLE 1 Physical-chemical composition of cachaça and sugarcane spirits

	Ethanol conc. ^a	Acidity ^b	Esters ^b	Aldehydes ^b	Propan-1-ol ^b	2-Methyl-1-propanol ^b	3-Methyl-1-butanol ^b	Dry extract ^c	Glycerol ^d	Phenolics ^e
EA1	37.98 ± 0.04	32.92 ± 2.77	21.99 ± 1.63	13.38 ± 0.01	55.11 ± 0.70	48.72 ± 0.55	185.04 ± 1.22	0.35 ± 0.03	1.66 ± 0.02	19.73 ± 0.04
EA2	38.88 ± 0.01	130.33 ± 0.03	143.09 ± 0.00	20.35 ± 0.04	17.88 ± 0.07	56.85 ± 0.13	94.22 ± 1.43	0.83 ± 0.01	4.39 ± 0.02	118.70 ± 0.87
EA3	39.56 ± 0.00	74.69 ± 0.04	52.58 ± 0.03	25.68 ± 0.01	89.36 ± 1.61	54.33 ± 1.05	119.69 ± 4.03	0.75 ± 0.00	2.73 ± 0.04	56.69 ± 0.36
EA4	39.33 ± 0.00	60.91 ± 2.58	34.65 ± 0.01	21.87 ± 0.01	80.07 ± 0.19	43.46 ± 0.13	89.25 ± 1.35	1.42 ± 0.57	3.62 ± 0.11	21.13 ± 0.13
EA5	44.31 ± 0.06	107.87 ± 2.19	103.20 ± 5.36	33.91 ± 0.05	32.89 ± 0.20	53.34 ± 0.52	171.49 ± 3.12	0.44 ± 0.00	2.06 ± 0.06	21.38 ± 0.17
EA6	42.92 ± 0.02	131.53 ± 0.06	72.99 ± 2.81	8.89 ± 0.01	49.49 ± 0.49	56.90 ± 0.62	86.36 ± 1.81	0.76 ± 0.00	51.0 ± 0.30	78.50 ± 0.16
EA7	37.17 ± 0.02	86.20 ± 0.05	57.89 ± 1.64	8.83 ± 0.40	71.30 ± 0.05	56.10 ± 0.06	112.65 ± 0.43	0.84 ± 0.00	2.69 ± 0.00	22.84 ± 0.04
AA8	43.89 ± 0.00	97.62 ± 0.05	71.02 ± 0.04	20.13 ± 0.01	135.95 ± 3.90	42.86 ± 0.95	58.94 ± 0.03	0.22 ± 0.07	1.79 ± 0.18	26.60 ± 0.45
AA9	39.67 ± 0.00	179.33 ± 0.29	92.33 ± 0.15	18.83 ± 0.03	84.41 ± 0.15	51.24 ± 0.11	92.11 ± 3.02	0.55 ± 0.01	2.38 ± 0.11	85.48 ± 0.95
AA10	41.33 ± 0.00	35.15 ± 0.02	25.76 ± 1.48	13.69 ± 0.01	80.70 ± 0.27	39.21 ± 0.02	79.74 ± 3.21	0.25 ± 0.01	1.95 ± 0.54	18.09 ± 0.20
AA11	44.37 ± 0.0	86.58 ± 0.03	23.45 ± 0.01	10.95 ± 0.00	41.03 ± 0.88	37.26 ± 0.56	61.12 ± 1.12	0.09 ± 0.01	1.34 ± 0.02	8.90 ± 0.11
AA12	38.89 ± 0.04	79.41 ± 0.08	48.80 ± 3.06	18.75 ± 0.02	56.55 ± 2.31	36.20 ± 0.74	117.74 ± 0.39	0.24 ± 0.09	1.17 ± 0.04	27.62 ± 0.06
AA13	39.14 ± 0.17	150.29 ± 0.65	83.76 ± 2.75	18.34 ± 0.48	103.92 ± 0.78	34.86 ± 0.18	79.48 ± 0.27	0.78 ± 0.01	0.94 ± 0.03	130.43 ± 4.95
IA14	44.04 ± 0.00	164.37 ± 0.03	61.01 ± 5.86	15.05 ± 0.01	73.86 ± 0.66	23.53 ± 0.33	54.99 ± 0.19	0.07 ± 0.00	0.64 ± 0.00	4.79 ± 0.01
IA15	38.55 ± 0.00	18.84 ± 0.01	40.88 ± 1.58	9.40 ± 0.01	68.55 ± 0.18	58.70 ± 0.37	115.91 ± 0.18	0.01 ± 0.00	0.63 ± 0.06	4.48 ± 0.02
IA16	44.71 ± 0.00	55.21 ± 0.01	28.58 ± 0.01	8.86 ± 0.00	81.73 ± 0.87	42.35 ± 0.04	77.34 ± 0.35	0.07 ± 0.01	0.72 ± 0.04	4.92 ± 0.03
IA17	39.37 ± 0.00	22.13 ± 0.01	45.43 ± 0.03	9.78 ± 0.01	68.29 ± 1.74	57.61 ± 0.93	120.03 ± 3.31	0.01 ± 0.00	0.67 ± 0.00	4.48 ± 0.02
IA18	41.00 ± 0.00	85.20 ± 0.38	37.49 ± 0.17	16.05 ± 0.07	95.73 ± 0.04	19.57 ± 0.04	28.98 ± 0.04	0.03 ± 0.01	0.65 ± 0.01	5.91 ± 0.02
IA19	44.64 ± 0.00	19.52 ± 0.00	20.99 ± 0.06	14.20 ± 0.04	80.27 ± 0.53	70.02 ± 0.06	83.22 ± 3.10	0.03 ± 0.00	0.71 ± 0.00	4.79 ± 0.01
IA20	40.27 ± 0.00	80.72 ± 0.08	26.91 ± 1.25	20.30 ± 0.02	52.63 ± 0.45	22.95 ± 0.05	47.12 ± 0.88	0.07 ± 0.01	0.71 ± 0.04	4.83 ± 0.02
IA21	31.59 ± 0.01	102.25 ± 0.14	153.86 ± 0.06	44.05 ± 0.01	27.56 ± 0.18	54.23 ± 0.03	77.35 ± 0.65	0.13 ± 0.00	0.66 ± 0.02	7.77 ± 0.06
IA22	45.55 ± 0.05	57.52 ± 2.38	28.92 ± 0.03	10.47 ± 0.32	36.80 ± 0.21	60.18 ± 0.29	73.98 ± 0.57	0.01 ± 0.00	0.69 ± 0.02	4.97 ± 0.01
IA23	46.19 ± 0.00	38.21 ± 0.00	32.69 ± 1.32	21.29 ± 0.35	62.63 ± 0.40	28.29 ± 0.15	95.47 ± 0.57	0.06 ± 0.02	0.85 ± 0.03	4.61 ± 0.07
IA24	39.44 ± 0.02	123.07 ± 0.06	80.95 ± 0.04	18.21 ± 0.40	98.70 ± 8.03	32.52 ± 3.09	73.19 ± 8.01	0.20 ± 0.02	0.73 ± 0.04	6.45 ± 0.08
ICA25	39.41 ± 0.01	29.63 ± 0.05	2.73 ± 0.04	14.84 ± 0.42	56.06 ± 0.25	64.95 ± 1.40	167.06 ± 0.91	24.32 ± 0.09	44.24 ± 0.07	5.51 ± 0.35

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

	Ethanol conc. ^a	Acidity ^b	Esters ^b	Aldehydes ^b	Propan-1-ol ^b	2-Methyl-1-propanol ^b	3-Methyl-1-butanol ^b	Dry extract ^c	Glycerol ^f	Phenolics ^g
ICA26	38.94 ± 0.03	26.26 ± 0.02	24.21 ± 3.13	21.27 ± 0.39	54.64 ± 0.20	59.30 ± 0.28	153.42 ± 2.34	14.76 ± 0.53	30.33 ± 0.00	4.83 ± 0.08
IC27	31.07 ± 0.06	23.52 ± 0.05	30.35 ± 3.84	7.11 ± 0.18	41.92 ± 0.92	43.49 ± 0.95	93.36 ± 0.41	0.14 ± 0.02	0.77 ± 0.11	4.81 ± 0.01
^a Limit	38–54	150.00	200.00	30.00						

Note: Bold values are outside the legal limits (Brasil, 2005a).

^aAbbreviation: conc., (concentration).

^bGL %v/v.

^cmg/100 mL⁻¹ aa.

^dg L⁻¹.

^emg L⁻¹.

^fmg equivalents gallic acid L⁻¹.

^gBrasil (2005a).

There was a great variability in samples with respect to the concentration of the dry extract (g L⁻¹) (Table 1). Brazilian legislation does not set a limit for this parameter. Its quantification has the purpose of determining the concentration of solid compounds present in the cachaça, and it is influenced by the characteristics of the final beverage. The cachaças that were stored in stainless steel tanks before bottling tended to have a lower dry extract content, as was observed for samples IA or IC, with an average of 0.06 g L⁻¹, whereas the aged samples (EA and EC) stored in wooden barrels (AA) contained an average concentration of dry extract 10 times higher (0.60 g L⁻¹) than that of samples that did not go through this stage. According to Barbosa, Santiago, et al. (2022), substances are extracted during the period of storage in wooden barrels, and they are incorporated into the cachaça. Phenolic compounds, for example, contribute to the increase of the dry extract in the beverages. Samples ICA25 and ICA26 contained the highest concentrations of dry extract, 24.32 ± 0.09 and 14.76 ± 0.53 g L⁻¹, respectively. These cachaças are classified as sweetened, that is, according to the legislation, sugar was added in amounts greater than 6 g L⁻¹ and less than 30 g L⁻¹. This addition resulted in an increase in the dry matter content of the beverage (Brazil, 2005a). This practice, despite being authorized by legislation, can be associated with the intention to mask the low sensory quality of cachaça, making it a unrecommended practice (Oliveira et al., 2020).

The concentration of glycerol in cachaça is not defined by Brazilian legislation. Glycerol, after ethanol and carbon dioxide, is one of the main products formed during the fermentation of sugarcane juice by yeast. However, its concentration in the final beverage tends to be low because this compound can be degraded throughout the production process to produce other substances. In addition, there is a decrease in the concentration of compounds with high boiling temperatures during distillation. Despite this fact, cachaças stored in wooden barrels tend to have a higher glycerol concentration than those beverages that have not gone through this stage because during storage glycerol may be incorporated into the beverage as a result of the extraction of this compound from the inner surface of the barrel (Bortoletto et al., 2016; Carvalho et al., 2020; Tábua et al., 2020). As can be seen in Table 1, a similar behavior was observed in the samples analyzed in the present study, where on average the samples stored in wooden barrels had higher glycerol contents (2.45 mg L⁻¹) than the samples stored in stainless steel tanks (0.70 mg L⁻¹), with the exception of the sweetened beverages, ICA25 and ICA26, which contained the highest concentrations of glycerol (mean, 37.29 mg L⁻¹).

Samples of cachaça aged in wooden barrels contained the highest concentrations of phenolic compounds, an

average of 48.70 mg gallic acid L⁻¹, whereas samples stored in stainless steel tanks contained a mean concentration of 5.23 mg gallic acid L⁻¹ (Table 1). The total phenolic compounds, like glycerol, are compounds that can be present in the beverage despite not having limits established by legislation. They are associated with the process of storing cachaça in wooden barrels. During the storage period, phenolic compounds can be incorporated into the beverage through mechanisms of lignin degradation or direct extraction of these compounds previously formed in the wood, which explains their higher concentration in beverages that have undergone the aging process (Barbosa, Santiago, et al., 2022; Carvalho et al., 2020).

The highest levels of volatile acidity, 179.33 ± 0.29, 164.37 ± 0.03, and 150.29 ± 0.06 mg of acetic acid 100 mL⁻¹ aa, were found in samples AA9, IA14, and AA13, respectively (Table 1). These samples were outside the legal limit for the concentration of volatile acids, whose maximum is 150 mg 100 mL⁻¹ aa (Brasil, 2005a). All these samples were produced in establishments that use copper stills for distillation. Volatile acids, when present in adequate concentrations, can contribute to the flavor of the beverage. However, in excess, they can be responsible for undesirable sensory characteristics and indicate contamination by acetic bacteria during fermentation. In addition, the long period between the end of fermentation and the beginning of the distillation process favors the development of acetic bacteria and, consequently, it can lead to an increase in volatile acidity in the beverage (Cardoso, 2020; Santiago et al., 2016). The concentration of butan-2-ol (36.89 ± 0.30 mg 100 mL⁻¹ aa) in sample AA13 and that of butan-1-ol (3.04 ± 0.01 mg 100 mL⁻¹ aa) in sample IA14 were also greater than the legal limit. Both samples, AA13 and IA14, also contained concentrations of acrolein (19.19 ± 0.33 and 9.33 ± 1.03 mg 100 mL⁻¹ aa, respectively) greater than the legal limit.

The ester concentrations of all the samples were within the legal limit, which is 200 mg of ethyl acetate 100 mL⁻¹ aa (Brasil, 2005a). The concentrations ranged from 20.99 ± 0.06 (IA19) to 153.86 ± 0.06 (IA21) (Table 1). Esters, as well as some higher alcohols, are the principal compounds responsible for the aroma of the beverage. They have great relevance for the sensorial profile of the beverage, and, in adequate concentrations, these compounds are desirable and are important for the formation of fruity aromas. The great variability in the levels of esters can be attributed to the diversity of the samples analyzed because these compounds can be formed through the intracellular metabolism of yeasts or by the esterification of carboxylic acids during distillation and aging. The different practices of the production process can interfere with the concentration of these compounds in the beverage (Cardoso, 2020; Oliveira et al., 2020; Santiago et al., 2016).

The concentration of aldehydes was greater than the legal limit (30 mg of acetaldehyde 100 mL⁻¹ aa (Brasil, 2005a) in only two samples. Samples EA5 and IA21 were beverages produced by distillation in copper stills and stored in wooden barrels, and the aldehyde concentrations in these beverages, expressed in mg of acetaldehyde 100 mL⁻¹ aa, were, respectively, 33.91 ± 0.05 and 44.05 ± 0.01 (Table 1). The main aldehyde found in cachaças is acetaldehyde. Its formation occurs at the beginning of fermentation and can be attributed to excessive aeration of the must. Other aldehydes can also be present in the beverage, probably resulting from the oxidation of higher alcohols. Aldehydes can contribute positively or negatively to the characteristics of cachaça, depending on the concentration. In excess, this compound is undesirable, as it can be responsible for unpleasant aromas and even cause intoxication (Caetano et al., 2022; Cardoso, 2020; Santiago et al., 2016).

The sum of the concentrations of the desirable higher alcohols [isoamyl (3-methylbutan-1-ol), isobutyl (2-methylpropan-1-ol) and propyl (propan-1-ol)] is delimited by the legislation, with the maximum of 360 mg 100 mL⁻¹ aa (Brasil, 2005a). None of the samples contained a sum of higher alcohols greater than the legal limit. The concentrations (mg 100 mL⁻¹ aa, Table 1) of propyl alcohol were between 135.85 ± 3.90 (AA8) and 17.88 ± 0.07 (EA2); those of isobutyl alcohol were between 70.02 ± 0.08 (IA19) and 19.57 ± 0.04 (IA18), and the concentrations of isoamyl alcohol were between 185.04 ± 1.22 (EC1) and 28.98 ± 0.04 (IA18). These higher alcohols are produced by the metabolism of yeast and bacteria, but the amount and type of alcohol formed depends on the fermentation conditions and the strain used. In yeast, they come from the transformation of amino acids during fermentation by a process known as the Ehrlich reaction, a catabolic pathway that comes into play when there is an excess of amino acids in the medium. When amino acids are deficient, an alternative anabolic pathway called the biosynthesis pathway becomes operational. In this pathway, higher alcohols are formed from α -keto acid intermediates. Along with esters, higher alcohols are of great relevance to the aromatic profile of cachaça (Caetano et al., 2022; Cardoso, 2020; Santiago et al., 2016).

In addition to the desirable compounds, some contaminants can be formed along the production process, and their concentrations must be controlled so that the final product does not present risks to the health of the consumer. Butan-1-ol and butan-2-ol are higher alcohols that are considered to be contaminants and can be present in cachaça. To be adequate for commercialization, the legal limit is 3.0 mg of butan-1-ol 100 mL⁻¹ aa in cachaça (Brasil, 2005a). Among the samples analyzed, only sample IA14 contained a concentration of this alcohol (3.04 ± 0.01 mg

TABLE 2 Concentration of contaminants present in the samples of cachaça and sugar cane spirits

	Methanol ^a	Butan-1-ol ^a	Butan-2-ol ^a	Acrolein ^a	Copper ^b	Ethyl carbamate ^c
EC1	ND	0.77 ± 0.01	ND	0.85 ± 0.04	0.48 ± 0.17	<LQ
EA2	2.55 ± 0.07	0.38 ± 0.11	ND	0.25 ± 0.02	10.40 ± 0.01	<LQ
EA3	ND	1.33 ± 0.01	15.44 ± 0.04	4.88 ± 0.11	6.01 ± 0.02	<LD
EA4	ND	1.24 ± 0.00	18.51 ± 0.31	8.63 ± 0.18	3.60 ± 0.05	12.18 ± 0.25
EA5	ND	0.48 ± 0.05	4.06 ± 0.66	1.37 ± 0.16	5.58 ± 0.16	13.47 ± 1.85
EA6	4.76 ± 0.01	0.71 ± 0.02	0.63 ± 0.00	0.78 ± 0.06	1.03 ± 0.06	<LQ
EA7	5.33 ± 0.00	0.85 ± 0.00	0.35 ± 0.00	0.29 ± 0.00	0.47 ± 0.01	<LD
AA8	ND	0.78 ± 0.01	20.57 ± 0.40	26.07 ± 2.62	0.62 ± 0.04	ND
AA9	ND	1.32 ± 0.01	0.55 ± 0.00	2.75 ± 0.06	1.02 ± 0.01	ND
AA10	ND	1.30 ± 0.01	ND	0.13 ± 0.01	3.19 ± 0.01	<LD
AA11	ND	0.66 ± 0.01	ND	0.26 ± 0.03	0.00 ± 0.00	ND
AA12	ND	0.86 ± 0.06	ND	0.16 ± 0.00	1.83 ± 0.11	<LD
AA13	ND	0.67 ± 0.03	36.89 ± 0.30	19.19 ± 0.33	0.32 ± 0.01	5.89 ± 0.25
IA14	ND	3.04 ± 0.01	ND	9.33 ± 1.03	0.75 ± 0.03	9.88 ± 0.43
IA15	ND	1.06 ± 0.01	0.04 ± 0.02	1.22 ± 0.02	2.38 ± 0.01	ND
IA16	ND	1.26 ± 0.01	ND	0.13 ± 0.02	0.69 ± 0.01	ND
IA17	ND	1.10 ± 0.02	ND	0.49 ± 0.01	2.30 ± 0.03	ND
IA18	ND	1.26 ± 0.03	19.34 ± 0.01	10.00 ± 0.47	3.33 ± 0.04	37.10 ± 0.01
IA19	ND	1.12 ± 0.01	ND	<LQ	3.27 ± 0.01	<LQ
IA20	ND	1.25 ± 0.00	ND	<LQ	1.59 ± 0.01	ND
IA21	ND	0.51 ± 0.00	1.10 ± 0.03	<LQ	1.15 ± 0.04	ND
IA22	3.54 ± 0.17	0.64 ± 0.01	ND	<LQ	1.05 ± 0.01	ND
IA23	ND	1.25 ± 0.00	ND	<LQ	2.90 ± 0.04	7.93 ± 0.64
IA24	ND	0.61 ± 0.02	36.07 ± 0.72	19.55 ± 0.43	0.81 ± 0.09	5.82 ± 0.01
ICA25	ND	0.36 ± 0.02	ND	4.56 ± 0.12	0.31 ± 0.00	77.80 ± 0.24
ICA26	ND	0.56 ± 0.03	ND	5.32 ± 0.10	0.18 ± 0.03	61.44 ± 0.22
IC27	ND	0.32 ± 0.03	ND	0.93 ± 0.11	0.13 ± 0.01	6.73 ± 0.60
*Limit	20.00	3.00	10.00	5.00	5.00	210.00

Note: Bold values are outside the legal limits (Brasil, 2005a). Acrolein: LD = 0.03 e LQ = 0.11 (mg 100 mL⁻¹ aa); Ethyl carbamate: LD = 1.71; LQ = 5.69 µg L⁻¹.

Abbreviations: LQ, quantification limit; LD, detection limit; ND, not detected.

^amg 100 mL⁻¹ aa.

^bmg L⁻¹.

^cµg L⁻¹.

*Brasil (2005a).

100 mL⁻¹ aa; Table 2) greater than the legal limit. Butan-1-ol can be formed during fermentation as a result of wort contamination by acetobutyl bacteria and the hydrolysis of its corresponding acetate (Cardoso, 2020; Lima et al., 2022; Spaho et al., 2013). The concentration in this sample was also greater than the limits for volatile acidity and acrolein. The formation of both compounds is associated with bacterial contamination of the fermentation wort.

A concentration of butan-2-ol greater than the legal limit of 10.0 mg 100 mL⁻¹ aa (Brazil, 2005a) was observed in six samples (Table 2). Aged beverages EA3 and EA4 contained, respectively, 15.44 ± 0.04 and 18.51 ± 0.31 mg 100 mL⁻¹ aa. The samples stored in wooden barrels (AA8 and AA13) contained, respectively, 20.57 ± 0.40 and

36.89 ± 0.30 mg 100 mL⁻¹ aa. The samples stored in stainless steel tanks (IA18 and IA24) contained 19.34 ± 0.01 and 36.07 ± 0.72 mg 100 mL⁻¹ aa, respectively. All these samples were produced by distillation process in copper stills. The presence of butan-2-ol in cachaça is related to contamination of the fermentation must by bacteria of the genus *Lactobacillus* and *Clostridium*. These bacteria are able to form this compound by enzymatic reduction of 2,3-butanediol, or spontaneously via oxidative degradation of 2,3-butanediol. The concentration of this toxic compound can negatively influence the taste of the beverage, and it is indicative of bacterial deterioration of the raw material (Diéguez et al., 2005; González et al., 2011; Silva et al., 2000; Spaho et al., 2013). The copper concentration

in the EA3 sample was also greater than the legal limit. With the exception of the EA3 sample, the samples that contained concentrations of butan-2-ol that were outside the legal limits also contained concentrations of acrolein that were outside the limits. The AA13 sample, in addition to being irregular for these compounds, contained an inappropriate concentration of volatile acids.

Methanol and ethyl carbamate are other organic contaminants that can be present in cachaça. No sample shown in Table 2 was outside the limit established in the legislation for these contaminants. Methanol is highly toxic and can be formed during fermentation by enzymatic degradation of pectin substances from sugarcane. Ethyl carbamate is a compound with high carcinogenic potential whose route of formation in cachaça is not yet fully elucidated, but it can be related to the reaction of ethanol with cyanide groups from cyanogenic glycosides present in sugarcane (Cardoso, 2020; Cravo et al., 2019).

Furfural is an aldehyde that is considered to be toxic. The legislation defines that this compound can be present in cachaça at a maximum concentration of 5 mg 100 mL⁻¹ aa (Brazil, 2005a). Only the EA2 sample contained a concentration greater than the legal limit for this parameter, 21.20 ± 0.01 mg 100 mL⁻¹ aa (Table 2). Furfural can be formed at different stages of the cachaça production process as a result of dehydration of sugars (pentose and hexoses) (Cardoso, 2020).

The copper concentration in the EA2 sample was also above the legal limit (5 mg L⁻¹), with a concentration of 10.40 ± 0.01 mg L⁻¹. In addition to this sample, the concentrations of this inorganic contaminant were also greater than the legal limit in two samples that were aged and produced in stills: EA3 (6.01 ± 0.02 mg L⁻¹) and EA5 (5.58 ± 0.16 mg L⁻¹). Copper, when present in high concentrations, is very harmful to health because of its affinity for sulfur groups in many proteins. The presence of copper in cachaça comes, in most cases, from the material used in the stills. However, some simple practices such as correct cleaning of stills and the use of adsorbent filters can contribute to reducing the concentration of this contaminant in beverages (Barbosa, Magriotis, et al., 2022; Cardoso, 2020; Zacaroni et al., 2015).

The results for the acrolein content of the cachaça samples can be seen in Table 2. There is a great variation in the concentration of this aldehyde among the beverages, from below the limit of quantification (LQ), 0.11 mg 100 mL⁻¹ aa, to 26.08 mg 100 mL⁻¹ of aa. The highest concentrations of acrolein were observed in samples AA8 (26.08 mg 100 mL⁻¹ aa), AA13 (19.19 mg 100 mL⁻¹ aa), and IA24 (19.55 mg 100 mL⁻¹ aa). Approximately 27.0% of the samples were outside the limit established by Brazilian legislation for this contaminant (5.0 mg 100 mL⁻¹ aa). The average concentration in these samples was 14.01 mg

100 mL⁻¹ aa, whereas the other samples contained an average concentration of 0.97 mg 100 mL⁻¹ aa (Brazil, 2005a).

Some other studies also quantified acrolein in cachaça and sugarcane spirits. Caetano et al. (2022) evaluated the physicochemical composition of 24 samples of unaged cachaça produced in Salinas, MG, Brazil. The authors quantified acrolein in only six samples, all of which were within the legal limits, with a mean concentration of 0.64 mg 100 mL⁻¹ aa. Low concentrations of acrolein were also observed by Vilela et al. (2021), who determined the acrolein content in 20 samples of cachaça produced in the state of Paraíba, Brazil, and the concentration in all the samples was lower than 1.0 mg 100 mL⁻¹ aa. This result is similar to that obtained by Teixeira et al. (2019) when they evaluated the quality of cachaças produced by the fermentation of sugarcane juice subjected to different treatments, where this aldehyde was not detected in any sample. When evaluating the effect of using selected and unselected yeasts for cachaça production, Ribeiro et al. (2017) detected acrolein only in the beverage that involved unselected yeasts, and the average concentration was 12.17 mg 100 mL⁻¹ aa. As in the present study, Masson et al. (2012) also observed a great variability of the acrolein content in 71 samples of cachaça produced in different regions of the state of Minas Gerais, Brazil. They obtained results that ranged from 0 to 25.97 mg 100 mL⁻¹ aa, showing that approximately 10.0% of these samples contained concentrations of acrolein greater than the limit established by national legislation. To evaluate the acrolein contents in six samples of sugarcane spirit stored in different wooden barrels, Santiago et al. (2012) observed that the concentration of this compound ranged from below the limit of quantification to 6.57 mg 100 mL⁻¹ aa, and only the sample stored in cinnamon laurel barrels for 42 months contained a concentration greater than the legal limit. Previously, Zacaroni et al. (2011) evaluated the levels of acrolein in 12 samples of cachaça and observed values that ranged from undetected to 7.45 mg 100 mL⁻¹ aa. Souza et al. (2009) analyzed 30 samples of cachaça produced by a cooperative in Rio de Janeiro, Brazil, and found that acrolein levels were between undetected and 7.9 mg 100 mL⁻¹ aa, with only one sample being irregular in terms of the legal limit.

In all these studies in which acrolein was detected in cachaças and sugarcane spirits, the authors attributed the formation of this contaminant to the dehydration of glycerol catalyzed by metals and acids and the contamination of the fermentation must by bacteria such as *Bacillus amaryllus* and *Lactobacillus colinoides* that are capable of synthesizing enzymes that degrade glycerol. In both processes, glycerol is converted to 3-HPA and subsequently transformed into acrolein by dehydration (Figure 1). The aging process can also lead to an increase in the concentration of glycerol that will give rise to acrolein, depending

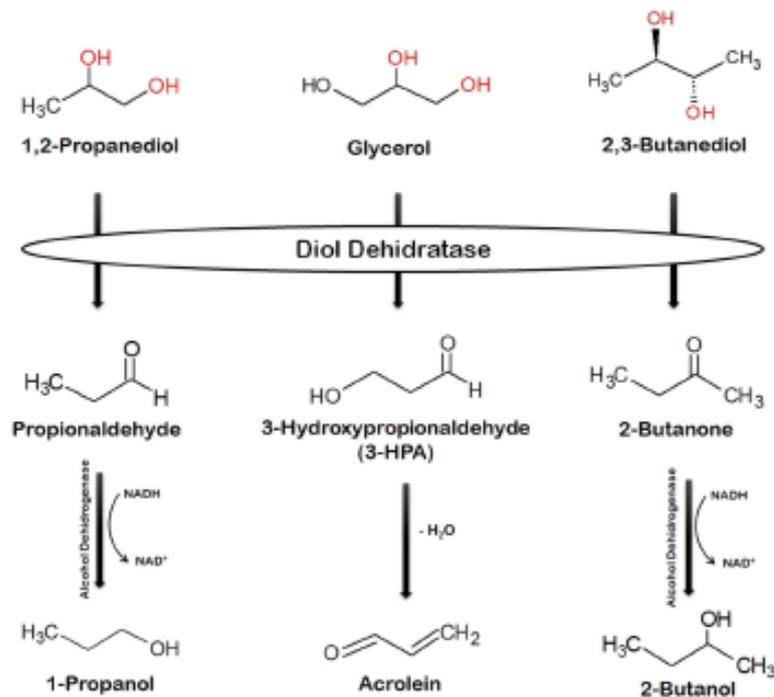


FIGURE 1 Metabolic pathways for the production of propan-1-ol, acrolein, and butan-2-ol from the enzymatic conversion of substrates with similar chemical structures in bacteria of the genus *Lactobacillus*.

on the physicochemical characteristics of the beverage and storage conditions (Caetano et al., 2022; Masson et al., 2012; Ribeiro et al., 2017; Santiago et al., 2012; Souza et al., 2009; Zacaroni et al., 2011). However, despite this knowledge regarding the presence of acrolein and the possible mechanisms of formation in the beverage, there is still no consensus regarding how it occurs and what interferes with its formation process.

PCA was performed with the results obtained in the physical-chemical and chromatographic analyses (Tables 1 and 2) to investigate possible correlations between the presence of acrolein and the other variables analyzed in this work. The results of the PCA analysis are shown in the biplot graph in Figure 2. The two principal components explained only 44.84% of the total variance present in the data set.

The first principal component (PC1) explains approximately 25% of what is happening to the data. This low value is associated with the high number of variables used, 17 in total. According to Bro and Smilde (2014), it is expected that each variable varies independently of the other; therefore, each original variable would explain $100\%/17 = 5.9\%$ of the variation. Therefore, this first component can be

considered to represent the summary of information corresponding to four to five variables. Furthermore, the variables acrolein, butan-2-ol, butan-1-ol, and propan-1-ol (Figure 2) correspond to the correlation and directionality with PC1.

By analyzing the interrelationships of acrolein with the other variables using the two-dimensional representation in Figure 2, it was inferred that the higher alcohols butan-1-ol, butan-2-ol and propan-1-ol had a strong positive correlation with this aldehyde because their vectors are located in the same quadrant, close to the acrolein vector. This fact indicates that samples that contain high concentrations of acrolein also tend to contain high concentrations of these alcohols. The alcohol concentration variable, despite being in the same quadrant as acrolein, is not very relevant in explaining the results, as can be seen by the size of its vector (Bro & Smilde, 2014; Buvé et al., 2022).

The acidity parameter (Figure 2) can be considered to correlate with the presence of acrolein in the samples. Its vector is close to that of acrolein, with an angle of less than 90° , and it is also of great relevance for explaining the variability of the data. In addition, the concentration of acids

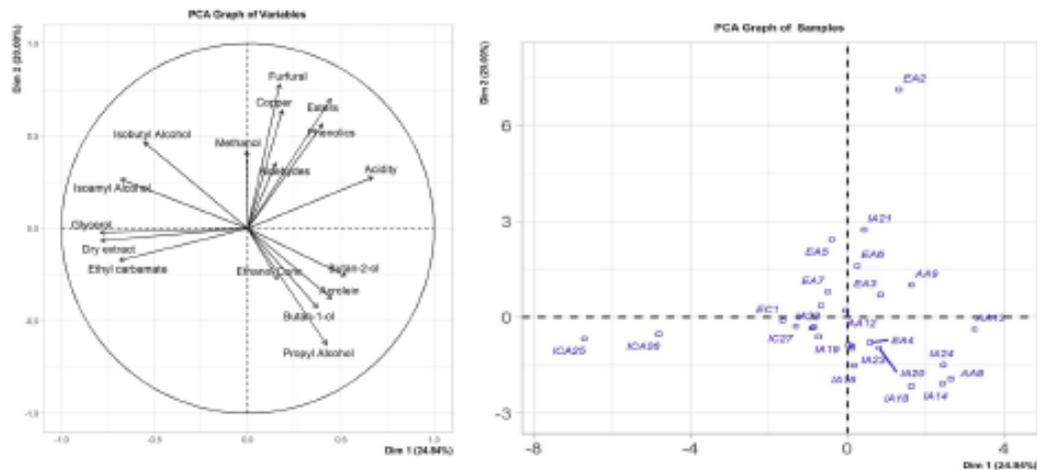


FIGURE 2 PCA1 x PCA2 biplot graph of scores and loadings of the variables referring to the physicochemical composition of cachaça and sugarcane spirits.

in cachaça can explain the low pH during the distillation of the fermented must, a condition that can interfere with the formation of acrolein through the dehydration of glycerol caused by heating (Bro & Smilde, 2014; Y. Wang et al., 2019; Xu et al., 2021).

The phenolic and glycerol concentrations did not have a strong correlation with the acrolein content in the beverages, as is shown in Figure 2. However, according to the literature, these compounds can influence the formation of acrolein. Glycerol is the main precursor of acrolein, and despite being present in low concentrations in cachaça/spirits that are not stored for a long period in wooden barrels, it tends to increase throughout this process. Depending on the conditions, it can be converted to acrolein (Abdullah et al., 2022; Bauer, Cowan, et al., 2010; Bortoletto et al., 2016; Lima et al., 2022; Tábua et al., 2020).

Phenolic compounds are considered to be markers for the cachaça storage process in wooden barrels because their concentration tends to increase over the storage period. Aged and stored beverages that contain high concentrations of phenolic compounds and low concentrations of glycerol can indicate that, at some point during storage, glycerol was extracted from the wood, but this compound was degraded to produce other substances. In addition, some phenolic compounds can react with acrolein to reduce its bioavailability in cachaça/spirits and produce unpleasant flavors (Barbosa, Santiago, et al., 2022; Bauer, Cowan, et al., 2010; Lago & Walke, 2019; Rodrigues et al., 2016; D. Zhang et al., 2020). Phenolic compounds and glycerol were also considered for further investigation.

The variables copper, aldehydes, furfural, and methanol, as well as the alcohol concentration, had little relevance

to explain the variability of the data, as can be seen by the size of their vectors in Figure 2. These parameters, in the same way as the dry extract, ethyl carbamate and ester variables have little or no correlation with the acrolein variable. In addition, there is no information in the literature that attributes any relationship with the formation of acrolein in cachaça to these parameters. Therefore, these compounds were not considered for a second investigation.

Isobutyl and isoamyl alcohols are negatively correlated with the presence of acrolein (Figure 2). That is, samples with high concentrations of these compounds tend to have low concentrations of acrolein. This fact can be observed in the EA1, EA5, IA19, IA22, and ICA25 samples, which contained the highest concentrations of isobutyl and isoamyl alcohols, and the acrolein concentrations were lower than the maximum legal limit (Table 1).

The variables acrolein, volatile acidity, phenolics, glycerol, butan-1-ol, butan-2-ol, and propan-1-ol were selected for a new PCA, seeking to improve the explanation of data variance and to favor the observation of possible correlations. The selection was based on the loadings obtained in the PCA presented in Figure 2, considering those parameters that are most relevant and that can possess a strong correlation with the presence of acrolein in the cachaça. In addition, those parameters that, according to the references, were also considered for the selection can influence or contribute to the formation of acrolein during the production of cachaça/spirits (Masson et al., 2012; Ribeiro et al., 2017; Santiago et al., 2012; Souza et al., 2009; Zacaroni et al., 2011).

The PCA with the selected variables is presented in Figure 3. The first PC explained 40.97% of the variance

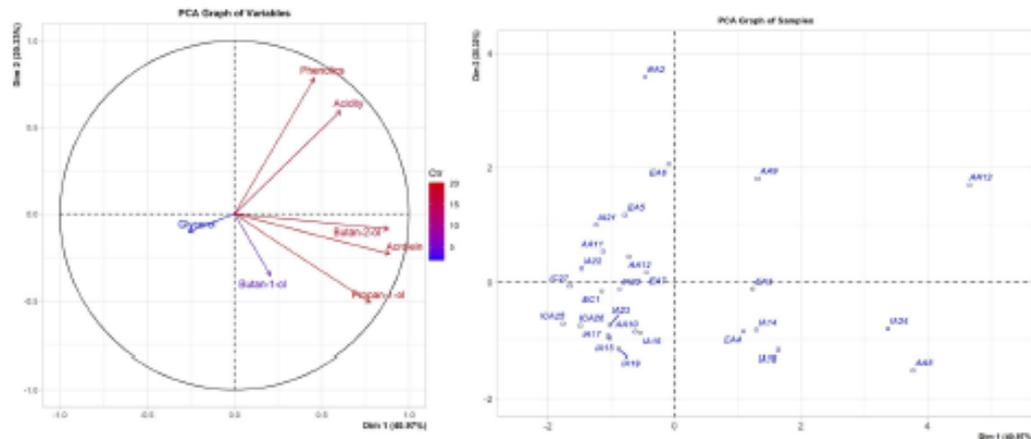


FIGURE 3 PCA1 × PCA2 biplot graph of scores and loadings of variables related to acrolein formation in sugarcane cachaças and spirits.

of the results, whereas the second PC was responsible for 20.33%. One can infer that there is a strong direct positive relationship between the presence of butan-2-ol and acrolein contaminants. That is, samples that contain high concentrations of acrolein tend to contain high concentrations of butan-2-ol, such as samples AA13, IA24, and AA8 (Table 2).

The correlation between the presence of these two compounds in cachaça can be associated with the origin of both. The formation of butan-2-ol is related to bacterial contamination of the fermentation wort. Bacteria of the *Lactobacillus* genus are able to form this alcohol by enzymatic reduction of 2,3-butanediol or, spontaneously, via oxidative degradation of 2,3-butanediol (Figure 1). These enzymatic reactions occur in two consecutive steps. Initially, the 2,3-butanediol is dehydrated to 2-butanone by the action of the enzyme diol dehydratase; then, 2-butanone is reduced to 2-butanol by an alcohol dehydrogenase. The concentration of this toxic compound can negatively influence the taste of the beverage, and it is indicative of bacterial deterioration of the raw material (Diéguez et al., 2005; González et al., 2011; Russmayer et al., 2019; Silva et al., 2000; Spaho et al., 2013). As with butan-2-ol, lactic acid bacteria belonging to the genus *Lactobacillus* are associated with the formation of acrolein because they are capable of converting glycerol into 3-HPA through anaerobic activity involving the action of the diol dehydratase enzyme (Bauer, du Toit, et al., 2010; Lima et al., 2022; Xu et al., 2021). In other words, the contamination of the must by bacteria of the *Lactobacillus* genus might be responsible for the presence of these two compounds in the cachaça/sugarcane spirits. This same behavior was observed in the samples analyzed by Ribeiro et al. (2017)

in which the cachaças that had the highest concentrations of acrolein (10.77 and 13.56 mg 100 mL⁻¹ aa) also contained the highest concentrations of butan-2-ol (14.61 and 33.64 mg 100 mL⁻¹ aa).

There was also a strong correlation of the concentration of propan-1-ol with that of acrolein (Figure 3). This higher alcohol is a desirable compound when present in adequate concentrations because it contributes to a pleasant sensory profile. Propan-1-ol can be formed during fermentation by yeast metabolism. Throughout this process, the production and concentration of this alcohol can change, tending to increase with increasing quantity of nitrogen sources and fermentation time. The presence of bacteria in the fermentation must can also contribute to the presence of this alcohol in the beverage. Some species are capable of producing propan-1-ol under anaerobic conditions through the enzymatic conversion of 1,2-propanediol to propionaldehyde, which is converted to propan-1-ol through the action of alcohol dehydrogenase (Figure 1). Furthermore, this alcohol can be produced through the hydrogenation of acrolein and the hydrogenolysis of 1,2-propanediol and 1,3-propanediol. These reactions can be catalyzed by metals such as copper and, mainly, by acidic medium (Cardoso, 2020; Russmayer et al., 2019; Y. P. Wang et al., 2021, 2019; Wu et al., 2021). As can be seen in Tables 1 and 2, samples AA8, AA13, IA18, and IA24 contained the highest concentrations of propan-1-ol and acrolein. A similar result was observed by Ribeiro et al. (2017), where the samples that had the highest levels of acrolein, mean value of 12.17 mg 100 mL⁻¹ aa, also contained the highest concentrations of propan-1-ol, mean concentration of 133.23 mg 100 mL⁻¹ aa. In the study performed by Teixeira et al. (2019), the cachaça samples analyzed had low

concentrations of propan-1-ol, mean value of 13.51 mg 100 mL⁻¹ aa, and acrolein was not found in any of them.

Among the compounds that most closely correlate with the presence of acrolein because they are close to this variable in the biplot plot of Figure 3, butan-1-ol is the one with the least relevance in explaining the data. Among all the samples that contained the highest concentrations of acrolein (Table 2), only the IA14 sample contained concentrations of butan-1-ol greater than the legal limit. This sample also contained a high concentration of volatile acids. The presence of these three compounds in high concentrations in this sample can be attributed to the contamination of the must by bacteria because butan-1-ol, as well as volatile acids and acrolein, is associated with the presence of bacteria in the fermentation must (Cardoso, 2020; Lima et al., 2022; Spaho et al., 2013).

The volatile acidity in cachaça is expressed in mg of acetic acid 100 mL⁻¹ of aa. Excess acids in the beverage can impair the sensory quality of the final product, and they can be related to contamination of the fermentation must, mainly by acetic bacteria (Cardoso, 2020; Lima et al., 2022). As seen in Figure 3, there is a slight correlation of acidity with the presence of acrolein in the samples. That is, samples of cachaça with high concentrations of acrolein can have higher acidity, such as samples AA13, AA14, and IA24 (Table 1). According to Xu et al. (2021), spontaneous dehydration of 3-HPA is favored to produce acrolein under acidic conditions or at temperatures above 20°C.

Abdullah et al. (2022) reported that acrolein can be formed from the dehydration of glycerol under conditions that involve high temperatures, acidic medium, and metallic catalysts; conditions similar to these can be found during the distillation of cachaça/cane spirits. The authors reported that acids can protonate glycerol and produce the 1,3-dihydroxypropene intermediate, which, after keto-enol rearrangement, produces 3-HPA. This result corroborates that obtained by Santiago et al. (2012), where the sample with the highest content of volatile acids (67.60 mg 100 mL⁻¹ aa) also contained the highest concentration of acrolein (6.57 mg 100 mL⁻¹ aa). Cachaça samples studied by Ribeiro et al. (2017), in which higher concentrations of acrolein were quantified (10.77 and 13.56 mg 100 mL⁻¹ aa), also contained high levels of volatile acids (109.7 and 117.7 mg 100 mL⁻¹ aa).

The presence of glycerol in the cachaça samples, as observed in Figure 3, did not present a great relevance to explain the variability of the data, and its quantification in the beverage has a low correlation with the detection of acrolein. That is, the quantification of glycerol should not be an indicator of the presence of acrolein in cachaça. Glycerol, after ethanol and carbon dioxide, is one of the main products formed during the fermentation of sugarcane juice by yeast. The overproduction of glycerol

during fermentation can be favored, depending on the strain of *Saccharomyces cerevisiae* used, the physicochemical conditions of the must, and the presence of other microorganisms, such as *Lactobacillus*. The glycerol produced in excess during the cachaça production process can be degraded or dehydrated, giving rise to other compounds such as acrolein, propan-1-ol and butan-2-ol, as can be seen in Figure 1 (Abdullah et al., 2022; Bauer, du Toit, et al., 2010; Lima et al., 2022; Serafim et al., 2013; Xu et al., 2021). Thus, one can infer that the concentration of glycerol tends to be low in samples where there is a high concentration of these compounds, as can be seen in Tables 1 and 2 for samples EA4, AA8, AA13, IA18, and IA24, which have high concentrations of acrolein, butan-2-ol, and propan-1-ol and a low concentration of glycerol.

A low correlation with the presence of acrolein in the samples was observed for the levels of total phenolic compounds expressed in mg equivalent of gallic acid L⁻¹ (Figure 3). The concentrations of phenolic compounds, together with that of glycerol, tend to increase during the storage of cachaça and sugarcane spirits in wooden barrels because of the extraction of both compounds from the raw material used in the manufacture of the barrels. Phenolic compounds can act as markers of the aging process, and they can indicate an increase in glycerol at this stage. This glycerol can be degraded during storage to produce acrolein and other compounds, depending on environmental conditions such as temperature and the composition of the beverage, such as acid concentration (Figure 1) (Abdullah et al., 2022; Barbosa, Santiago, et al., 2022; Rodrigues et al., 2016; Y. Wang et al., 2019; Xu et al., 2021). It can be seen in Tables 1 and 2 that the sample AA13, stored in a wooden barrel, contained the highest concentration of phenolic compounds (130.43 ± 4.95 mg L⁻¹) and also the highest concentration of acrolein (19.19 ± 0.40 mg 100 mL⁻¹ aa). When quantifying phenolic compounds and acrolein in cachaça samples stored in different wooden barrels, Santiago et al. (2012) observed that the sample that had the highest concentration of phenolic compounds (23.92 mg L⁻¹) also contained the highest concentration of acrolein (6.57 mg 100 mL⁻¹ aa).

Like acrolein, the formation of those compounds that had the principal correlations with the presence of this contaminant is related to the contamination of the fermentation must by bacteria, mainly bacteria of the genus *Lactobacillus*. As can be seen in Figure 1, bacteria of this genus have the same metabolic pathway capable of converting different substrates with similar chemical structures containing at least one vicinal diol, giving rise to compounds such as acrolein, propan-1-ol, and butan-2-ol. These bacteria can survive under specific fermentation conditions, such as high ethanol concentration, presence of sulfur dioxide, low pH, and nutritional scarcity

(Carpena et al., 2021; Russmayer et al., 2019; Xu et al., 2021). To avoid conditions that favor the proliferation of these microorganisms and, consequently, obtain high quality products that are suitable for commercialization and do not pose risks to the health of consumers, cachaça producers must adopt good manufacturing practices and efficient control of the quality of the yeast (“pé-de-cuba”) used throughout the production process.

4 | CONCLUSION

The presence of acrolein in cachaça and sugarcane spirits can be attributed to chemical degradation and enzymatic conversion of glycerol. The identification of this aldehyde in beverages can be correlated with that of other compounds that comprise the beverage, such as butan-2-ol, propan-1-ol, and volatile acids. The formation of all these compounds is associated with contamination of the fermentation wort by bacteria of the genus *Lactobacillus* and with reactions involving glycerol. In addition, the presence of phenolic compounds also had a slight correlation with the formation of acrolein and can indicate that there was an increase in glycerol concentrations during the storage of the beverage in wooden barrels, which can form this contaminant under appropriate conditions.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Gabriela Fontes Alvarenga: Conceptualization; Investigation; Writing – original draft; Methodology; Writing – review & editing; Formal analysis. **Ana Maria de Resende Machado:** Conceptualization; Writing – original draft; Methodology; Writing – review & editing. **Richard Bispo Barbosa:** Investigation; Methodology. **Vanuzia Rodrigues Fernandes Ferreira:** Investigation; Methodology. **Wilder Douglas Santiago:** Investigation; Methodology. **Maria Luiza Teixeira:** Investigation; Methodology. **David Lee Nelson:** Writing – review & editing; Investigation; Methodology. **Maria das Graças Cardoso:** Conceptualization; Investigation; Funding acquisition; Writing – original draft; Methodology; Writing – review & editing; Formal analysis; Project administration; Resources; Supervision.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are thankful for the scholarships and financial support and thank the Central of Analysis and Chemical Prospecting of the Federal University of Lavras for supplying the equipment for chromatographic analyses. The authors would also like to thank the producers who provided the samples. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG—Project CAG/APQ 0,2390/2018), the Conselho Nacional

de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq—Project CNPQ 311,883/2022-0) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance code 001) for the scholarships.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ORCID

Maria das Graças Cardoso  <https://orcid.org/0000-0001-8075-1725>

REFERENCES

- Abdullah, A., Abdullah, A. Z., Ahmed, M., Khan, J., Shahadat, M., Umar, K., & Alim, M. A. (2022). A review on recent developments and progress in sustainable acrolein production through catalytic dehydration of bio-renewable glycerol. *Journal of Cleaner Production*, 341, 130876. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.130876>
- Amerine, M. A., & Ough, C. S. (1980). *Methods for analysis of musts and wines*. Wiley.
- Anjos, J. P. D., Cardoso, M. G., Saczk, A. A., Zacaroni, I. M., Santiago, W. D., Dórea, H. S., & Machado, A. M. D. R. (2011). Identification of ethyl carbamate during the aging of cachaça in an oak barrel (*Quercus* sp) and a glass vessel. *Química Nova*, 34, 874–878.
- Barbosa, R. B., Magriotis, Z. M., Gândara, A. P. A., Santiago, W. D., Alvarenga, G. F., Brandão, R. M., Oliveira, R. E. S., Caetano, A. R. S., Nelson, D. L., & Cardoso, M. G. (2022). Kinetic, thermodynamic and physical-chemical study of the removal of copper from cachaça using coconut fibers. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 39, 1544–1554. <https://doi.org/10.1080/19440049.2022.2096930>
- Barbosa, R. B., Santiago, W. D., Alvarenga, G. F., da Silva Oliveira, R. E., Ferreira, V. R. F., Nelson, D. L., & Cardoso, M. G. (2022). Physical-chemical profile and quantification of phenolic compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons in cachaça samples aged in Oak (*Quercus* sp.) barrels with different heat treatments. *Food and Bioprocess Technology*, 15, 1977–1987. <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02853-w>
- Bauer, R., Cowan, D. A., & Crouch, A. (2010). Acrolein in wine: Importance of 3-hydroxypropionaldehyde and derivatives in production and detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), 3243–3250. <https://doi.org/10.1021/jf904111z>
- Bauer, R., du Toit, M., & Kossmann, J. (2010). Influence of environmental parameters on production of the acrolein precursor 3-hydroxypropionaldehyde by *Lactobacillus reuteri* DSMZ 20016 and its accumulation by wine lactobacilli. *International Journal of Food Microbiology*, 137(1), 28–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.012>
- Bortoletto, A. M., Corrêa, A. C., & Alcarde, A. R. (2016). Fatty acid profile and glycerol concentration in cachaças aged in different wood barrels. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(2), 293–298. <https://doi.org/10.1002/jib.313>
- Brazil. (2005a). *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. Instrução normativa n.13, de 29 de junho de 2005.* [Technical regulation for setting identity and quality standards for sugarcane brandy and cachaça. Normative Instruction n.13, of June 29, 2005]. Diário Oficial da União, June 30, 2005. Portuguese.

- Brazil. (2005b). *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Aprova o Manual Operacional de Bebidas e Vinagres. Instrução normativa n.24, de 08 de setembro de 2005.* [Approves the Beverages and Vinegars Operational Manual. Normative Instruction No. 24, of September 8, 2005]. Diário Oficial da União, Setembro 30, 2005. Portuguese.
- Bro, R., & Smilde, A. K. (2014). Principal component analysis. *Analytical Methods*, 6(9), 2812–2831. <https://doi.org/10.1039/c3ay41907j>
- Buvé, C., Saeys, W., Rasmussen, M. A., Neckebroek, B., Hendrickx, M., Grauwet, T., & Ann, V. A. N. (2022). Application of multivariate data analysis for food quality investigations: An example-based review. *Food Research International*, 151, 110878. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110878>
- Caetano, D., Gonçalves Lima, C. M., Lima Sanson, A., Faria Silva, D., de Souza Hassemer, G., Verruck, S., Gregório, S. A., Silva, G. A., Afonso, R. J. C. F., Coutrim, M. X., Batiha, G. S., & Simal-Gandara, J. (2022). Chemical fingerprint of non-aged artisanal sugarcane spirits using Kohonen artificial neural network. *Food Analytical Methods*, 15(4), 890–907. <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02160-8>
- Cardoso, M. G. (2020). *Produção de aguardente de cana* (5th ed.). UFPA Portuguese.
- Carpena, M., Fraga-Corral, M., Otero, P., Nogueira, R. A., Garcia-Oliveira, P., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2021). Secondary aroma: Influence of wine microorganisms in their aroma profile. *Foods*, 10(1), 51. <https://doi.org/10.3390/foods10010051>
- Carvalho, D. G., Ranzan, L., Trierweiler, L. F., & Trierweiler, J. O. (2020). Determination of the concentration of total phenolic compounds in aged cachaça using two-dimensional fluorescence and mid-infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 329, 127142. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127142>
- Chang, X., Wang, Y., Zheng, B., Chen, Y., Xie, J., Song, Y., Ding, X., Hu, X., Hu, X., & Yu, Q. (2022). The role of acrolein in neurodegenerative diseases and its protective strategy. *Foods*, 11(20), 3203. <https://doi.org/10.3390/foods11203203>
- Cravo, F. D. C., Santiago, W. D., Lunguinho, A. S., Barbosa, R. B., Oliveira, R. E. S., Alvarenga, G. F., Santos, S. D., Souza, R. H. Z., de Souza, E. C., de Almeida, K. J., de Souza, J. A., Nelson, D. L., & Cardoso, M. G. (2019). Composition of cachaças produced from five varieties of sugarcane and the correlation of the presence of dhurrin in the cane with that of ethyl carbamate in the product. *American Journal of Plant Sciences*, 10(2), 339–350. <https://doi.org/10.4236/ajps.2019.102025>
- Crowley, L. N., Le, B. L., Cicalo, C., Brown, J., Li, Y., Kim, Y. J., Lee, J. H., Pan, J. H., Lennon, S. L., Han, B. K., & Kim, J. K. (2022). Acrolein, an environmental toxicant and its applications to in vivo and in vitro atherosclerosis models: An update. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 93, 103890. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103890>
- de las Heras, E., Zuriarrain-Ocio, A., Zuriarrain, J., Bordagaray, A., Dueñas, M. T., & Berregi, I. (2020). Quantitative determination of acrolein in cider by 3H NMR spectrometry. *Foods*, 9(12), 1820. <https://doi.org/10.3390/foods9121820>
- Diéguez, S. C., De La Pena, M. L. G., & Gómez, E. F. (2005). Volatile composition and sensory characters of commercial Galician orujo spirits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6759–6765. <https://doi.org/10.1021/jf040467j>
- Drakula, S., Novotni, D., Mustać, N. Č., Voučko, B., Krpan, M., Hruškar, M., & Čurić, D. (2019). A simple HS-SPME/GC-MS method for determination of acrolein from sourdough to bread. *Food Analytical Methods*, 12(11), 2582–2590. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01612-6>
- González, E. A., Agrasar, A. T., Castro, I. M. P., Fernández, I. O., & Guerra, N. P. (2011). Solid-state fermentation of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) and arbutus berry (*Arbutus unedo* L.) and characterization of their distillates. *Food Research International*, 44(5), 1419–1426. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.032>
- Igarashi, K., Uemura, T., & Kashiwagi, K. (2018). Acrolein toxicity at advanced age: Present and future. *Amino Acids*, 50(2), 217–228. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2527-x>
- Jiang, K., Huang, C., Liu, F., Zheng, J., Ou, J., Zhao, D., & Ou, S. (2022). Origin and fate of acrolein in foods. *Foods*, 11(13), 1976. <https://doi.org/10.3390/foods11131976>
- Käthele, M., Monakhova, Y. B., Kuballa, T., & Lachenmeier, D. W. (2014). NMR investigation of acrolein stability in hydroalcoholic solution as a foundation for the valid HS-SPME/GC-MS quantification of the unsaturated aldehyde in beverages. *Analytica Chimica Acta*, 820, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.02.030>
- Lago, I. O., & Welke, J. E. (2019). Carbonyl compounds in wine: Factors related to presence and toxic effects. *Ciência Rural*, 49(8), 1–9. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190349>
- Lima, C. M. G., Benoso, P., de Oliveira Pierezan, M., Santana, R. F., de Souza Hassemer, G., da Rocha, R. A., Dalla Nora, F. M., Verruck, S., Caetano, D., & Simal-Gandara, J. (2022). A state-of-the-art review of the chemical composition of sugarcane spirits and current advances in quality control. *Journal of Food Composition and Analysis*, 106, 104338. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104338>
- Liu, M., Huang, Y., Qin, J., Wang, Y., Ke, B., & Yang, Y. (2019). Inhibition of MAPKs signaling pathways prevents acrolein-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 42(4), 617–622. <https://doi.org/10.1248/bpb.b18-00715>
- Machado, A. M. R., Cardoso, M. G., Saczk, A. A., dos Anjos, J. P., Zacaroni, L. M., Dórea, H. S., & Nelson, D. L. (2013). Determination of ethyl carbamate in cachaça produced from copper stills by HPLC. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1233–1238. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.048>
- Masson, J., Cardoso, M. G., Zacaroni, L. M., Anjos, J. P. D., Saczk, A. A., Machado, A. M. D. R., & Nelson, D. L. (2012). Determination of acrolein, ethanol, volatile acidity, and copper in different samples of sugarcane spirits. *Food Science and Technology*, 32, 568–572. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612012005000075>
- Muguruma, K., Pradipta, A. R., Ode, Y., Terashima, K., Michiba, H., Fujii, M., & Tanaka, K. (2020). Disease-associated acrolein: A possible diagnostic and therapeutic substrate for in vivo synthetic chemistry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 28(24), 115831. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115831>
- Nascimento, R. F., Marques, J. C., Neto, B. S. L., De Keukeleire, D., & Franco, D. W. (1997). Qualitative and quantitative high-performance liquid chromatographic analysis of aldehydes in Brazilian sugar cane spirits and other distilled alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*, 782(1), 13–23.

- Oliveira, R. E. S., Cardoso, M. G., Santiago, W. D., Barbosa, R. B., Alvarenga, G. F., & Nelson, D. L. (2020). Physicochemical parameters and volatile composition of cachaça produced in the state of Paraíba, Brazil. *Research, Society and Development*, 9(7), e504974409. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i7.4409>
- Portugal, C. B., de Silva, A. P., Bortolotto, A. M., & Alcarde, A. R. (2017). How native yeasts may influence the chemical profile of the Brazilian spirit, cachaça? *Food Research International*, 91, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.022>
- Ribeiro, M. L. D., Ferreira, O. E., Teixeira, V., Mutton, M. A., & Mutton, M. J. R. (2017). Tratamento físico-químico do caldo de cana produz cachaça de qualidade. *Revista Ciência Agronômica*, 48, 458–463. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20170053>
- Rodrigues, L. M. A., Cardoso, M. G., Santiago, W. D., Soares, L. I., Passamani, F. R., de Andrade Santiago, J., De Azevedo Lira, N., Nelson, D. L., & Batista, L. R. (2016). Phenolic extracts of cachaça aged in different woods and quantifying antioxidant activity and antifungal properties. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 644–652. <https://doi.org/10.1002/jib.375>
- Russmayer, H., Marx, H., & Sauer, M. (2019). Microbial 2-butanol production with *Lactobacillus diolivorans*. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1594-5>
- Santiago, W. D., Cardoso, M. G., de Andrade Santiago, J., Teixeira, M. L., Barbosa, R. B., Zacaroni, L. M., Sales, P. F., & Nelson, D. L. (2016). Physicochemical profile and determination of volatile compounds in cachaça stored in new oak (*Quercus* sp.), amburana (*Amburana cearensis*), jatoba (*Hymenaea caribouril*), balsam (*Myracylon peraiiferum*) and peroba (*Paratecoma peroba*) casks by SPME-GC-MS. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 624–634. <https://doi.org/10.1002/jib.372>
- Santiago, W. D., Cardoso, M. G., Lunguinho, A. D. S., Barbosa, R. B., Cravo, F. D. C., Goncalves, G. D. S., & Nelson, D. L. (2017). Determination of ethyl carbamate in cachaça stored in newly made oak, amburana, jatobá, balsa and peroba vats and in glass containers. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(4), 572–578. <https://doi.org/10.1002/jib.463>
- Santiago, W. D., Cardoso, M. G., Zacaroni, L. M., dos Anjos, J. P., de Resende Machado, A. M., & Mendonça, J. G. P. (2012). Perfil físico-químico e quantificação de compostos fenólicos e acroleína em aguardentes de cana-de-açúcar armazenadas em tonéis de diferentes madeiras. *Científica*, 40(2), 189–197.
- Serafim, F. A., Seixas, F. R., Da Silva, A. A., Galinaro, C. A., Nascimento, E. S., Buchviser, S. F., Odello, L., & Franco, D. W. (2013). Correlation between chemical composition and sensory properties of Brazilian sugarcane spirits (cachaças). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24, 973–982. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20130125>
- Silva, M. L., Macedo, A. C., & Malcata, F. X. (2000). Steam distilled spirits from fermented grape pomace Revision: Bebidas destiladas obtidas de la fermentación del orujo de uva. *Food Science and Technology International*, 6(4), 285–300.
- Souza, L. M. D., Ferreira, K. S., Passoni, L. C., Bevitori, A. B., Melo, K. V., & Viana, A. R. (2009). Teores de compostos orgânicos em cachaças produzidas na Região Norte Fluminense-Rio de Janeiro. *Química Nova*, 32(9), 2304–2309. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000900012>
- Spaho, N., Dürr, P., Grba, S., Velagić-Habul, E., & Blesić, M. (2013). Effects of distillation cut on the distribution of higher alcohols and esters in brandy produced from three plum varieties. *Journal of the Institute of Brewing*, 119(1–2), 48–56. <https://doi.org/10.1002/jib.62>
- Tábua, M. C. M., Santiago, W. D., Magalhães, M. L., Ferreira, V. R. F., Brandão, R. M., Teixeira, M. L., Pedroso, M. P., de Resende Machado, A. M., Nelson, D. L., & Cardoso, M. G. (2020). Identification of volatile compounds, quantification of glycerol and trace elements in distilled spirits produced in Mozambique. *Journal of Food Science and Technology*, 57(2), 505–512. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04079-9>
- Teixeira, V., Silva, A. F., de Freitas, C. M., de Freitas, L. A., Mendes, F. Q., Tralli, L. F., & Mutton, M. J. R. (2019). Using *Moringa oleifera* Lamarck seed extract for controlling microbial contamination when producing organic cachaça. *International Journal of Food Microbiology*, 308, 108287. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108287>
- Vilela, A. F., Oliveira, L. D. S. C., Muniz, M. B., Mélo, B. C. A. D., Figueiredo, M. J. D., & Vieira Neto, J. D. M. (2021). Assessment of sensory and physical-chemical quality, and potential for certification of cachaças from the state of Paraíba, Brazil. *Food Science and Technology*, 41, 661–668. <https://doi.org/10.1590/1513-0502.13520>
- Vilela, F. J., Cardoso, M. G., Masson, J., & Anjos, J. P. D. (2007). Determination of the physical-chemical composition of homemade cachaças produced in the South of Minas Gerais and their mixtures. *Ciência e Agrotecnologia*, 31(4), 1089–1094. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542007000400022>
- Wang, Y., Xiao, Y., & Xiao, C. (2019). Sustainable value-added C3 chemicals from glycerol transformations: A mini review for heterogeneous catalytic processes. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 27(7), 1536–1542. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2019.03.001>
- Wang, Y. P., Sun, Z. G., Zhang, C. Y., Zhang, Q. Z., Guo, X. W., & Xiao, D. C. (2021). Comparative transcriptome analysis reveals the key regulatory genes for higher alcohol formation by yeast at different α -amino nitrogen concentrations. *Food Microbiology*, 95, 103713. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103713>
- Wu, F., Jiang, H., Zhu, X., Lu, R., Shi, L., & Lu, F. (2021). Effect of tungsten species on selective hydrogenolysis of glycerol to 1, 3-propanediol. *ChemSuschem*, 14(2), 569–581. <https://doi.org/10.1002/cssc.202002405>
- Xu, Z., Lu, Z., Soteyome, T., Ye, Y., Huang, T., Liu, J., Harro, J. M., Kjellerup, B. V., & Peters, B. M. (2021). Polymicrobial interaction between *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae*: Coexistence-relevant mechanisms. *Critical Reviews in Microbiology*, 47(3), 386–396. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1893265>
- Zacaroni, L. M., Cardoso, M. G., Saczk, A. A., Santiago, W. D., Anjos, J. P. D., Masson, J., Duarte, F. C., & Nelson, D. L. (2011). Caracterização e quantificação de contaminantes em aguardentes de cana. *Química Nova*, 34, 320–324. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000200026>
- Zacaroni, L. M., Magriotis, Z. M., Cardoso, M. G., Santiago, W. D., Mendonça, J. G., Vieira, S. S., & Nelson, D. L. (2015). Natural clay and commercial activated charcoal: Properties and application for the removal of copper from cachaça. *Food Control*, 47, 536–544. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.035>
- Zhang, D., Jiang, X., Xiao, L., Lu, Y., Sang, S., Lv, L., & Dong, W. (2020). Mechanistic studies of inhibition on acrolein by myricetin. *Food Chemistry*, 323, 126788. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126788>

- Zhang, X., Jiang, L., Chen, H., Wei, S., Yao, K., Sun, X., Yang, G., Jiang, L., Zhang, C., Wang, N., Wang, Y., & Liu, X. (2022). Resveratrol protected acrolein-induced ferroptosis and insulin secretion dysfunction via ER-stress-related PERK pathway in MIN6 cells. *Toxicology*, 465, 153048. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.153048>
- Zirak, M. R., Mehri, S., Karimani, A., Zeinali, M., Hayes, A. W., & Karimi, G. (2019). Mechanisms behind the atherothrombotic effects of acrolein, a review. *Food and Chemical Toxicology*, 129, 38–53. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.034>

How to cite this article: Alvarenga, G. F., de Resende Machado, A. M., Barbosa, R. B., Ferreira, V. R. F., Santiago, W. D., Teixeira, M. L., Nelson, D. L., & Cardoso, M. D. G. (2023). Correlation of the presence of acrolein with higher alcohols, glycerol, and acidity in cachaças. *Journal of Food Science*, 1–16. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16523>

TERCEIRO CAPÍTULO

COMUNIDADES MICROBIANAS PRESENTES EM CULTURA INICIAL DE ALAMBIQUES PRODUTORES DE CACHAÇA: CORRELAÇÕES COM A COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E VOLÁTIL DAS FRAÇÕES DO DESTILADO

Norma NBR 6022 (ABNT, 2018).

RESUMO

A comunidade microbiana envolvida no processo fermentativo de produção de cachaça reflete na qualidade do produto obtido. Entretanto, informações a respeito desse microbioma em nível de sequenciamento do genoma e seus efeitos na qualidade da bebida ainda são escassas. Objetivou-se nesta pesquisa investigar a diversidade do microbioma que constitui as culturas starters (“pé de cuba”) de quatro alambiques produtores de cachaça, por meio da identificação da comunidade bacteriana e fúngica utilizando a metagenômica do 16S rRNA e ITS, respectivamente; determinar a composição físico-química e volátil das frações de destilação produzida utilizando esses “pés-de-cuba”, avaliar a qualidade da cachaça produzida, e identificar as possíveis correlações entre os microrganismos e os compostos detectados. A única cachaça produzida que estava dentro dos padrões para todos os parâmetros analisados foi obtida do alambique A. Por meio da análise de componentes principais e de agrupamento hierárquico, pode-se inferir que as cachaças produzidas pelos alambiques C e D apresentam composições mais semelhantes, e a cachaça do alambique B continha a composição similar à da fração cauda desse alambique. Os índices de diversidade de Shannon e Chao indicaram maior riqueza e diversidade bacteriana e fúngica no “pé de cuba” do alambique D. A avaliação da similaridade com base na dissimilaridade de Bray-Curtis no nível ASV demonstrou que as amostras A e C são mais similares em relação à comunidade bacteriana; C e D são mais semelhantes em relação à comunidade fúngica. *Lactobacillus* foi o principal gênero bacteriano identificado em todas as amostras, sendo que os gêneros *Wolbachia*, *Zymomonas*, *Acetobacter*, entre outros, também foram identificados; porém, com diferenças em relação à abundância relativa. Entre os gêneros fúngicos, *Saccharomyces* foi o principal nas amostras A e B, e as amostras C e D apresentaram uma grande diversidade. Outros gêneros de fungos foram identificados principalmente em determinadas amostras, como *Cladosporium* em B, *Geastrumia* em C e *Fusarium* em D. A composição volátil das frações cabeça, coração e cauda era constituída majoritariamente de ésteres e álcoois, sendo o acetato de etila, octanoato de etila, decanoato de etila, dodecanoato de etila, hexadecanoato de etila e 3-metil-1-butanol os principais compostos identificados. As amostras da cachaça e das demais frações produzidas nos alambiques demonstraram uma composição físico-química e volátil diversificada, que é influenciada pela presença dos microrganismos que constituem o “pé de cuba”.

Palavras-chave: Aguardente de cana-de-açúcar. Cachaça. Comunidade microbiana. Qualidade físico-química. Compostos voláteis.

1 INTRODUÇÃO

Cachaça, a bebida obtida da fermentação do caldo de cana-de-açúcar seguido da destilação, é uma bebida típica e exclusivamente produzida no Brasil. É a bebida destilada mais consumida no país, além de ser exportada para vários outros países, como Paraguai, Alemanha e os Estados Unidos (BRASIL, 2022a). Após a destilação do mosto de cana-de-açúcar fermentado, a bebida produzida é constituída principalmente de etanol e água. Entretanto, há uma diversidade de compostos secundários oriundos da fermentação que contribuem para as características físico-químicas e sensoriais e são responsáveis por agregar características peculiares ao produto final (CARDOSO, 2020).

A legislação brasileira estabelece critérios e Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ's) para a adequação da cachaça produzida e comercializada. Os PIQ's definem os limites de alguns compostos, desejáveis e indesejáveis, presentes na bebida, como etanol, ácidos voláteis, ésteres, aldeídos, furfural, soma de álcoois superiores (isobutílico + isoamílico + propílico), álcoois *sec*-butílico e butílico, metanol, acroleína, carbamato de etila e cobre (BRASIL, 2022b).

A qualidade e a segurança da cachaça produzida são reflexos da cadeia produtiva e do processo em que está inserida. Basicamente, as etapas de produção da cachaça podem ser divididas em cultivo e colheita da cana-de-açúcar, moagem da cana, filtração e decantação do caldo, diluição e padronização do mosto, fermentação e decantação do mosto fermentado, destilação, armazenamento, envelhecimento e envase. Porém, dentro de cada uma dessas etapas existem variações que podem ocorrer de acordo com estabelecimento produtor, com destaque para as diferenças devido ao tipo de inóculo utilizado na fermentação e equipamentos de destilação empregado (BORTOLETTO; SILVELLO; ALCARDE, 2018; LIMA et al., 2022).

A principal diferença associada à destilação da cachaça é em relação ao tipo de equipamento de destilação. Geralmente, a destilação é realizada em alambiques de cobre ou em colunas de destilação constituídas de aço-inox. Na destilação em alambiques de cobre, o destilado passa por um processo de “corte”, nos quais são separadas três frações: cabeça, coração e cauda, sendo que a fração coração originará a bebida. Além disso, o material da coluna, o cobre, permite que ocorram reações que podem contribuir para a formação de compostos desejáveis e indesejáveis, constituindo o “*bouquet*” ou “*flavour*”, que agregam positivamente as características sensoriais da bebida. Nas destilarias com coluna em aço-inox, não ocorre a separação das frações. Outra diferença está atrelada ao material do destilador, o aço-inox, que é um material inerte que não favorece a ocorrência de reações catalisadas pelo cobre (BARBOSA et al., 2022; LIMA et al., 2022; TENORIO et al., 2023).

A etapa de fermentação pode ser considerada uma das principais responsáveis pela composição físico-química e volátil da cachaça produzida, visto que ocorrem diversas reações bioquímicas resultantes do metabolismo dos microrganismos presentes no processo durante essa etapa. Resultam em uma gama de compostos que constituirão a bebida final. De forma geral, a fermentação de cachaça pode ser reconhecida como uma fermentação descontínua, com inóculo por sistema de corte ou batelada alimentada com reciclo de células, em que parte do caldo decantado é mantido no fundo da dorna para ser utilizado como fermento para a próxima batelada, denominado como “pé de cuba”, ao final de cada ciclo fermentativo (BORTOLETTO; SILVELLO; ALCARDE, 2018; SCHWAN; DIAS, 2020).

A principal variação na forma de condução da fermentação está no tipo de cultura inicial utilizada. Tradicionalmente, os produtores iniciam a fermentação com uma cultura microbiana produzida de forma artesanal, utilizando um pequeno volume do caldo de cana-de-açúcar e outros produtos para enriquecimento, como fubá de milho, arroz, frutas, amido e suco de limão. O substrato é fermentado e adicionado periodicamente de caldo de cana diluído até atingir um volume adequado de inóculo para a dorna de fermentação. Após o início da safra de produção, não ocorre a adição de novas culturas, sendo a fermentação realizada pelos microrganismos presentes no “pé de cuba” e autóctones do caldo de cana e do ambiente de produção. O uso da microbiota natural pode proporcionar uma maior resistência e adaptabilidade dos microrganismos presentes na fermentação, além de agregar características exclusivas à bebida devido às distinções da microbiota local (BREXO et al., 2020; COSTA et al., 2021; PORTUGAL et al., 2016).

Como alternativa de cultura inicial, atualmente há no mercado preparados com mistura de leveduras selecionadas que podem ser utilizadas. Essas cepas são isoladas dos processos de fermentação de cachaça ou de outras bebidas alcoólicas e são selecionadas com base em critérios, como alta capacidade fermentativa, resistência a condições de estresse e qualidade da bebida produzida. A utilização de cepas selecionadas pode proporcionar rápida fermentação, fácil separação da biomassa do vinho, redução da contaminação e proliferação de microrganismos indesejáveis ao longo do processo, adquirindo, portanto, uma padronização do produto obtido (GONÇALVES et al., 2016; MUTTON et al., 2020; SOARES; SILVA; SCHWAN, 2011).

As características da microbiota presente na cultura inicial utilizada na produção de cachaça e os seus efeitos na composição da bebida ainda se restringem a informações obtidas por técnicas de isolamento e identificações que dependem do cultivo dos microrganismos

presentes no “pé de cuba” e no mosto de fermentação (AMORIM et al., 2016; ARAÚJO et al., 2018; BREXO et al., 2020; CARVALHO et al., 2015; DUARTE; AMORIN; SCHWAN, 2013; GOMES et al., 2010; PORTUGAL et al., 2016; PORTUGAL et al., 2017; SCHWAN et al., 2001). Os principais microrganismos associados à produção de cachaça são as leveduras e algumas bactérias, principalmente *Saccharomyces cerevisiae* e outras espécies desse mesmo gênero (*S. exiguous*, *S. paradoxus*, *S. servazzii* e *S. unisporus*), outras leveduras como *Rhodotorula*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Debaromyces*, *Meyerozyma* e *Hanseniaspora* e alguns gêneros bacterianos *Micrococcus*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Clostridium* (ARAÚJO et al., 2018; GUARDADO et al., 2022; PORTUGAL et al., 2017; SCHWAN et al., 2001).

Entretanto, estima-se que apenas 1% dos microrganismos pode ser detectado por metodologias dependentes de cultura devido a condições seletivas e composições de meios específicos (GALIMBERTI et al., 2015; LOPEZ et al., 2020; TORSVIK; ØVREÅS; THINGSTAD, 2002). Por outro lado, a abordagem independente de cultura possibilita o acesso a muitas espécies que ainda não foram cultivadas ou descritas. Técnicas independentes de cultura permitem acessar o genoma de toda à comunidade microbiana de uma amostra (metagenoma), e o sequenciamento de alta cobertura (HCS) tem sido utilizado para sequenciar esse metagenoma e acessar a diversidade microbiana de diferentes tipos de amostras (HERMANSSON; LINDGREN, 2001; LOPEZ et al., 2020; SABATER et al., 2021; SCHLOSS; LARGET; HANDELSMAN, 2004; STUBNER, 2004).

Objetivou-se nesta pesquisa investigar a diversidade do microbioma que constitui as culturas iniciais (“pé de cuba”) de quatro alambiques produtores de cachaça de Minas Gerais, Brasil, identificando a composição da comunidade bacteriana e fúngica por meio de sequenciamento baseado em amplicon, assim como determinar a composição físico-química e volátil das frações de destilação (cabeça, coração e cauda), a qualidade da cachaça produzida (coração) utilizando esse “pé de cuba”, e identificar as possíveis correlações entre os microrganismos presentes na cultura inicial e os compostos analisados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de amostras

As amostras da cultura inicial (“pé de cuba”) e das frações voláteis (cabeça (1), coração (2) e cauda (3)) produzidas utilizando essas culturas foram coletadas em quatro alambiques

produtores de cachaça registrados no estado de Minas Gerais, Brasil. Os alambiques A (21°03'18.4"S 45°00'15.7"W a 900 m de altitude), B (21°12'47"S 45°36'46"W a 860 m de altitude) e D (20°58'07"S 43°15'46"W a 700 m de altitude) utilizam cultura inicial natural (fermento caipira), ou seja, inóculo produzido pelo próprio produtor a partir da microbiota natural da sua propriedade. O produtor C (21°00'24"S 43°18'03"W a 660 m de altitude) utiliza cultura inicial comercial, um preparado de leveduras selecionadas e desidratadas indicadas para a fermentação imediata do caldo de cana-de-açúcar.

As amostras da cultura inicial foram coletadas em frascos estéreis de 80 mL diretamente da dorna de fermentação e transportadas ao laboratório de análise sob refrigeração. Em seguida, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer a -80 °C, até a realização das análises. As amostras das frações voláteis (cabeça, coração e cauda) foram coletadas em frascos de vidro (2 L de cada amostra) nas unidades produtoras após a destilação. Todos os produtores utilizavam para destilação alambiques de cobre. Os cortes para separação de cada fração foram realizados pelos próprios produtores, de acordo com o processo padrão de cada alambique, e coletados após a homogeneização. As amostras foram transportadas ao laboratório de análise e armazenadas em temperatura ambiente ao abrigo da luz.

2.2. Análises físico-químicas e cromatográficas

As análises foram realizadas nas três frações coletadas, cabeça, coração (cachaça propriamente dita) e cauda. As análises físico-químicas foram realizadas segundo estabelecido pelo MAP na Instrução Normativa n° 24 de 8 de setembro de 2005 (BRASIL, 2005). Foram determinados os teores de etanol, acidez volátil, ésteres, aldeídos, furfural, cobre e extrato seco.

A detecção e a quantificação de carbamato de etila e acroleína foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) Shimadzu HPLC, equipado com duas bombas de alta pressão modelo SPD-M20A, um desgaseificador modelo DGU-20A3, uma interface modelo CBM-20A e um injetor automático modelo SIL-10AF. A concentração de carbamato de etila foi determinada segundo Machado et al. (2013) e Santiago et al. (2017) nas amostras previamente derivatizadas com xantidrol, utilizando o detector de fluorescência em comprimentos de onda de excitação e emissão de, respectivamente, 233 e 600 nm, com um fluxo de 0,75 mL min⁻¹, e coluna Agilent-Zorbax Eclipse AAA (4,6 x 150 mm, 5 µm) conectada a uma pré-coluna Agilent-Zorbax Eclipse AAA (4,6 x 12,5 mm, 5 µm). A quantificação de acroleína foi realizada segundo o método de Nascimento et al. (1997), Zacaroni et al. (2011) e

Caetano et al. (2022). A princípio, as amostras foram derivatizadas com 2,4-dinitrophenylhydrazones e analisadas no HPLC acoplado a um detector de matriz de diodos (DAD) SPD-M20A a 365 nm, utilizando um fluxo de $0,9 \text{ mL min}^{-1}$, e coluna de separação Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 ($250 \times 4,6 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$) acoplada a uma pré-coluna Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 ($12,5 \times 4,6 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$).

Os teores dos álcoois superiores desejáveis (3-metilbutan-1-ol, 2-metilpropan-1-ol e propan-1-ol) e dos álcoois indesejáveis (metanol, butan-1-ol e butan-2-ol) foram determinados segundo Vilela et al. (2007) e Santiago et al. (2016), utilizando o cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (GC-FID), com uma coluna de separação DB Wax ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm}$, $0,25 \mu\text{m}$) e gás hidrogênio como gás de arraste a um fluxo de $1,4 \text{ mL min}^{-1}$.

2.3. Análise de compostos voláteis

A análise de compostos voláteis foi realizada nas três frações (cabeça, coração e cauda) segundo Zacaroni et al. (2017). As amostras foram diluídas utilizando água ultrapura a uma concentração etílica de 10% (v v^{-1}). Em seguida, 4 mL de cada amostra foram adicionados a ampolas de 20 mL para a realização da extração dos compostos voláteis a partir da técnica de microextração em fase sólida (SPME) no headspace usando uma fibra DVB/CAR/PDMS (Divinilbenzeno, Carboxen e Polidimetilsiloxano), com uma espessura de filme Supelco de $30\text{-}50 \mu\text{m}$, previamente condicionada por uma hora a $270 \text{ }^\circ\text{C}$, de acordo com as especificações. As condições da extração foram $45 \text{ }^\circ\text{C}$ por 50 min, e dessorção de três minutos. A detecção e quantificação dos compostos voláteis foram realizadas em cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massa GC-MS QP2010 Plus (Shimadzu, Japão), equipado com um injetor automático de líquido e gás AOC-5000 (Shimadzu, Japão), um injetor split/splitless e um injetor de $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm}$; $0,25 \mu\text{m}$ SLBTM coluna (5% fenil - 95% dimetilsiloxano). Utilizou-se uma taxa de aquecimento do forno de $4 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ (35 a $240 \text{ }^\circ\text{C}$). O gás Hélio foi utilizado como gás de arraste com vazão de $1,78 \text{ mL min}^{-1}$. O injetor foi operado no modo Split 1:4 a $270 \text{ }^\circ\text{C}$. O detector utilizado foi de espectrometria de massas por impacto de elétrons a 70 eV, em modo de varredura (29 a 600 Da) com temperatura de interface a $240 \text{ }^\circ\text{C}$ e temperatura da fonte de íons a $200 \text{ }^\circ\text{C}$. O filamento foi ligado a 1.75 min. A identificação dos compostos foi baseada na comparação do espectro de massa obtido com uma biblioteca espectral GC-MS (Wiley 8 e FFNSC 1.2). Os índices de retenção experimentais foram calculados e comparados com as informações disponíveis em literatura (ADAMS, 2017; Instituto Nacional de Padrões e

Tecnologia, NIST, 2023). Consideraram-se idênticas as comparações com similaridades superiores a 70%, e os índices experimentais foram calculados usando uma série homóloga de alcanos.

2.4. Contagem de bactérias e fungos cultiváveis

As contagens de bactérias aeróbicas e fungos cultiváveis foram realizadas pela técnica de plaqueamento, segundo o método proposto por Ceccato-Antonine (2012) com adaptações. As amostras de cultura inicial dos quatro produtores previamente homogeneizadas foram diluídas em água peptonada 0.1% estéril e plaqueadas em meio de cultura ágar Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) para fungos, e Ágar de Contagem de Placas (PCA) para bactérias. As placas para contagem de fungos foram incubadas a 30 °C por cinco dias, e as placas para contagem de bactérias foram incubadas a 37 °C por 3 dias. A contagem foi realizada em placas contendo entre 20 e 200 UFC mL⁻¹ e os resultados são expressos em médias de log UFC mL⁻¹.

2.5. Extração de DNA

As amostras de cultura inicial (1,5 mL) dos produtores A, B, C e D foram previamente centrifugadas em microtubos de 2 mL a 16000 G por cinco minutos, para concentração da biomassa; o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi utilizado para extração do DNA (GAROFALO et al., 2020). O DNA foi extraído utilizando o kit Pure Link™ Microbiome DNA Purification Kit (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído foi armazenado em ultrafreezer a -80 °C.

2.6. Sequenciamento do DNA e análise de bioinformática

As regiões variáveis V3/V4 do gene 16S rRNA para bactérias e região IST1 para fungos foram amplificadas utilizando os primers: 16S rRNA, 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') e 806R (3'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-5') e IST1, ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS2 (3'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC5-'). Os produtos de PCR purificados foram quantificados e qualificados utilizando AATI Fragment

Analyzer. O sequenciamento foi realizado utilizando a plataforma de sequenciamento Illumina NovaSeq (PE x 250).

As sequências brutas foram processadas (filtragem de qualidade, corte e remoção de ruído) utilizando o pacote DADA2 no software R. As sequências foram filtradas por tamanho e qualidade usando 20 nucleotídeos para tamanho mínimo e $Q > 20$ para o mínimo de score de qualidade Phred. As leituras de alta qualidade foram, então, analisadas para a identificação das Variantes de Sequência de Amplicon (ASVs) presentes nas amostras (CALLAHAN et al., 2016). As leituras foram classificadas taxonomicamente usando o banco de dados Silva SSU v.138 para bactérias (<http://www.arb-silva.de>), e o banco de dados Unite 9.0 para fungos (ABARENKOV et al., 2022). Os ASVs não atribuídos foram descartados para identificação taxonômica e os dados foram transformados em abundância relativa.

2.7. Análises estatísticas

As diferenças nas comunidades fúngicas e bacterianas foram calculadas usando os índices de diversidade alfa (Shannon, Chao, Dominância e Equitabilidade) e beta (Análise de Coordenadas Principais (PcoA) e dendrograma da matriz de distância Bray-Curtis) no nível ASV, usando o software Past4 (Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis) (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001). Gráficos de barras e mapas de calor para níveis taxonômicos foram elaborados utilizando o pacote “mctoolsr” no software R.

As análises físico-químicas, cromatográficas e de contagem de bactérias e leveduras foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. A contagem dos microrganismos foi submetida à comparação por meio da análise de variância (ANOVA) e teste de médias, Tukey, a 95% de significância. A Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise Agrupamento Hierárquico, baseada na composição físico-química das frações voláteis, foram realizadas utilizando o software R para verificar a similaridade entre as amostras e frações. A correlação entre os compostos físico-químicos e voláteis, e os gêneros dominantes de bactérias e fungos foi avaliada utilizando o coeficiente de correlação de Spearman com significância estatística ($p < 0,05$). Os resultados da correlação foram convertidos em um mapa de calor. Essas análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R.

3 RESULTADO DE DISCUSSÃO

3.1. Composição físico-química

Os resultados das análises físico-químicas e cromatográficas das frações voláteis (cabeça, coração e cauda) podem ser observados na Tabela 1. Com exceção do metanol, que não foi detectado em nenhuma amostra, as demais variáveis foram utilizadas para a realização da Análise de Componentes Principais (PCA) e de Agrupamento Hierárquico (HCA) (Figura 1). Pode-se observar que não há nenhum “*outlier*” entre as amostras, indivíduos que destoam extremamente dos demais. As duas componentes principais são capazes de expressar significativamente a variabilidade total do conjunto de dados, 71,61%, sendo que a primeira componente principal (Dim 1) explica 50,38% da variabilidade, e a segunda componente principal (Dim 2) explica 21,23% da variabilidade.

A Dim 1 opõe indivíduos como A1 (1), B1 (4), C1 (7) e D1 (10), que são as amostras das frações “cabeça” de cada produtor, localizados à direita do gráfico e caracterizados por uma coordenada fortemente positiva ao eixo, a indivíduos como C3 (9) e D3 (12), amostras das frações “cauda” dos produtores C e D, respectivamente, localizados à esquerda do gráfico, caracterizados por uma coordenada fortemente negativa com a Dim 1. Em relação a Dim 2, ela divide as amostras C2 (8), C3 (9), D2 (11) e D3 (12), que exibem correlação positiva com essa componente, das amostras A2 (2), A3(3), B2(5) e B3(6), que apresentam correlação negativa com a Dim 2 (Figura 1).

Essa divisão entre os grupos de amostras pode ser confirmada pela análise de agrupamento hierárquico (Figura 1), que demonstrou que as amostras estão divididas em três grupos. O *cluster* 1 (verde) é composto pelas amostras da fração cabeça de todos os produtores, A1 (1), B1 (4), C1 (7) e D1 (10). Observa-se na Tabela 1 que as frações cabeça dos quatro produtores apresentaram composições semelhantes. Todas elas continham concentrações elevadas para os teores de etanol, aldeídos (expresso em acetaldeído) e para a soma dos álcoois superiores desejáveis (isopropílico, isoamílico e isobutílico). Concentrações acima do permitido para cachaça para o contaminante butan-2-ol foram quantificadas na fração cabeça dos produtores B, C e D. Além disso, as amostras dos produtores C e D continham concentrações de acroleína também acima do permitido para cachaça. A amostra do produtor C foi a única em que o teor de cobre estava acima do permitido para cachaça na fração cabeça. Os teores de ésteres estavam dentro do limite estabelecido para cachaça em todas as frações.

Porém, as maiores concentrações foram observadas na fração cabeça, com exceção do produtor C.

O *cluster* 2 (preto), composto pelos indivíduos C2 (8), C3 (9), D2 (11) e D3 (12), representam as frações coração e cauda dos produtores C e D. O *cluster* 3 (vermelho), composto pelas amostras A2 (2), A3 (3), B2 (5) e B3 (6), são as amostras das frações coração e cauda dos produtores A e B. Apesar de a fração cabeça ter se diferenciado das demais frações para todos os produtores, as frações coração e cauda não apresentaram o mesmo comportamento, como se observa na análise de *cluster* da Figura 1. No *cluster* 2 e 3, estão agrupadas, a princípio, as frações coração e cauda dos produtores A e B, e dos produtores C e D, respectivamente. Porém, dentro desses *clusters*, ocorre a formação de subgrupos com a separação dessas frações, com exceção das amostras obtidas do produtor B, que as frações coração (B5) e cauda (B6) pertencem ao mesmo subgrupo, indicando que essas amostras apresentam características físico-químicas semelhantes.

A composição físico-química da cachaça obtida na fração coração do produtor A foi o único produto que atendeu aos PIQ's para todos os parâmetros analisados (Tabela 1). A cachaça produzida pelo produtor B continha concentrações acima do permitido para acroleína (5,50 mg 100 mL⁻¹ aa) e butan-2-ol (28,71 mg 100 mL⁻¹ aa); na fração coração do produtor C, foram quantificados teores impróprios de aldeído (38,23 mg 100 mL⁻¹ aa) e acroleína (72,01 mg 100 mL⁻¹ aa); ao passo que a bebida produzida pelo produtor D estava fora dos padrões para os parâmetros aldeídos (55,00 mg 100 mL⁻¹ aa), butan-2-ol (48,87 mg 100 mL⁻¹ aa) e acroleína (69,39 mg 100 mL⁻¹ aa).

A fração cauda do produtor A, C e D apresentaram concentrações reduzidas de etanol (Tabela 1). A composição físico-química da fração cauda do produtor B foi semelhante à fração coração desse produtor, com concentrações inadequadas de acroleína e butan-2-ol, inferindo-se que pode ter ocorrido uma separação incorreta dessas frações. A similaridade entre essas amostras foi confirmada nas análises de ACP e *Cluster* (Figura 1). Foram observadas composições semelhantes entre as frações cauda dos produtores C e D, com elevados teores de acroleína e ácidos voláteis, como se pode observar na Tabela 1 e Figura 1. Além disso, a fração cauda do produtor C continha concentrações acima do permitido estabelecido para cachaça para os teores de aldeídos. Apesar de os teores de furfural estarem dentro do permitido para cachaça em todas as amostras de cauda, percebe-se que houve um aumento no teor desse composto em relação às demais frações para todos os produtores (Tabela 1).

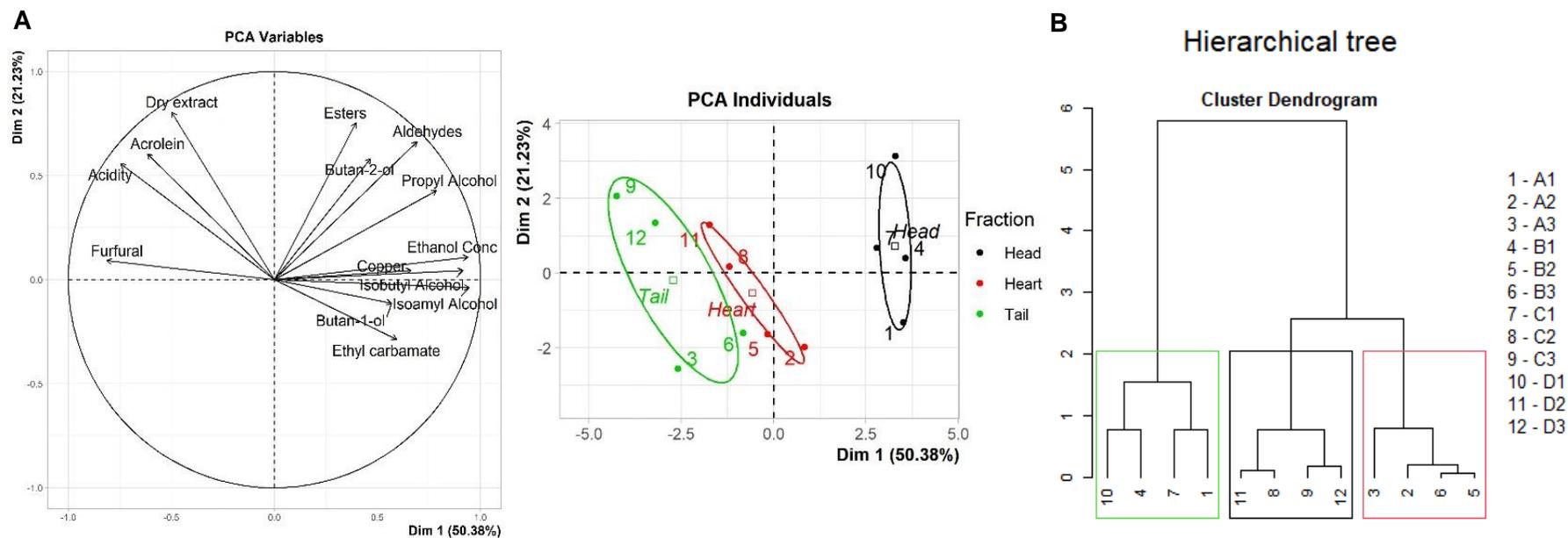
Tabela 1 – Composição físico-química das amostras das frações voláteis cabeça, coração e cauda dos produtores A, B, C, e D.

	A			B			C			D			L*
	Cabeça	Coração	Cauda	Cabeça	Coração	Cauda	Cabeça	Coração	Cauda	Cabeça	Coração	Cauda	
Extrato seco ¹	0,02 ±0,00	0,01 ±0,00	0,02 ±0,00	0,02 ±0,01	0,05 ±0,02	0,03 ±0,01	0,08 ±0,02	0,06 ±0,00	0,15 ±0,01	0,10 ±0,01	0,12 ±0,00	0,15 ±0,02	6,00
Conc. Etanol ²	68,62 ± 0,01	47,42 ±0,01	26,64 ± 0,03	57,07 ± 0,04	42,36 ±0,00	38,14 ±0,06	68,79 ± 0,00	46,14 ±0,14	25,17 ± 0,04	60,47 ± 0,01	43,41 ±0,11	29,80 ± 0,04	38- 48
Acidez ³	16,01 ±0,00	33,09 ±0,00	58,90 ±0,06	68,74 ±0,04	94,45 ±2,62	104,91 ±2,73	62,72 ±1,61	119,02 ±0,36	321,04 ± 4,95	85,62 ±0,02	144,59 ±0,35	268,57 ± 0,32	150
Ésteres ³	119,39 ±0,01	48,53 ±0,01	15,55 ±2,43	138,72 ±2,20	27,16 ±1,54	24,14 ±0,04	131,80 ±0,95	81,79 ±0,25	135,31 ±0,23	129,39 ±0,03	78,47 ±0,19	95,77 ±0,11	200
Aldeídos ³	48,80 ± 1,08	23,62 ±0,00	3,17 ±0,00	105,88 ± 2,03	25,19 ±0,35	24,38 ±0,04	71,56 ± 0,43	38,23 ± 0,44	39,03 ± 0,53	115,99 ± 0,52	55,00 ± 0,82	26,94 ±0,03	30
Álcool Propílico ³	160,15 ±0,76	152,01 ±1,14	81,04 ±4,89	221,76 ±0,69	147,92 ±0,26	125,28 ±11,76	158,65 ±1,04	125,69 ±6,21	78,33 ±0,68	294,98 ±4,14	138,58 ±5,30	130,77 ±3,95	-
Álcool Isobutílico ³	116,70 ±1,39	66,10 ±0,86	8,97 ±0,77	62,29 ±0,82	28,66 ±0,32	20,49 ±1,79	82,24 ±1,82	37,14 ±2,11	8,29 ±0,12	88,42 ±1,31	22,75 ±1,18	6,12 ±0,40	-
Álcool Isoamílico ³	276,34 ±1,03	143,35 ±8,95	17,83 ±2,41	212,15 ±2,83	96,55 ±1,33	71,72 ±6,34	239,40 ±2,06	105,34 ±6,56	18,19 ±0,61	168,88 ±2,20	40,90 ±1,13	9,01 ±0,10	-
Álcoois Superiores ³	553,19 ± 1,66	361,46 ±10,95	107,84 ±8,08	496,20 ± 2,70	273,13 ±1,90	217,49 ±19,89	480,29 ± 4,91	268,17 ±14,89	104,81 ±1,41	552,28 ± 7,65	202,23 ±7,61	145,90 ±4,45	360
Furfural ³	Nd	0,30 ±0,02	2,14 ±0,03	Nd	0,12 ±0,01	0,20 ±0,00	0,13 ±0,01	0,58 ±0,00	2,56 ±0,08	0,04 ±0,00	0,78 ±0,02	1,14 ±0,01	5
Butan-1-ol ³	Nd	1,02 ±0,01	Nd	1,42 ±0,14	0,48 ±0,02	0,58 ±0,09	0,45 ±0,03	0,24 ±0,02	Nd	0,52 ± 0,01	0,14 ±0,02	Nd	3
Butan-2-ol ³	0,98 ±0,04	Nd	Nd	69,26 ± 0,05	28,71 ± 0,20	24,69 ± 1,97	17,02 ± 0,13	5,37 ±0,52	Nd	208,65 ± 2,49	48,87 ± 2,34	8,61 ±0,50	10
Metanol ³	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	20
Acroleína ³	1,46 ±0,01	3,39 ±0,01	3,05 ±0,03	2,03 ±0,01	5,50 ± 0,01	18,15 ± 0,22	27,66 ± 0,57	72,01 ± 0,54	74,32 ± 2,44	20,05 ± 0,02	69,39 ± 0,95	52,45 ± 0,77	5

Carbamato de Etila ⁴	14,28 ±0,93	Nd	Nd	6,56 ±0,09	5,49 ±0,25	< LD	< LQ	Nd	Nd	< LD	Nd	Nd	210
Cobre ⁵	4,99 ±0,09	2,39 ±0,02	3,37 ±0,10	4,42 ±0,09	1,52 ±0,07	1,98 ±0,05	11,41 ±0,02	0,71 ±0,10	0,73 ±0,01	4,44 ±0,13	0,90 ±0,09	1,50 ±0,06	5

1g L-1; 2°GL % v/v; 3mg 100 mL-1 aa; 4µg L-1; 5mg L-1; ND: Não detectado; LQ: limite de quantificação; LD: limite de detecção; Carbamato de etila: LD = 1,71; LQ = 5,69 µg L-1. *Limite estabelecido pela legislação (Brasil, 2022). Valores em negrito estão fora dos PIQ's estabelecidos na legislação para cachaça e aguardente de cana (Brasil, 2022b).

Figura 1 – a) Gráfico da análise de componentes principais representando os *scores* e *loadings* das amostras das três frações voláteis: cabeça (1), coração (2) e cauda (3) produzidas pelos produtores A, B, C, e D. b) Árvore hierárquica com a separação dos *clusters*, baseado na distância Euclidiana das amostras das frações voláteis dos produtores A, B, C, e D.



O processo de destilação em alambiques de cobre tem o intuito de separar a cachaça, fração coração, das demais frações voláteis, cabeça e cauda. Essa separação, quando realizada de forma adequada, acarreta características distintas a esses produtos. Após a separação, a fração cabeça tende a ter as maiores concentrações de compostos com maior afinidade por etanol e água, como os álcoois superiores, ésteres e aldeídos; a fração coração, que originará a cachaça, deve ter a composição físico-química dentro dos limites estabelecidos pelos Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ's) do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAP), por meio da Portaria nº 539, de dezembro de 2022; e a fração cauda tende a apresentar as maiores concentrações de acidez e furfural (BORTOLETTO; SILVELLO; ALCARDE, 2018; BRASIL, 2022b; CARDOSO, 2020; SANTIAGO et al., 2016).

Estudos realizados por Santiago et al. (2016) obtiveram resultados semelhantes àqueles encontrados no presente, estudo ao analisarem a composição físico-química das três frações da produção de cachaça destilada em alambique de cobre. Na fração cabeça, foram encontradas as maiores concentrações de etanol ($57,00 \pm 0,02 \% v v^{-1}$), aldeídos ($69,42 \pm 0,07 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1} \text{ aa}$) e da soma dos álcoois superiores ($275,27 \pm 2,54 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1} \text{ aa}$). Os teores de ésteres ($80,23 \pm 0,03 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1} \text{ aa}$), cobre ($0,69 \text{ mg L}^{-1}$) e butan-2-ol ($1,11 \pm 0,00 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$), apesar de estarem dentro dos limites estabelecidos na legislação brasileira, foram superiores aos das demais frações analisadas. A cachaça (fração coração) estava dentro do limite para todos os parâmetros analisados no estudo. A fração cauda continha teores reduzidos de etanol ($19,56 \pm 0,41 \% v v^{-1}$), e as maiores concentrações de ácidos voláteis ($62,92 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1} \text{ aa}$) e furfural ($2,81 \pm 0,13 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1} \text{ aa}$).

Ao avaliarem a composição de compostos secundários das frações cabeça, coração e cauda de aguardentes produzidas no processo de destilação em alambiques de cobre, Serafim et al. (2012) constataram que o processo de corte influencia acentuadamente nas concentrações dos compostos secundários da cachaça de alambique. Os autores observaram que, na fração cabeça, foram quantificadas elevadas concentrações médias de etanol ($53 \% v v^{-1}$), aldeídos (21 mg L^{-1}), álcoois superiores (2412 mg L^{-1}) e ésteres (498 mg L^{-1}). Entretanto, os autores não constataram concentrações elevadas de acidez e furfural na fração cauda. Em relação à acroleína, esse contaminante estava presente nas frações cabeça e coração, mas em concentrações superiores na fração coração, em média $61,8 \text{ mg L}^{-1}$, ao passo que a fração cabeça continha, em média, $19,3 \text{ mg L}^{-1}$.

Segundo Cardoso (2020), a partir do início do processo de destilação do mosto fermentado, os primeiros compostos a entrarem em ebulição são aqueles de baixa temperatura

de ebulição (TE) e solúveis em álcool, como acetaldeído e acetato de etila. Em seguida, ocorre a ebulição daqueles compostos que são solúveis em álcool, completamente ou parcialmente solúveis em água e que possuem TE inferior a 200 °C, como o metanol e os álcoois superiores propan-1-ol, 2-metil-propan-1-ol, 2-metil-butanol e 3-metil-butanol. Em seguida, ocorre a ebulição dos compostos que estão completamente ou parcialmente solúveis em álcool e possuem elevada TE, como alguns ácidos graxos e seus ésteres. Esses compostos são característicos da fração cabeça e do início da separação da fração coração. Ao final da destilação da fração coração e durante a destilação da fração cauda, ocorre a ebulição dos compostos que são totais ou parcialmente solúveis em água e possuem TE acima da TE da água, como o ácido acético, 2-feniletanol, dodecanoato de etila e succinato de dietila; sendo que os últimos compostos a entrarem em ebulição são aqueles solúveis em água e que apresentam elevada TE, como o furfural. Porém, alguns compostos hidrofílicos, como o furfural e álcoois superiores, podem estar presentes em todas as frações do destilado, independente da TE.

3.2. Contagem de bactérias e fungos

A contagem de bactérias aeróbicas e fungos viáveis presentes nas culturas iniciais (“pé de cuba”) de cada produtor pode ser observada na Tabela 2. Houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as contagens de fungos viáveis presente no “pé de cuba” de todos os alambiques (Tabela 2). A maior contagem de leveduras e fungos filamentosos viáveis ($6,01 \log \text{ UFC mL}^{-1}$) foram observadas na amostra do produtor D, seguido pelo produtor C ($4,81 \log \text{ UFC mL}^{-1}$) e B ($1,76 \log \text{ UFC mL}^{-1}$). A contagem de fungos viáveis do inóculo utilizado pelo alambique A foi inferior a $1,30 \log \text{ UFC mL}^{-1}$, indicando um número extremamente reduzido de células viáveis. Em relação a contagem de bactérias aeróbicas, as menores contagens, em média, $3,77 \log \text{ UFC mL}^{-1}$, foram identificadas nas amostras dos produtores A e B, ao passo que as amostras dos produtores C e D continham, em média, $4,81 \log \text{ UFC mL}^{-1}$.

Tabela 2 – Contagem média de bactérias aeróbicas e fungos viáveis das culturas iniciais dos produtores de cachaça A, B, C e D, expressos em $\log \text{ UFC mL}^{-1}$.

	A	B	C	D
Bactéria	$3,84 \pm 0,00^C$	$3,71 \pm 0,03^C$	$4,80 \pm 0,25^B$	$4,83 \pm 0,20^B$
Fungos	$< 1,3^E$	$1,76 \pm 0,21^D$	$4,81 \pm 0,08^B$	$6,01 \pm 0,04^A$

As médias com letras diferentes são significativamente distintas pelo teste de Tukey com $p \leq 0,05$.

Não há um valor ideal de contagem de bactérias e fungos viáveis estabelecidos. Em estudos realizados por Schwan e Dias (2020), os autores sugerem que o inóculo natural para a produção de cachaça, quando sedimentado no fundo da dorna de fermentação, deve ser equivalente a aproximadamente 20% do volume da dorna e deve apresentar contagens de leveduras e bactérias em torno de, respectivamente, $9,56 \log \text{ UFC mL}^{-1}$ e $4,56 \log \text{ UFC mL}^{-1}$. Em nenhuma das amostras de cultura inicial foi observada contagem de leveduras viáveis próximas à apontada por esses autores. A reduzida contagem de leveduras do inóculo do produtor A pode indicar que as cepas presentes não conseguiram suportar as particularidades da fermentação para a produção de cachaça, ocorrendo uma redução do número de células viáveis acima do crescimento desses microrganismos. Situação semelhante pode ter ocorrido com a cultura inicial do produtor B.

A fermentação para a produção de cachaça se caracteriza como um ambiente singular, com alta pressão osmótica, competição entre microrganismos, exposição a elevadas concentrações de etanol, ausência de controle de temperatura e pH, e reutilização contínua do inóculo sem tratamento entre os ciclos fermentativos de produção. Todos esses fatores atuam como agentes de seletividade e contribuem para a redução da contagem de microrganismos viáveis (ARAÚJO et al., 2018; BARBOSA et al., 2016; SCHAWN; DIAS, 2020).

A fermentação para a produção de cachaça dura, em média, 18 a 30 horas. Schwan et al. (2001) demonstraram que, durante a fase inicial, nas primeiras duas horas de processo, as leveduras estão na fase de crescimento estacionário. Após esse período, elas começam a proliferar durante aproximadamente mais cinco horas de fermentação, apresentando o perfil de crescimento exponencial. Entretanto, a taxa de proliferação celular declina rapidamente, e as células se mantêm em fase estacionária após 10 horas de fermentação, mas metabolicamente ativas, convertendo o açúcar em etanol a uma taxa reduzida. Dependendo das características do mosto, esses microrganismos podem entrar em fase de declínio durante o intervalo entre o esgotamento dos açúcares, fim da fermentação e início da destilação, ocasionando uma redução significativa do número de células viáveis.

Devido à baixa contagem de leveduras viáveis no pé de cuba dos produtores A e B, pode-se inferir que o processo de fermentação desses alambiques ocorrem a partir dos microrganismos provenientes do caldo de cana-de-açúcar que deu origem ao mosto de fermentação. O caldo de cana-de-açúcar é uma fonte rica e diversa de microrganismos, sendo

o principal precursor da microbiota que dá origem à cultura inicial do “pé de cuba caipira” (MEHNAZ, 2013; SCHWAN; DIAS, 2020).

O alambique C utiliza um preparado comercial de leveduras como cultura inicial, o que pode ter contribuído para a manutenção da viabilidade das leveduras no “pé de cuba”. A seleção de microrganismos que originam esses produtos geralmente ocorre baseada em características como resistência a altas concentrações de etanol, açúcares e a baixo pH, boa capacidade de floculação, altos rendimentos, competitividade frente aos demais microrganismos presentes no mosto, e produção de compostos que agregam características sensoriais desejáveis a cachaça produzida. A maioria dos fermentos comerciais para a produção de cachaça são constituídos por leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, com algumas exceções (ARAÚJO et al., 2018; SCHAWN, DIAS, 2020; SOUZA et al., 2012).

A contagem superior de leveduras viáveis da cultura inicial do produtor D demonstra o potencial dessas leveduras nativas de superarem as condições adversas da fermentação e se manterem viáveis até o fim de um processo de fermentação e início do próximo. Podem indicar a presença de cepas com potencial para serem utilizadas como culturas iniciais para a produção de cachaça.

A contagem de bactérias aeróbicas dos produtores C e D, em média 4,81 log UFC mL⁻¹, foi significativamente ($p < 0,05$) superior ao dos produtores A e B, em média 3,77 log UFC mL⁻¹; contudo, o produtor D foi o único cuja contagem de fungos viáveis foi acima da contagem de bactérias aeróbicas no “pé de cuba”. A contagem de bactérias e leveduras do inóculo do produtor C não foi significativamente diferente, conforme foi para os produtores A e B, cuja contagem de bactérias foi superior à de leveduras.

As bactérias participam do processo de fermentação para a produção de cachaça e aguardente, e em níveis adequados, elas contribuem para as características sensoriais da bebida. Porém, o crescimento da população de bactérias acima do apropriado pode indicar a contaminação do processo e acarretar na produção de alguns compostos desejáveis acima do ideal e de diversos contaminantes. Além disso, o prolongamento do intervalo entre o fim da fermentação e início da destilação pode contribuir para a proliferação desses microrganismos, visto que o mosto de fermentação apresenta-se com características adversas para o crescimento de leveduras, com altas concentrações de etanol e esgotamento nutricional, condições essas favoráveis para o crescimento de algumas bactérias (CARDOSO, 2020; CARVALHO-NETTO; ROSA; CAMARGO, 2008; DUARTE et al. 2011; PORTUGAL et al., 2016).

Com o objetivo de comparar os inóculos utilizados na fermentação espontânea com inóculos constituídos por leveduras selecionadas comerciais, Gabriel et al. (2012) obtiveram contagens de células viáveis distintas para leveduras e idênticas para bactérias nesses fermentos. A contagem média de leveduras do fermento comercial foi de, aproximadamente, $7,5 \log \text{ UFC mL}^{-1}$, enquanto o fermento natural foi em torno de $7,0 \log \text{ UFC mL}^{-1}$, já para a contagem de bactérias, em ambos os fermentos, a contagem média foi de $5,0 \log \text{ UFC mL}^{-1}$.

A diferença entre a contagem de fungos e bactérias dos produtores A, B e D, que utilizam fermentos caipiras, evidencia a disparidade das características da microbiota de um produtor para o outro. Fatores como região geográfica, condições climáticas, maturidade dos colmos de cana, características do solo e manejo da cultura podem influenciar na diversidade e incidência de microrganismos autóctones na fermentação. Condições que afetam diretamente a qualidade do produto final produzido, introduzindo complexidade organoléptica e tipicidade ao produto (PORTUGAL et al., 2017).

3.3. Diversidade da microbiota das culturas iniciais

A diversidade bacteriana das culturas iniciais dos produtores A, B, C e D foi obtida por meio do sequenciamento de amplicon do gene 16S rRNA. As bases incorporadas durante o sequenciamento do gene das quatro amostras foram distribuídas entre os valores de Phred Q30 e Q40, indicando boa qualidade de sequenciamento. Um total de 676.267 *reads* foram gerados e, após o controle de qualidade com a remoção de bases com qualidade ruins, tamanho reduzidos e retirada de ruídos, foram quantificadas nas amostras leituras de *reads* de 112.652 para A, 133.755 para B, 123.222 para C e 119.080 para D. A riqueza observada (número de ASV por amostra) de cada “pé de cuba” foi: 973 para A, 1.151 para B, 938 para C e 1.160 para D.

Diferentemente do resultado encontrado para bactérias, o sequenciamento do gene ITS do fungo resultou em sequências com bases incorporadas de qualidade inferior, próximas a Q20. Embora a qualidade das sequências tenha sido inferior à das bactérias, Q20 ainda é um valor de qualidade seguro para a realização das análises. Os números de sequências restantes no final das etapas de controle de qualidade para cada amostra foram: 113.784 para A, 124.107 para B, 97.578 para C e 45.356 para D. Com exceção da amostra D, as outras três tiveram o número de sequências próximo a 100.000. O menor número de sequências na amostra D pode

ser devido à menor entrada e à má qualidade das bases nas fitas direta e reversa. Embora tenha sido baixo, o número de sequências na amostra D não afetou as análises subsequentes.

Os índices de diversidade calculados a partir dos dados do sequenciamento do gene 16S rRNA bacteriano podem ser observados pelos dados descritos na Tabela 3. Observa-se que entre as quatro amostras avaliadas, D é a de maior riqueza (Chao1 = 1.166) e diversidade (Shannon = 4,149), enquanto a amostra C é a de menor riqueza (Chao1 = 948,8) e a amostra A é a de menor diversidade (Shannon = 3,473). Em relação à equitabilidade e dominância, um menor valor de equitabilidade foi observado na amostra B (0,4957), refletindo uma maior dominância da espécie (0,1228); em contrapartida, o “pé de cuba” do produtor C foi o com a maior equitabilidade (0,5902) e a menor dominância (0,04099).

Tabela 3 – Índices de diversidade de Shannon, Chao, Equitabilidade e Dominância, e porcentagem de cobertura calculados no nível ASV para sequências bacterianas e fúngicas das amostras de cultura inicial dos produtores de cachaça A, B, C e D.

		Shannon	Chao-1	Equitabilidade	Dominância	% Cobertura
Bactéria	A	3,473	975,8	0,5047	0,08774	99,713
	B	3,494	1.153	0,4957	0,12280	99,827
	C	4,039	948,8	0,5902	0,04099	98,862
	D	4,149	1.166	0,5881	0,04905	99,485
Fungo	A	1,280	50	0,3271	0,4549	100
	B	1,926	166	0,3768	0,2950	100
	C	2,034	145	0,4088	0,2275	100
	D	2,980	307	0,5203	0,1065	100

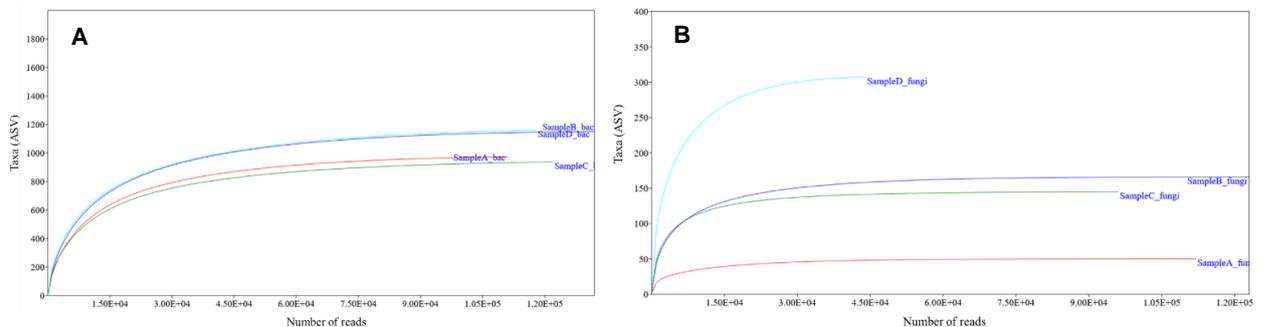
Os índices de diversidade calculados com base nos dados de sequenciamento do gene ITS do fungo podem também estão descritos na Tabela 3. Assim como para bactérias, os índices indicam que, entre as quatro amostras avaliadas, D é a que a de maior riqueza (Chao1 = 307) e diversidade (Shannon = 2,980). Uma riqueza muito menor e um índice de Shannon inferior (Shannon = 1,280) foram obserdos na amostra A (Chao1 = 50). Além disso, essa amostra foi a de menor equitabilidade (0,3271) e maior dominância (0,4549). A maior equitabilidade das espécies fúngicas e consequente menor dominância foram constatadas na amostra D, 0,5203 e 0,1065, respectivamente.

A diversidade e riqueza bacteriana e fúngica podem ser afetadas por fatores biológicos, químicos e físicos, como as características do mosto de fermentação, localização e particularidades do ambiente de produção, e interações microbianas. Além disso, a menor

riqueza bacteriana observada na amostra C (Tabela 3) pode estar associada ao tipo de cultura inicial utilizada nesse alambique, visto que esse produtor utiliza um fermento comercial elaborado a partir de leveduras selecionadas, cujo um dos critérios para seleção é a maior competitividade entre as comunidades microbianas presentes durante o processo fermentativo (FENTIE et al., 2022; GUARDADO et al., 2022).

Com relação aos valores de cobertura, todas as amostras ficaram próximas a 100% para bactérias e atingiram 100% para fungos, indicando que o número de sequências obtido pelo sequenciamento foi suficiente para representar a comunidade microbiana das amostras de cultura inicial. A eficiência da cobertura do sequenciamento bacteriano e fúngico também pode ser verificada na curva de rarefação, que relaciona o número cumulativo de espécies (ASVs) encontradas em razão do esforço amostral (número de sequências obtidas no sequenciamento) (Figura 2A e B). Todas as amostras atingiram um platô, mostrando que o esforço amostral foi suficiente para abranger o número de espécies (ASVs) das quatro amostras para ambos os sequenciamentos, mesmo D, cujo o esforço amostral foi o menor.

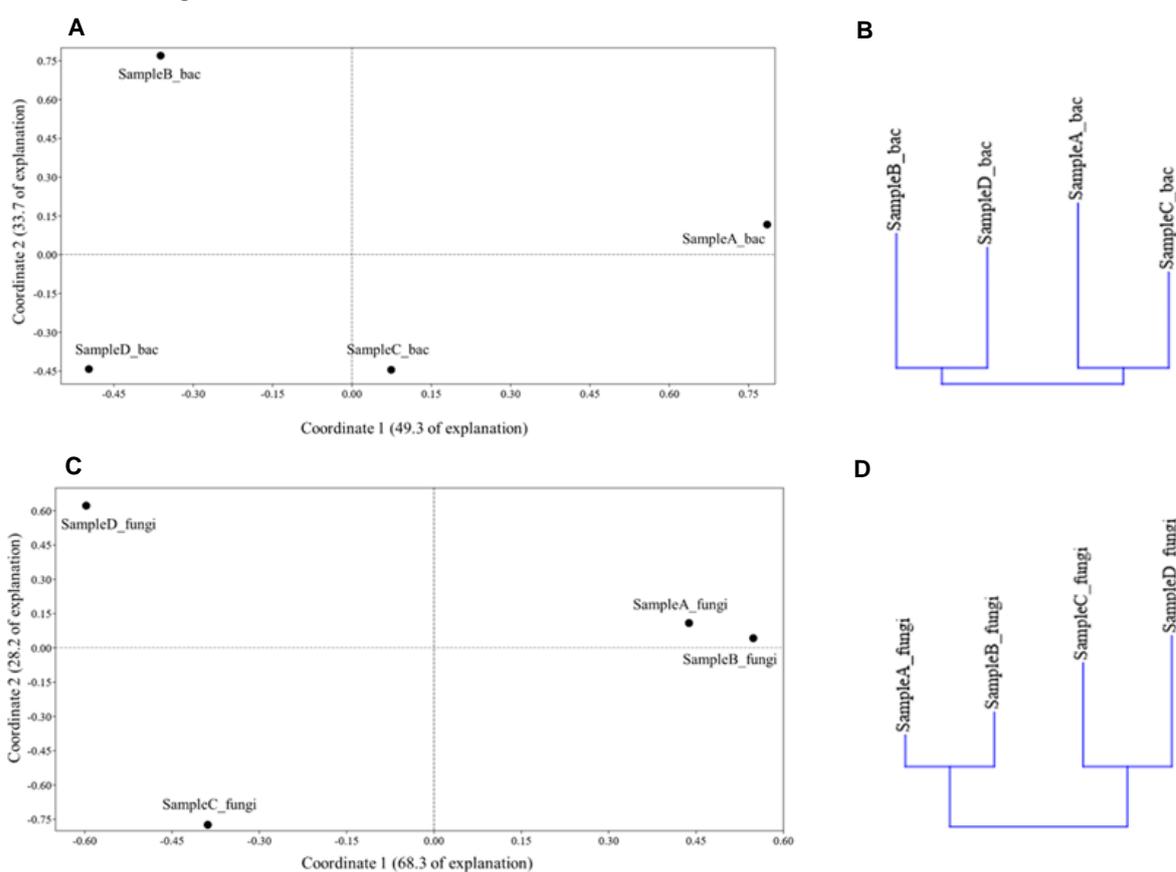
Figura 2 – Curvas de rarefação observadas no nível ASV para sequências bacterianas (A) e fúngicas (B).



As análises de dissimilaridade usando o índice de Bray-Curtis para os dados de sequenciamento de 16S rRNA bacteriano mostram que as quatro amostras avaliadas são diferentes umas das outras, com base na composição taxonômica (Figura 3A). Embora sejam diferentes, as amostras B e D são mais semelhantes entre si, assim como as amostras A e C (Figura 3B). Na análise das coordenadas principais (PCoA), a coordenada 1 foi capaz de explicar 49,3% do agrupamento, e a coordenada 2, 33,7%; portanto, as diferenças nas bactérias da comunidade encontradas ao longo da coordenada 1 têm maior peso. Embora a amostra C esteja mais próxima de D do que A na Figura 3A, o dendrograma (Figura 3B) mostrou que essa amostra é mais semelhante à amostra A.

Para os dados de sequenciamento de genes ITS fúngicos, as análises de dissimilaridade usando o índice de Bray-Curtis mostram que as quatro amostras avaliadas são diferentes umas das outras; com base na composição taxonômica (Figura 3C). Embora sejam diferentes, as amostras C e D são mais semelhantes entre si, assim como as amostras A e B. Na análise das coordenadas principais, a coordenada 1 foi capaz de explicar 68,3% do agrupamento, e a coordenada 2, 28,2%; portanto, as diferenças nos fungos da comunidade encontradas ao longo da coordenada 1 têm maior peso. O dendrograma (Figura 3D) corrobora com os dados obtidos com PcoA; as amostras A e B foram agrupadas no mesmo lado, enquanto C e D em outro lado.

Figura 3 – Avaliação da similaridade de comunidades bacterianas e fúngicas entre amostras de cultura inicial, com base na dissimilaridade de Bray-Curtis no nível ASV A) PCoA para bactérias; B) Dendrograma usando o método de junção vizinho para bactérias; C) PCoA para fungos; D) Dendrograma usando o método de junção vizinho para fungos.



Os fragmentos do gene 16S rRNA gerados a partir das quatro amostras de DNA das culturas iniciais avaliadas foram associados a um total de 3.501 ASVs, em que 54 filós, 276 famílias, 476 gêneros e 79 espécies foram observados (classificados). Ao analisar os filós relacionados às quatro amostras, tanto pelo gráfico de barras quanto pelo mapa de calor, é

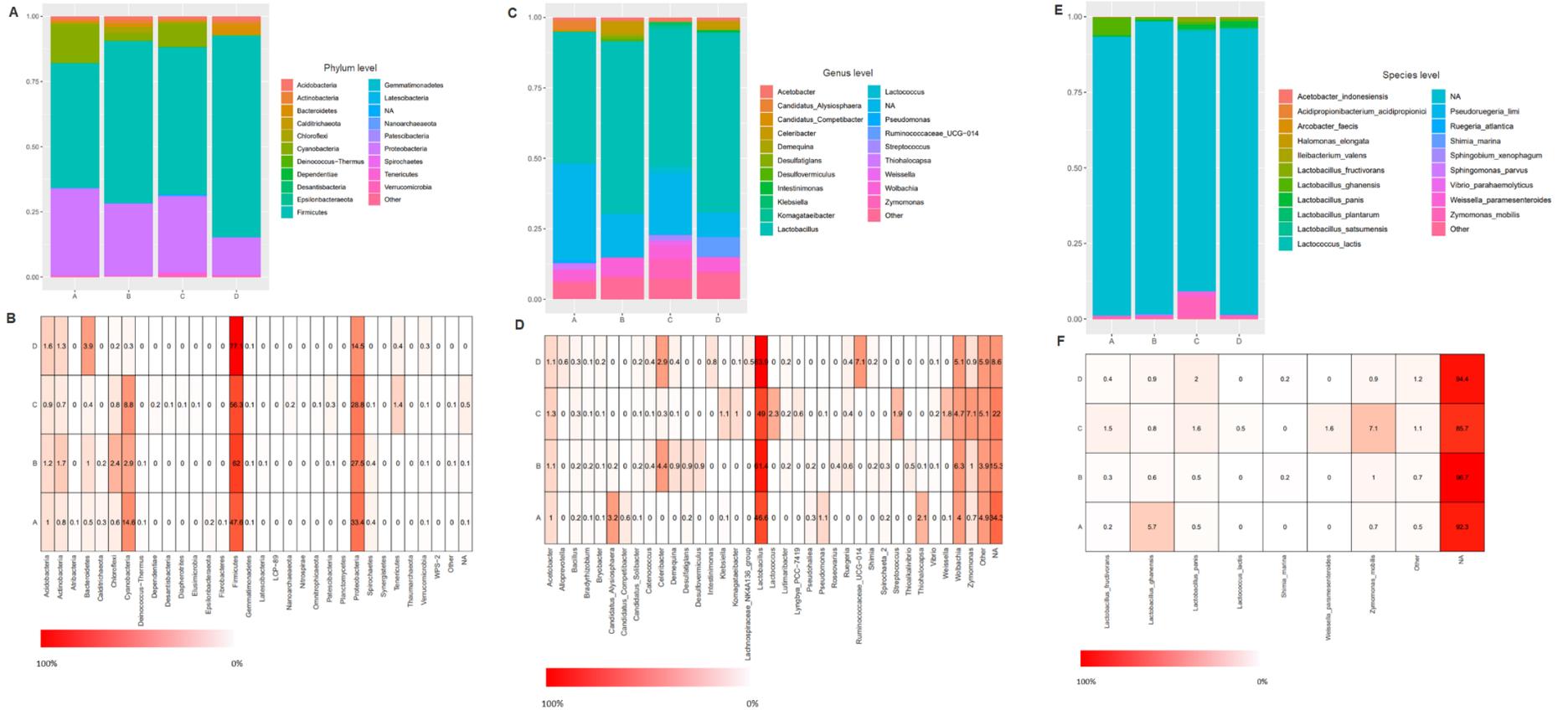
possível observar que, de maneira geral, os filos mais abundantes em todas as amostras foram *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes* (Figura 4A e 4B). Os filos *Firmicutes* e *Proteobacteria* estão entre os filos bacterianos dominantes em processos de produção de alimentos e bebidas fermentadas (CHEN; CHEN; LEI, 2017; DJENI et al., 2020; PORTILLO et al., 2016). Entretanto, em algumas amostras haviam particularidades, como, por exemplo, as amostras A, B e C, já que o terceiro filo mais abundante foi *Cianobactérias*, enquanto para a amostra D, o terceiro filo mais abundante foi o *Bacteroidetes*. O filo *Chloroflexi* estava entre os mais abundantes na amostra B, e na amostra C, o filo *Tenericutes* estava entre os principais.

Aprofundando o nível taxonômico e analisando os resultados dos gêneros encontrados, observa-se que o mais abundante nas quatro amostras foi *Lactobacillus*. Porém, outros gêneros, como *Wolbachia*, *Zymomonas* e *Acetobacter* também foram identificados entre os mais abundantes (Figura 4C e 4D). Segundo Guardado et al. (2022), os principais gêneros de bactérias associados à produção de cachaça são *Bacillus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. Entretanto, observa-se uma alta diversidade de gêneros identificados nas amostras de “pé de cuba” dos quatro alambiques produtores de cachaça (Figura 4C e 4D).

O gênero *Lactobacillus*, pertencente ao filo *Firmicutes*, é um dos principais gêneros associados à fermentação de bebidas alcólicas. Bactérias desse gênero são reconhecidas pela elevada produção de ácido lático; porém, dependendo da rota metabólica, essas bactérias podem ser heterofermentativas. Além de produzir ácido lático, são capazes de produzir diversos compostos, como ácido acético, etanol e dióxido de carbono. Em algumas situações, bactérias do gênero *Lactobacillus* tendem a dominar os processos fermentativos, pois apresentam alta taxa de crescimento e maior capacidade de absorção de substrato que outras bactérias fermentativas (GAO et al., 2022; PEREIRA et al., 2020).

As bactérias pertencentes ao gênero *Zymomonas* (*Proteobacteria*) são bactérias anaeróbicas aerotolerantes, que têm como uma das principais características a capacidade de produção de etanol e dióxido de carbono a partir de glicose, frutose e sacarose com altos rendimentos. Apesar de não haver relatos da presença de *Zymomonas* durante a produção de cachaça, esse gênero já foi detectado nos processos fermentativos para a produção de outras bebidas alcoólicas, como em bebidas tradicionais da Etiópia (*Tej*), Nigéria (Vinho de palma) e México (Pulque), e em fermentações para a produção de etanol e levana a partir da cana-de-açúcar (DIAZ et al., 2019; DJENI et al., 2020; ERNANDES; CRUZ, 2011; FENTIE et al., 2022; WEIR, 2016).

Figura 4 – Composição taxonômica bacteriana das amostras de cultura inicial representada por: A) Bargraph a nível de filo; B) Heatmap a nível de filo; C) Bargraph a nível de gênero; D) Heatmap a nível de gênero; E) Bargraph a nível de espécie; F) Heatmap a nível de espécie. Bargraphs mostram as 20 mais abundantes identificações. Heatmaps mostram todas as identificações com abundância acima de 0,1%, ambos usando abundância relativa. NA = não identificado. Other = identificações com abundância inferior a 0,1%.



O gênero *Acetobacter* (*Proteobacteria*) engloba bactérias capazes de produzir ácido acético a partir do etanol na presença de oxigênio. Essas bactérias são reconhecidas por sua habilidade de manter atividade após o esgotamento dos açúcares do mosto de fermentação, quando finaliza a fermentação alcoólica, reduzindo o rendimento em etanol e aumentando as concentrações de ácido acético. Além disso, a produção de ácido ao longo da fermentação acidifica o ambiente e inibe o crescimento de outros microrganismos, como *Saccharomyces*, o que resulta no retardo da fermentação. A elevada presença de *Acetobacter* durante a fermentação é associada à deterioração de bebidas fermentadas, principalmente do vinho e da cerveja, e pode indicar uma fermentação alcoólica descontrolada (BERBEGAL et al., 2019; HONG et al., 2016; RASPOR; GORANOVIC, 2008; SIRÉN et al., 2019).

O gênero *Wolbachia* (*Proteobacteria*) também foi identificado em todas as amostras de “pé de cuba”. Entretanto, esse não é um gênero comumente associado a processos fermentativos para a produção de alimentos e bebidas, mas já foi detectado em amostras de mosto de fermentação da produção de vinho. *Wolbachia* é um gênero de bactérias intracelular capaz de infectar uma ampla gama de artrópodes e nematoides, principalmente *Drosophila*, com potencial uso como controle biológico. Apesar de não ser relatado como um gênero presente na fermentação alcoólica, essas bactérias podem ter contaminado a cultura inicial a partir da presença de insetos, como mosquitos, que de alguma forma tiveram contato com o “pé de cuba” ou com o mosto de fermentação em alguma etapa do processo de produção da cachaça (CARAGATA et al., 2021; MARZANO et al., 2016; WANGKEEREE et al., 2020).

Além desses gêneros, algumas amostras continham abundância relativa para outros gêneros de forma distinta das demais, como a amostra A, cuja maior abundância relativa foi do gênero *Candidatus Alysiosphaera* (3,2%), *Proteobactérias* filamentosas, halofílicas, aeróbicas e também não são associadas à produção de alimentos e bebidas fermentadas. Essas bactérias foram identificadas em amostras de estações de tratamentos de efluentes e podem contribuir com o aumento e volume de formação de espumas, sendo caracterizadas como capazes de consumir vários carboidratos, aminoácidos e etanol (KRAGELUND et al., 2006; LEVANTESI et al., 2004; NIELSEN et al., 2009).

A amostra B conteve a maior abundância relativa do gênero *Celeribacter* (4,4%), pertencente ao filo das *Proteobactérias*. Esse é um gênero de bactéria aeróbica, halofílica, com crescimento anaeróbico por meio da fermentação da D-glicose pela respiração anaeróbica do nitrato, capaz de reduzir nitrato a nitrito, e necessita de Na⁺ ou água do mar presente no substrato para o crescimento. Algumas espécies pertencentes a esse gênero são reconhecidas pela sua

capacidade de degradar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (IVANOVA et al., 2010; JAMI et al., 2016).

A amostra C foi a única cujas bactérias dos gêneros *Streptococcus* e *Lactococcus* foram quantificadas com abundâncias relativas superiores a 0,1%. *Streptococcus* e *Lactococcus* são gêneros de bactérias do ácido láctico também pertencentes ao filo *Firmicutes*, amplamente encontrados em alimentos e bebidas fermentadas. Esses gêneros são utilizados principalmente na produção de iogurte e queijo, mas há relatos da presença de *Streptococcus* em mosto de fermentação para a produção de cachaça, assim como em outras bebidas fermentadas, como cervejas africanas, vinho de arroz chinês e uvas utilizadas para a produção de vinho. Algumas espécies do gênero *Streptococcus* são reconhecidas pela sua capacidade de produzir uréase, enzima que catalisa a hidrólise da ureia em amônia e carbamato (LACERDA et al., 2011; LINGANI et al., 2021; MILANOVIC et al., 2018; PORTILLO et al., 2016; UNNO et al., 2022; ZOTTA et al., 2008).

Bactérias do gênero *Lactococcus* são anaeróbicas facultativas e se caracterizam pela elevada produção de ácido láctico, principalmente nos estágios iniciais da fermentação, sendo muitas espécies desse gênero homofermentativas e produzem exclusivamente ácido láctico. Essas bactérias também já foram detectadas em mosto de fermentação para a produção de cachaça, do mesmo modo que em outras bebidas alcoólicas fermentadas, principalmente no vinho, além de vinho de arroz chinês, cervejas africanas e o pulque mexicano, e contribuem para a síntese de compostos voláteis (BERBEGAL et al., 2019; BORA et al., 2016; GAROFALO et al., 2020; GOMES et al., 2010; GUARDADO et al., 2022; LACERDA et al., 2011; LINGANI et al., 2021; LIU et al., 2019; VARGAS et al., 2020).

Outro gênero encontrado predominantemente na amostra C foi *Weissella* (*Firmicutes*), com abundância relativa de 1,8%. Esse gênero, assim como *Streptococcus* e *Lactococcus*, é reconhecido pela elevada produção de ácido láctico. São bactérias heterofermentativas, isoladas de vegetais e plantas, grãos, peixes e outras carnes, e uma variedade de alimentos fermentados. As espécies desse gênero são capazes de produzir a partir de glicose, além de ácido láctico, etanol e/ou acetato, e dióxido de carbono (JANG et al., 2002; KAVITAKE; DEVI; SHETTY, 2020; KIM et al., 2017).

Os gêneros *Ruminococcaceae* UCG-014, *Intestinimonas* e *Alloprevotella* foram observados com abundâncias relativas acima de 0,1% apenas na amostra D (Figura 4C e 4D). *Ruminococcaceae* UCG-014 e *Intestinimonas* são bactérias estritamente anaeróbicas, pertencentes ao filo *Firmicutes*, que se caracterizam por colonizarem o trato gastrointestinal de

animais, como bois, cabras, coelhos, frango, pombos e ratos. Ambos os gêneros são reconhecidos por produzirem butirato a partir de aminoácidos. Além disso, *Ruminococcaceae* UCG-014 é capaz de produzir xilanases e celulases, enzimas responsáveis pela degradação de diversos componentes de celulose e hemicelulose de material vegetal. *Intestinimonas* são produtoras de acetato (DENG et al., 2022; KLARING et al., 2013; LI et al., 2021; LIAO et al., 2021; LIU et al., 2022; PACÍFICO et al., 2021; RAMOS et al., 2021; WANG et al., 2020). Assim como esses dois gêneros, outro gênero associado ao trato gastrointestinal de animais é *Alloprevotella*, espécies obrigatoriamente anaeróbicas, fraca a moderadamente sacarolíticas e produtoras de ácidos acético e succínico como produtos finais da fermentação (CHEN et al., 2022; DOWNES et al., 2013; FENG et al., 2022; MAHAYRI et al., 2022). Esses três gêneros de bactérias são frequentemente encontrados em fezes de animais, o que pode indicar uma possível falta de controle higiênico-sanitário com consequente contaminação do ambiente de produção da cachaça por esses microrganismos. Esses locais são ambientes agropecuários onde muitas vezes, de forma inadequada, há a presença de animais próximos ao ambiente de produção.

A maioria das sequências não foi classificada em nível de espécie, mas dentre as classificadas, as mais abundantes entre as amostras foram *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus ghanensis*, *Lactobacillus panis*, *Lactococcus lactis*, *Zymomonas mobilis*, *Shimia marina* e *Weissella paramesenteroides* (Figura 4E e 4F). A bactéria *Lactobacillus fructivorans* foi identificada em todas as amostras de “pé de cuba” analisadas, sendo mais abundante na amostra C (1,5%). Essa espécie é microaerófila, heterofermentativa, são capazes de crescer em meios contendo até 15% de etanol, e produz ácido láctico a partir de glicose, frutose e gluconato. *Lactobacillus fructivorans* é reconhecida pela produção de sabores particulares em produtos fermentados, consideradas álcool-fílicas e tolerantes ao álcool. Muitas vezes essa bactéria é relacionada ao processo de deterioração de cerveja e saquê. A espécie *Lactobacillus homohiochii* é um sinônimo heterotípico posterior da espécie *Lactobacillus fructivorans* (KOBAYASHI et al., 2012; SANDERS et al., 2015; ZHAO; GU, 2019).

Lactobacillus ghanensi foi a espécie identificada mais abundante na amostra A, com abundância relativa de 5,7%. Ela também estava presente nas demais amostras; entretanto, em proporções inferiores (Figura 4E e 4F). Cepas dessa bactéria foram isoladas da fermentação do cacau e ainda não haviam sido atribuídas à fermentação de cachaça, mas já foi relatada no processo de produção do pulque. Ela se caracteriza pela produção de ácido láctico a partir de

glicose sem formação de gás, além de apresentar resistência às condições ácidas (NIELSEN et al., 2007R; RAMIREZ et al., 2022)

Lactobacillus panis foi isolado a primeira vez de fermento de centeio para a produção de pão, mas cepas já foram identificadas na fermentação de licor chinês, em alguns vegetais e em fermentações alcoólicas e lácticas. São bactérias heterofermentativas, produtora de ácido láctico a partir de vários açúcares, como sacarose, glicose e frutose. Além do ácido láctico, podem ser responsáveis pela produção de compostos de sabor, como outros ácidos, ésteres e etanol. Há relatos de que cepas dessa espécie são capazes de produzir 1,3-propanodiol a partir de glicerol, em meio contendo glicose. Cepas dessa espécie podem ser auxotróficas para diferentes aminoácidos, mas, em processos fermentativos na presença de *S. cerevisiae*, essa levedura pode atuar fornecendo os aminoácidos necessários para o seu crescimento (GRAHAME et al., 2013; LIN et al., 2022; ZHU et al., 2021; WIESE et al., 1996; WU; LIN, 2022). Dentre as espécies bacterianas identificadas, a maior taxa de abundância na amostra de cultura inicial do produtor D, 2,0%, foi observada para *Lactobacillus panis*, seguido pela amostra C, 1,6%, e pelas amostras A e B, com abundância de 0,5% cada uma.

Lactococcus lactis foi classificada apenas na amostra do produtor C (0,5% de abundância relativa). Apesar de ter sido identificada em apenas uma amostra, estudos anteriores relatam a presença dessa bactéria em amostras de mosto de fermentação para a produção de cachaça. Entretanto, há um efeito inibitório entre o crescimento dessa bactéria com o crescimento de *S. cerevisiae*, visto que o etanol produzido durante a fermentação dificulta o crescimento de *L. lactis*. Essa espécie já foi relada em diversas outras bebidas fermentadas, como o vinho de arroz, pulque, sidra, kefir, leites fermentados, entre outros, e é responsável pela produção de compostos voláteis flavorizantes (GAROFALO et al., 2020; GOMES et al., 2010; GUARDADO et al., 2022; LACERDA et al., 2011; LEDORMAND et al., 2022).

Zymomonas mobilis foi a espécie de bactéria identificada mais abundante na amostra C, 7,1% de abundância relativa, enquanto nas demais amostras, a porcentagem dessa espécie não ultrapassou 1% (Figura 4E e 4F). As primeiras cepas dessa bactéria foram isoladas de sidra deteriorada e da fermentação de tequila. Além dessas bebidas, essa espécie já foi identificada em processos fermentativos para a produção de outras bebidas alcoólicas e etanol, e se caracteriza por ser a única bactéria que pode transformar sacarose, glicose e frutose em etanol, sob condições anaeróbicas através da via Entner-Doudoroff (ED) (FENTIE et al., 2022; LIU et al., 2022).

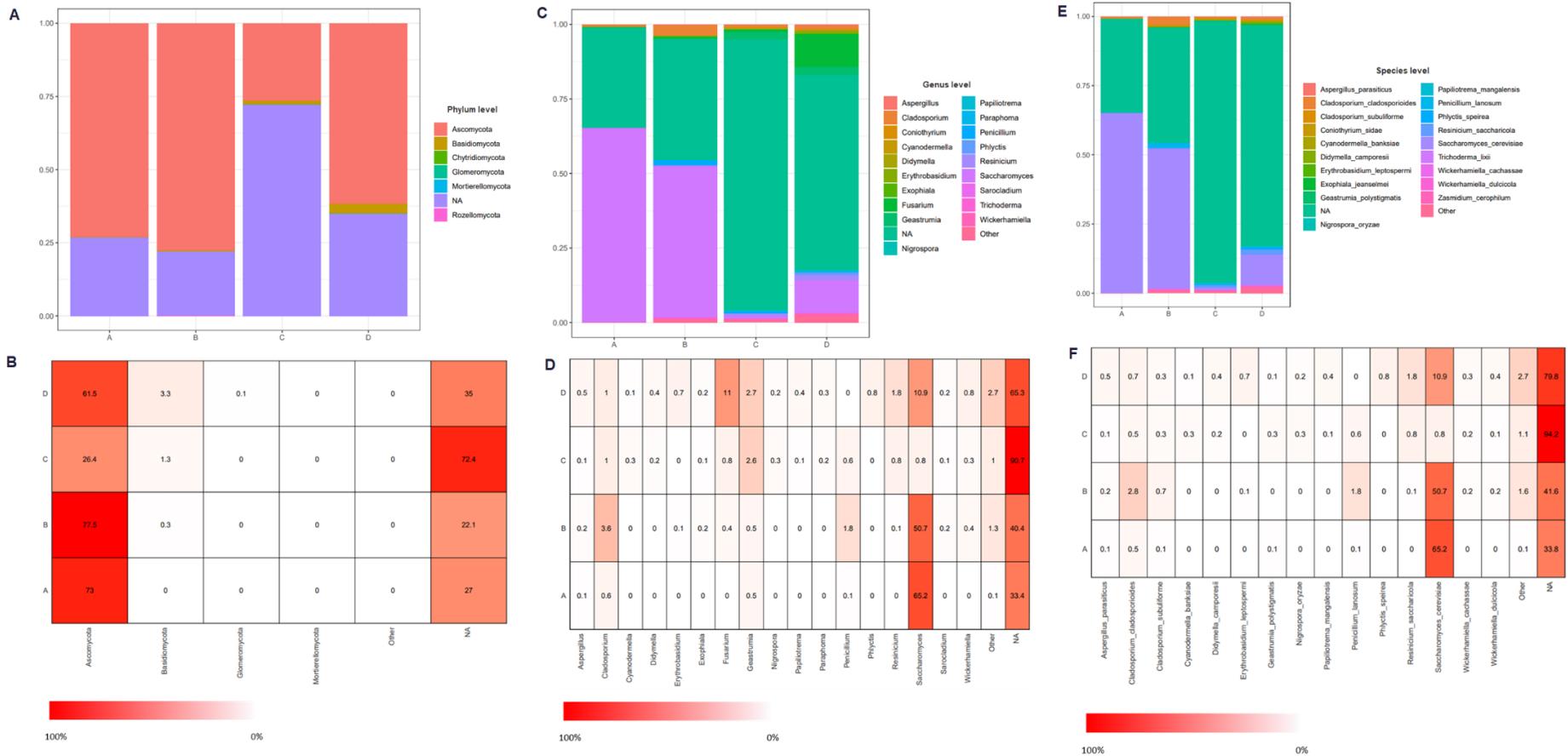
Shimia marina é uma *Proteobactéria*, isolada principalmente de ambientes marinhos, heterotrófica, estritamente anaeróbica, que necessita de sais para o crescimento e é capaz de crescer em substratos contendo acetona, etanol, ureia, entre outros compostos (CHOI et al., 2006; TORRES; PUJALTE; ARAHAL, 2016). Essa espécie foi identificada apenas nas amostras de “pé de cuba” dos produtores B e D, com 0,5% de abundância relativa em cada uma. Não há relatos da presença dessa espécie em processos fermentativos para a produção de bebidas e alimentos fermentados.

Weissella paramesenteroides foi identificada exclusivamente na amostra C (1,6%). Essa bactéria produtora de ácido láctico foi isolada de salsichas, mas já foi identificada em outros alimentos e bebidas, sendo reconhecida por sua capacidade de produzir bacteriocinas que se mostram eficazes contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Não há relatos da presença dessa espécie ao longo do processo de produção de cachaça (AHMED et al., 2022; KIM et al., 2017; PAPAGIANNI; PAPAMICHAEL, 2012).

Em relação à diversidade microbiana dos fungos, os fragmentos do gene ITS gerados a partir das quatro amostras de DNA das culturas iniciais dos alambiques produtores de cachaça avaliados foram associados a um total de 486 ASVs, em que 6 filos, 87 famílias, 116 gêneros e 128 espécies foram observados (classificados). Ao analisar os filos relacionados às quatro amostras, tanto pelo gráfico de barras (Figura 5A) quanto pelo mapa de cores (Figura 5B), o filo mais abundante em todas as amostras foi o Ascomycota (Figura 5A e 5B). Entretanto, é importante destacar que na amostra C, 72,4% das sequências não foram classificadas a nível de filo.

Aprofundando o nível taxonômico e analisando os resultados dos gêneros encontrados, pode-se perceber que a maioria das sequências não foram classificadas para as amostras C e D, sendo que na amostra C foi constatado o maior número de sequências não classificadas, aproximadamente 90% (Figura 5C e 5D). Em relação aos gêneros classificados, observa-se que o mais abundante nas amostras A e B foi *Saccharomyces*, com abundância relativa de 65,2% e 50,7%, respectivamente, demonstrando a dominância desse gênero no “pé de cuba” desses alambiques. *Saccharomyces* é o principal gênero fúngico associado à produção de cachaça. Entretanto, outros gêneros de leveduras também já foram descritos, como *Rhodotorula*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Debaromyces*, *Meyerozyma* e *Hanseniaspora* (ARAÚJO et al., 2018; BARBOSA et al., 2016; COSTA et al., 2021; PORTUGAL et al., 2017; SCHWAN et al., 2001).

Figura 5 – Composição taxonômica fúngica das amostras de cultura inicial representada por: A) Bargraph a nível de filo; B) Heatmap a nível de filo; C) Bargraph a nível de gênero; D) Heatmap a nível de gênero; E) Bargraph a nível de espécie; F) Heatmap a nível de espécie. Bargraphs mostram as 20 mais abundantes identificações. Heatmaps mostram todas as identificações com abundância acima de 0,1%, ambos usando abundância relativa. NA = não identificado. Other = identificações com abundância inferior a 0,1%.



Além do gênero *Saccharomyces*, na amostra B foram identificados outros dois gêneros de fungos filamentosos entre os mais abundantes, *Cladosporium* (3,6%) e *Penicillium* (1,8%). *Cladosporium* são fungos endofíticos comuns em climas tropicais, frequentemente encontrados em vários alimentos, como cereais, grãos e frutas. Em bebidas, esse gênero já foi identificado na superfície de bagas de uvas e no mosto de fermentação para a produção de vinho e também já foram identificados no colmo, no bagaço e no caldo de cana-de-açúcar. Além disso, algumas espécies desse gênero se destacam pela capacidade de produzir enzimas hidrolíticas e uma vasta gama de compostos secundários (ABDALLAH et al., 2020; ESPINOSA et al., 2006; MARQUES et al., 2018; SALVATORE; ANDOLFI; NICOLETTI, 2021; SIREN et al., 2019; STUART et al., 2010).

Penicillium é outro gênero que engloba fungos endofíticos amplamente difundidos com capacidade de produzir diversas enzimas e metabólitos secundários, como álcoois, ésteres e cetonas. Esse gênero já foi identificado na microbiota de outras bebidas fermentadas, como o vinho de arroz e vinho de uva. A presença de *Penicillium* também já foi detectada no solo de canaviais, no bagaço de cana-de-açúcar e no caldo de cana-de-açúcar (ABDALLAH et al., 2020; AHMED; DAWAR; TARIQ, 2010; ASSAF et al., 2020; ESPINOSA et al., 2006; RAMOS et al., 2021; SIREN et al., 2019; XIAO et al., 2022).

A abundância relativa do gênero *Saccharomyces* nas amostras C e D foi muito inferior que nas demais amostras, 0,8% e 10,9%, respectivamente. O gênero classificado de maior abundância relativa na amostra C foi *Geastrumia*, com 2,6% de abundância. Esse gênero também esteve presente na amostra D entre os fungos mais abundantes, com 2,7% de abundância relativa. *Geastrumia* é um gênero de fungos filamentosos associado a algumas espécies vegetais de países, como Brasil, Tanzânia, Estados Unidos, Espanha e República Dominicana, sendo relacionado principalmente a fungos da mancha fuliginosa que acomete a superfície cerosa da maçã, e geralmente estão associadas a uma determinada região (ARIAS et al., 2010; BATZER et al., 2015; SILVA et al., 2016).

Além desses gêneros fúngicos, as maiores abundâncias relativas na amostra D foram constatadas para os gêneros *Fusarium* (11,0%) e *Resinicium* (1,8%) (Figura 5C e 5D). O gênero *Fusarium* é um dos mais abundante, englobam fungos endofíticos com capacidade de produzir metabólitos secundários complexos e diversos. Esse gênero foi isolado do colmo, bagaço, e caldo de cana-de-açúcar, e também foi detectado em processos de produção de outras bebidas fermentadas, como vinhos de diferentes matérias primas (ABDALLAH et al., 2020; AHMED; DAWAR; TARIQ, 2010; CHEN et al., 2020; LI et al., 2020). Na amostra do “pé de cuba” do

produtor D, a abundância relativa de *Fusarium* foi bem elevada, próxima a encontrada para a levedura *Saccharomyces*, que é o principal microrganismo responsável pela fermentação para a produção de cachaça. Isso pode indicar um desequilíbrio desse ambiente, com uma proliferação excessiva desse fungo. *Resinicium* é um gênero de fungos associados ao solo e a decomposição da madeira, capaz de formar um cordão micelial. Esse gênero já foi isolado de amostras de rizosferas do cultivo da cana-de-açúcar, mas não há relatos da identificação em alimentos e bebidas fermentadas (GRUHN et al., 2017; LONHIENNE et al., 2015; YU et al., 2021).

Não há estudos que relatem a composição de fungos filamentosos presentes na cultura inicial ou no processo fermentativo de alambiques produtores de cachaça, mas pode-se observar que há uma diversidade de fungos filamentosos que podem estar presentes e influenciar na qualidade do processo fermentativo, visto que a maior parte da diversidade de gênero da microbiota fúngica identificada nas amostras de “pé de cuba” foi de fungos filamentosos. Além de *Saccharomyces*, os gêneros de leveduras identificados nas amostras foram *Erythrobasidium*, presente nas amostras B e D; *Exophiala* e *Wickerhamiella* identificadas nas amostras B, C e D, e *Papiliotrema* nas amostras C e D; entretanto, a abundância relativa dessas leveduras foi inferior à dos fungos filamentosos (Figura 5C e 5D).

Pode-se observar que cinco gêneros (*Cyanodermella*, *Didymella*, *Nigrospora*, *Papiliotrema* e *Paraphoma*) foram identificados apenas nas amostras C e D (Figura 5C e D), o que corrobora com os resultados obtidos nas análises de similaridade da comunidade fúngica (Figura 3C e D). Esses produtores estão localizados em uma mesma região, o que pode ter contribuído para que essas amostras fossem semelhantes em relação às suas diversidades de gêneros de fungos identificados, mesmo com o produtor C usando uma cultura inicial comercial. O microbioma formado, principalmente em relação a fungos filamentosos e leveduras, pode estar associado à localização geográfica, visto que o clima, as características do solo e topografia do local podem influenciar o desenvolvimento de comunidades microbianas estruturadas regionalmente, o que pode refletir diretamente na composição físico-química da cachaça produzida, agregando características distintas entre as bebidas elaboradas em determinadas regiões (LIU et al., 2019; MILANOVIC et al., 2022; MORRISON-WHITTLE; GODDARD, 2018).

Em relação à identificação da microbiota fúngica a nível de espécie, assim como para gênero, a maioria das sequências das amostras C e D não foram classificadas em nível de espécie. A baixa classificação das sequências ao nível de gênero e espécie é resultado de

características intrínsecas desse grupo microbiano. Ao contrário das bactérias, a evolução e a diversidade morfológica dos fungos não estão intimamente associadas a marcadores genéticos únicos, e por serem um grupo muito heterogêneo, a identificação taxonômica se torna um processo complexo e difícil. Embora o ITS seja considerado o marcador universal para fungos, é indicado a utilização de mais de um marcador molecular para que a classificação seja feita com maior resolução (EZEONUEGBU et al., 2022; NILSSON et al., 2019; TEKPINAR; KALMER, 2019).

Entre as espécies classificadas, a mais abundante nas amostras foi *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 5E e 5F), sendo essa espécie dominante nos “pés-de-cuba” das amostras A e B. *S. cerevisiae* é a principal espécie associada a fermentação de bebidas alcoólicas. Durante a fermentação para a produção de cachaça seu metabolismo sintetiza enzimas capazes de hidrolisar o açúcar disponível no mosto produzindo etanol, dióxido de carbono e diversos outros compostos voláteis e não voláteis (ARAÚJO et al., 2018; HIRST; RICHTER, 2016).

A menor diversidade de espécies com abundância relativa acima de 0,1% foi observada na amostra A, onde foram classificadas apenas 6 espécies que representam 66,1% da biodiversidade total, seguida da amostra B com 9 espécies, que correspondem a 56,8% da abundância total, C com 13 espécies que representam apenas 4,7% da abundância relativa total e D com 14 espécies que correspondem a 17,5% da biodiversidade total. Além de *S. cerevisiae*, na amostra A, a segunda espécie mais abundante foi *Cladosporium cladosporioides* (0,5%), assim como para a amostra B, cuja a abundância relativa foi de 2,8%. Essa espécie também foi identificada nas amostras C e D com abundância relativa de 0,5% e 0,7%, respectivamente. Na amostra B também foi identificada entre as espécies mais abundante *Penicillium lanosum*, com 1,8% de abundância relativa. Para as amostras C e D, a segunda espécie classificada mais abundante foi *Resinicium saccharicola* (1,8%).

Cladosporium cladosporioides está entre as espécies mais isoladas desse gênero, inclusive já foi isolada do bagaço de cana-de-açúcar. Seu metabolismo resulta na produção de diversos compostos secundários, como antibióticos que podem agir como inibidores de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, e enzimas. Além disso, fungos dessa espécie são capazes de remover hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, como fenantreno, do solo a partir da atividade extracelular de enzimas (ligninases) (ALMATAR; MAKKY, 2016; ESPINOSA et al., 2006). *Penicillium lanosum* é uma espécie de fungo com reconhecida capacidade de produção de celulase. Há relatos da identificação dessa espécie em locais com diferentes características, desde solos criogênicos até frutas; entretanto, não há relatos sobre presença

dessas cepas na cana-de-açúcar ou em processos fermentativos para a produção de alimentos e bebidas (BOUQUELLAH, 2019; MUSCAT et al., 2020; PRUDNIKOVA et al., 2021). *Resinicium saccharicola* são espécies tropicais isoladas em países como Guiana Francesa, Caribe, Cuba e Porto Rico, de plantas como bambu (*Bambusa vulgaris*), palmeira-rachis e cana-de-açúcar. Essa espécie já foi identificada na microbiota da cana-de-açúcar, da rizosfera e do solo dessa cultura cultivada no Brasil (CARVALHO et al., 2021; GRUHN et al., 2017; NAKASONE, 2000).

Entre as espécies de leveduras, além de *S. cerevisiae*, foram identificadas duas espécies do gênero *Wickerhamiella* (anteriormente *Candida*), *W. cachassae* e *W. dulcícola*, nas amostras de cultura inicial dos alambiques B, C e D; *Erythrobasidium leptospermi* nas amostras B e D; e a espécie *Papiliotrema mangalensis* nas amostras C e D. As espécies *W. cachassae* e *W. dulcícola* são espécies de leveduras isoladas do caldo de cana-de-açúcar e das dornas de fermentação da produção de cachaça brasileira em Minas Gerais e Tocantins, cujo isolado mais próximo já descrito, conforme determinado pela similaridade de sequência, é a *Wickerhamiella drosophilae*. Ambas as espécies são capazes de crescer rapidamente na presença de etanol 4 % e lentamente em etanol 5 %. A presença dessas espécies no caldo de cana e nas dornas de fermentação é atribuída à presença de drosofilídeos, abelhas, besouros ou outros insetos que podem entrar em contato com o mosto de fermentação ao longo do processo de produção (BADOTTI et al., 2013). *Erythrobasidium leptospermi* é uma espécie recentemente isolada do filoplano do arbusto *Leptospermum speciosum* na Austrália, e é a quarta descrita nesse gênero de leveduras balistosporogênicas vermelho-alaranjadas (TAN et al., 2021). A espécie *Papiliotrema mangalensis*, anteriormente denominada *Cryptococcus mangaliensis*, foi isolada de mangues de Everglades da Flórida, Estados Unidos da América (FELL et al., 2011; LIU et al., 2016).

3.4. Compostos voláteis

A análise de compostos voláteis demonstrou uma diversidade de 42 compostos orgânicos presentes nas amostras das frações voláteis, cabeça, coração e cauda, produzidas a partir das culturas iniciais pelos quatro alambiques produtores de cachaça (Tabela 4). O sabor e aroma da cachaça produzida estão diretamente associados ao processo de fermentação, visto que muitos desses compostos são produtos do metabolismo dos microrganismos presentes durante todo o processo, até a etapa de destilação. Após a destilação, as modificações da

composição volátil da bebida são influenciadas pelas condições de armazenamento e pelas reações que podem ocorrer entre os compostos que a constitui (CARDOSO, 2020).

A maior diversidade de compostos foi observada nas frações cabeça, com um total de 39 compostos identificados; na fração coração foram identificados 22 compostos; e na fração cauda 20 compostos. Pode-se observar que as principais classes de compostos identificados foram ésteres e álcoois. Alguns compostos estavam presentes em todas as frações, como o éster octanoato de etila, que é associado aos descritores de odor de frutas e gordura, o decanoato de etila, associado a aromas de uva, dodecanoato de etila, relacionado a aromas doce, floral e de cera, e hexadecanoato de etila, que também tem o descritor de aroma de cera associado. O álcool 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico) também foi identificado em todas as frações, e está relacionado a aromas de uísque, malte e queimado. Esses compostos, além de estarem presentes em todas as frações, estavam entre os mais abundantes em todas elas. Outro composto que foi detectado na maioria das amostras foi o acetato de etila, que é considerado um dos principais ésteres presente na cachaça. Ele foi detectado em todas as frações das amostras B, C e D, estando entre os compostos mais abundantes. Entretanto, na amostra A, esse éster foi identificado apenas na fração coração, e com abundância inferior a diversos outros ésteres detectados. O acetato de etila se caracteriza por contribuir com odores associados ao abacaxi (Tabela 4).

Ao avaliar a diversidade de compostos das frações voláteis obtidas durante a produção de cachaça em um alambique de Minas Gerais, Brasil. Santiago et al. (2016) observaram a maior heterogeneidade de compostos nas frações cabeça e coração, com um total de 24 compostos em cada uma, enquanto a fração cauda continha 18 compostos distintos. Além disso, um total de 12 compostos eram comuns as três frações. Duarte et al. (2011) determinaram a composição volátil das frações voláteis obtidas da produção de cachaça e constataram um total de 16 compostos nas frações cabeça e cauda, sendo acetaldeído, lactato de etila, 2-metilpropan-1-ol, 2-metilbutan-1-ol, 3-metilbutan-1-ol, pentan-1-ol, ácido butírico, ácido octanoico e ácido decanoico os presentes em maiores quantidades. Na fração, coração os autores identificaram 29 compostos, sendo acetaldeído, acetato de etila, propan-1-ol, 2-metilpropan-1-ol, 2-metilbutan-1-ol, 3-metilbutan-1-ol e 2-feniletanol aqueles com as maiores concentrações. Analisando cachaças comerciais da Paraíba - Brasil, Oliveira et al. (2020) constataram que os principais compostos voláteis presentes na bebida foram acetato de etila, octanoato de etila, decanoato de etila, dodecanoato de etila, tetradecanoato de etila e hexadecanoato de etila. Silveira et al. (2021) identificaram uma grande variedade de compostos voláteis ao analisarem os mostos de

caldo de cana-de-açúcar usados para a produção de cachaça a partir da fermentação com três linhagens de leveduras *S. cerevisiae* autóctones, e as cachaças produzidas a partir desses mostos. No total, os autores identificaram 204 compostos, sendo 108 nos mostos e 168 nas cachaças. Os álcoois foram os mais identificados; entretanto, também foram identificados diversos ésteres, aldeídos, acetal e hemicetal, ácidos carboxílicos, hidrocarbonetos, cetonas, entre outros.

Em relação à diversidade de compostos voláteis observada entre os produtores, considerando os compostos identificados nas três frações, constatou-se no alambique C a maior diversidade de compostos, com um total de 29 diferentes. As frações voláteis do alambique A continham 24 compostos distintos; nas frações do alambique B foram identificados 23 compostos, enquanto nas frações do alambique D foram apenas 19 compostos (Tabela 4). Considerando apenas a fração coração, que é a fração correspondente à cachaça, o número de compostos identificados nas amostras de cada produtor foram: 18 (amostra A), 11 (amostra B), 12 (amostras C e D).

Essa diferença entre a composição das frações é esperada, visto que o processo de destilação em alambiques de cobre se distingue da destilação em colunas de aço inox exatamente pela possibilidade de separar essas frações, obtendo na fração coração a melhor constituição para a bebida. Entretanto, o corte deve ser realizado de forma adequada para que não ocorra a redução excessiva de compostos desejáveis ou a presença em excesso de compostos que podem prejudicar a qualidade físico-química e sensorial da cachaça (CARDOSO, 2020).

Observa-se na Tabela 4 que, apesar de a maior diversidade de compostos voláteis identificados nas frações destiladas ter sido constatada na amostra C (29 compostos no total), esse alambique não continha a cachaça (fração coração) com a composição volátil mais diversa (12 compostos no total), visto que a bebida que exibiu a maior diversidade de compostos foi a produzida pelo alambique A (18 compostos no total). Uma grande diversidade de compostos voláteis na bebida não a caracteriza como uma cachaça de qualidade superior, pois alguns compostos voláteis podem ser responsáveis por sabores e aromas desagradáveis. É importante que a composição volátil da cachaça seja constituída de compostos que agregam características sensoriais de qualidade e que os mesmos estejam em proporções adequadas (GAO et al., 2022; PORTUGAL et al., 2016).

1955	1582	9-hexadecenoato de etila	nd	nd	nd	0,38	nd	nd	-						
1595	1594	Dodecanoato de etila	7,29	10,75	16,84	12,10	16,48	22,02	11,93	32,62	17,15	11,02	15,00	5,13	Doce, cera, floral
1647	1644	Decanoato de isoamila	0,32	0,66	nd	0,31	nd	nd	0,32	1,01	nd	0,28	nd	nd	-
1787	1788	Tetradecanoato de etila	0,17	0,30	3,87	0,67	1,77	2,29	0,52	3,71	3,31	0,59	1,51	nd	Éter
1994	-	Hexadecanoato de etila	1,85	1,84	53,13	2,17	7,10	9,86	1,06	6,06	7,40	2,46	5,88	6,83	Cera
Álcoois															
589	-	2-Butanol	nd	nd	nd	0,42	0,50	0,64	nd	nd	nd	1,25	2,14	nd	-
621	-	2-Metil-1-propanol	0,59	0,44	nd	0,35	0,68	0,86	0,40	0,74	nd	0,62	0,84	nd	Alcoólico Uísque, malte, queimado
723	-	3-Metil-1-butanol	7,12	8,40	7,09	6,59	8,81	12,33	2,31	6,76	2,39	4,79	10,37	3,63	Malte
724	-	2-Metil-1-butanol	1,69	2,01	nd	nd	2,08	2,88	0,78	1,77	nd	1,63	2,55	nd	-
-	1073	1,3-Ciclopentanodiol	nd	nd	nd	0,33	nd	nd	Pepino						
1103	1102	Nonan-2-ol	0,13	nd	nd	Floral									
1118	1114	2-Feniletanol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,62	nd	nd	nd	Floral
Ácido															
615	-	Ácido acético	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,64	nd	nd	4,01	Azedo
Aldeídos															
1100	1104	Nonanal	0,74	0,42	nd	0,27	nd	nd	0,15	nd	1,14	0,33	nd	nd	Gordura, cítrico, verde
-	787	3-Etoxipropanal	nd	nd	nd	nd	nd	1,10	0,44	3,20	4,72	1,72	8,88	9,36	-
Cetonas															
597	-	2-Butanona	nd	nd	nd	0,23	nd	nd	Amanteigado						
Acetal															
1075	1073	1,1,3-Trietoxipropano	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,08	3,10	1,58	2,80	6,90	5,23	-
726	-	1,1-Dietoxietano	nd	nd	nd	0,24	nd	1,25	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Fruta
Hidrocarbonetos															

773	-	Metilbenzeno	0,15	0,27	3,89	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Tinta
1250	1211	Trimetil tetraidronaftaleno	nd	0,41	nd	nd	nd	nd	0,49	nd	nd	nd	nd	nd	-
-	1217	1,1,3-Trimetilciclohexano	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,10	nd	nd	nd	nd	nd	-

I = cabeça, 2 = coração e 3 = cauda.*Descritor (FLAVORNET, 2023; GAROFALO et al., 2020; XIAO et al., 2022; XU et al., 2022). nd = não detectado. IRL = Índice de Retenção da Literatura e IRC = Índice de Retenção Calculado.

Segundo Zacaroni et al. (2017), o monitoramento dos compostos voláteis presentes na bebida pode indicar práticas distintas durante o processo de produção, visto que a produção excessiva de compostos voláteis pode estar associada a fatores edafoclimáticos, métodos de preparo, qualidade da matéria-prima, microrganismos utilizados, condições de fermentação e tipo de equipamento de destilação.

Determinados compostos voláteis foram observados nas amostras de um único produtor. Nas amostras do alambique A, os compostos identificados com exclusividade foram: acetato de citronelila, (E)-4-decenoato de etila e nonan-2-ol na fração cabeça; octanoato de pentila na fração cabeça e cauda; e metilbenzeno nas três frações. Nas amostras do produtor B foram: propionato de etila identificado nas três frações voláteis; (Z)-4-decenoato de etila, 9-hexadecenoato de etila, 1,3-ciclopentanodiol e 2-butanona na fração cabeça; e 1,1-Dietoxietano (cabeça e cauda). Os compostos identificados apenas nas amostras do alambique C foram acetato de 2-metilbutila, octanoato de butila, decanoato de propila, decanoato de isobutila, e 1,1,3-trimetilciclohexano (cabeça); succinato de dietila e álcool fenetílico (cauda). Nenhum composto volátil foi identificado com exclusividade nas frações voláteis da amostra D.

Serafim et al. (2013), avaliando a correlação entre a composição volátil da cachaça e a aceitação sensorial do produto, constataram que os compostos que mais se correlacionam com o sabor da cachaça são acetaldeído, hexanaldeído, ésteres etílicos e acetatos, ácido acético e álcool isobutílico. Também avaliando a aceitação sensorial de cachaças, Amorim, Schwan e Duarte (2016) constataram que a bebida composta com concentrações elevadas de ésteres e álcoois superiores, e concentrações inferiores de aldeídos e ácido acético apresenta maior aceitação sensorial que as demais.

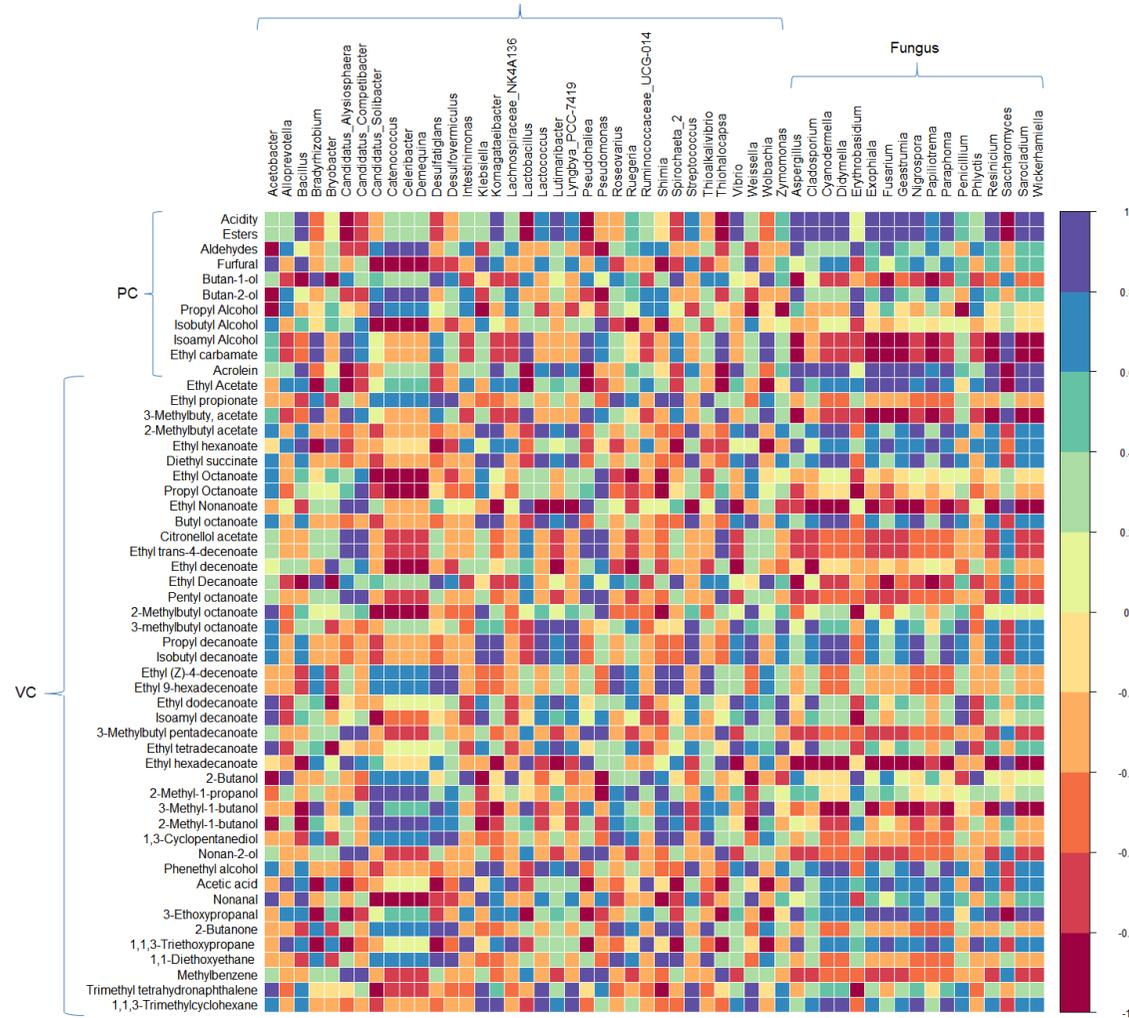
3.5. Correlação entre a composição físico-química (CFQ) e volátil (CV) e a microbiota das culturas iniciais

A influência do microbioma presente na cultura inicial utilizada pelos produtores de cachaça (A, B, C e D) na composição físico-química e volátil das frações destiladas do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar pode ser verificada na Figura 6. Pode-se observar as mesmas correlações entre os microrganismos e os teores de acidez volátil, ésteres e acroleína (composição físico-química); esses três compostos foram forte e positivamente correlacionados com os gêneros bacterianos *Bacillus*, *Komagataeibacter*, *Lutimaribacter*, *Vibrio*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, e com a maioria dos gêneros fúngicos, com exceção dos gêneros

Saccharomyces, que resultou em uma forte correlação negativa, e *Erythrobasidium*, uma fraca correlação positiva, e uma forte correlação negativa com bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Pseudohalaea*, *Thiohalocapsa* e *Candidatus Alysiosphaera*. A origem desses três compostos está associada principalmente ao processo de fermentação.

A acidez volátil, expressa em teores de ácido acético, tem sua formação atribuída à presença de bactérias no mosto de fermentação, principalmente de bactérias acéticas e lácticas (CARDOSO, 2020; FRANCO, et al. 2023; LIMA, et al., 2022). Por meio da análise de correlação, observou-se que a acidez volátil foi correlacionada forte e positivamente com outros gêneros bacterianos, apesar de ter uma leve correlação positiva com bactérias do gênero *Acetobacter*. O gênero de bactérias acéticas que mais se correlacionou à acidez foi o *Komagataeibacter*. Espécies desse gênero, principalmente as realocadas de *Gluconacetobacter*, predominam nos meios de fermentação de vinagre devido à sua capacidade de realizar, eficientemente, a oxidação incompleta do etanol em ácido acético, assim como tolerar ao etanol, ao ácido formado, e ao pH baixo. Há relatos da presença de bactérias desse gênero em kefir, vinho e vinagre (CAMACHO et al., 2022; SEO et al., 2022; WANG et al., 2022). Bactérias dos gêneros *Lutimaribacter* e *Vibrio* são Gram-negativas, halofílicas, associadas a ambientes marinhos e não relacionadas à produção de ácidos. Mas, provavelmente tiveram o seu desenvolvimento favorecido devido à redução da competição com outros microrganismos que não são capazes de tolerar as características da fermentação, visto que algumas espécies desses gêneros conseguem utilizar diversos substratos como fonte de carbono (GRIMES, 2020; IWAKI et al., 2013; SUN et al., 2022; YOON et al., 2009). Os gêneros *Bacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus* também se caracterizam por colonizar uma diversidade de ambientes e podem contribuir para a formação de ácido láctico durante a fermentação. Além disso, bactérias do gênero *Bacillus* são capazes de formar esporos e sobreviver em condições adversas que podem ocorrer ao longo do processo fermentativo (GAROFALO et al., 2020; GUARDADO et al., 2022; LINGANI et al., 2021; LU et al., 2022; UNNO et al., 2022).

Figura 6 – Correlação entre a composição físico-química e volátil obtida nas frações destiladas e a microbiota presente nas amostras de cultura inicial dos quatro alambiques produtores de cachaça. A intensidade das cores representa o grau de correlação, mensurada pela correlação de Spearman, entre a diversidade microbiana e os compostos identificados, onde a cor roxa indica grau de correlação positiva e a cor vermelha indica grau de correlação negativa.



Os ésteres são compostos que contribuem significativamente para as características sensoriais da bebida, cuja formação é atribuída ao metabolismo secundário das leveduras, principalmente *Saccharomices*, e a reações de esterificações entre os álcoois e ácidos carboxílicos durante a destilação. A reação de formação dos ésteres que ocorre durante a fermentação requer uma molécula de álcool, acetil-CoA, e uma enzima sintetizadora de éster, a álcool acetiltransferase, sendo essa reação favorecida em baixo pH (CARDOSO, 2020; HIRST; RICHTER, 2016; WALKER; STEWART, 2016). A forte correlação entre os teores de ésteres e a abundância relativa de algumas bactérias e fungos pode ser atribuída ao aumento da disponibilidade de ácidos no mosto de fermentação proporcionado pelo metabolismo desses microrganismos, visto que esses ácidos são um dos substratos da reação de formação dos ésteres (GULATI et al., 2001; MEHTA et al., 2020; STAMATIS et al., 1998).

A acroleína é um aldeído tóxico cuja formação pode ocorrer durante o processo de fermentação por meio da desidratação do glicerol associado a bactérias termofermentativas dos gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus*. O que corrobora, em certa parte, com os resultados obtidos na análise de correlação, nos quais observa uma forte correlação desse composto com *Bacillus*; porém, não foi constatada uma forte correlação com bactérias do gênero *Lactobacillus*, e sim com *Lactococcus*. O metabolismo de *Bacillus* e *Lactobacillus* tem a capacidade de converter o glicerol a 3-hidroxi propionaldeído (3-HPA) em condições anaeróbicas, e após, o 3-HPA é espontaneamente transformado por desidratação térmica em acroleína, sendo essa reação favorecida por baixo pH, altas temperaturas e catalisadores metálicos. A correlação de bactérias associadas à produção de ácidos com os teores de acroleína pode ser atribuída à redução do pH ocasionado pela presença desses ácidos. A redução do pH favorece a desidratação do 3-HPA, inclusive na etapa de destilação. Além desses gêneros, outro gênero que pode ser associado à produção de acroleína na cachaça é *Klebsiella*, pois possuem algumas espécies capazes de produzir 3-HPA a partir do glicerol (BAUER; COWAN; CROUCH, 2010; FOKUM et al. 2021; JIANG et al., 2022; LAGO et al., 2017; LAS HERAS et al., 2020; VIVEK et al. 2019).

Fortes correlações positivas foram observadas entre os teores de aldeídos, expressos em acetaldeído, com *Catenococcus*, *Celeribacter*, *Demequina*, *Aspergillus*, *Erythrobasidium*, *Fusarium* (Figura 6). Essa correlação também foi constatada com as bactérias do gênero *Lachnospiraceae* NK4A136. Li et al. (2023) relataram a forte correlação dessa família com a presença de aldeídos em liquor tibetano, uma bebida destilada comum em países asiáticos. Na produção de cachaça, os aldeídos são formados durante a fermentação a partir da ação de leveduras nos estágios iniciais da fermentação. A presença desse aldeído é comum em bebidas

fermento-destiladas, pois ele é o último precursor antes da formação do etanol. É um dos principais metabólitos intermediários da fermentação, em que o piruvato, o produto final da glicólise, é convertido em acetaldeído por meio da enzima piruvato descarboxilase (CARDOSO, 2020; LIMA et al., 2022; SWIEGERS et al., 2005).

As mais fortes correlações positivas entre os teores de fufural e o microbioma foram observadas entre os gêneros bacterianos: *Acetobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Weissella*. A formação de furfural em cachaça está relacionada à desidratação e degradação térmica de pentoses, e podem ser formados devido à prática inadequada da queima da cana-de-açúcar, pela presença de resíduos de açúcar e levedura durante o aquecimento na destilação. O furfural é um aldeído tóxico para certos microrganismos, cuja presença no mosto de fermentação pode atuar favorecendo o crescimento de microrganismos que são capazes de metabolizá-lo, como algumas cepas de bactérias desses gêneros em que foram observadas fortes correlações positivas com esse composto. Essas bactérias sintetizam enzimas que hidrolisam os aldeídos cíclicos em seus respectivos ácidos graxos (BECERRA et al., 2022; GUTIÉRREZ et al., 2002; MITSUKURA et al., 2004; WU et al., 2013).

O butan-1-ol (álcool butílico) é um álcool indesejável na composição da cachaça e sua presença é associada à contaminação do mosto de fermentação por bactérias do gênero *Clostridium*, por meio da fermentação anaeróbica, que também resulta na formação de etanol e acetona, outra via de formação, é pela hidrólise do seu acetato correspondente (acetato de butila) (CARDOSO, 2020; LIMA et al., 2022). A presença do butan-1-ol foi fortemente correlacionado com as bactérias *Bradyrhizobium*, *Desulfatiglans*, *Spirochaeta 2* e *Wolbachia*. Entretanto, as informações na literatura que associem esses microrganismos com a produção desse álcool são escassas. Uma correlação positiva elevada também foi constatada entre o butan-1-ol e os gêneros *Lactobacillus* e *Saccharomyces*; algumas espécies desses gêneros são hábeis em tolerar e manter seu metabolismo em meios com concentrações de butan-1-ol, podendo contribuir para o desenvolvimento dessas cepas em detrimento dos demais microrganismos. Além disso, algumas cepas de *S. cerevisiae* são capazes de produzir butan-1-ol a partir da degradação enzimática de glicina (AZAMBUJA; GOLDBECK, 2020; AZAMBUJA et al., 2019; BRANDUARDI et al., 2013; GONG et al., 2022; IJOMA et al., 2021; LI et al., 2021).

As correlações entre a microbiota presente no “pé de cuba” e os álcoois butan-2-ol e propan-1-ol foram semelhantes (Figura 6). Ambos os compostos foram correlacionados forte e positivamente com *Alloprevotella*, *Candidatus Solibacter*, *Catenococcus*, *Celeribacter*, *Demequina*, *Intestinimonas*, *Lachnospiraceae* NK4A136, *Ruminococcaceae* UCG 014, *Shimia*,

Erythrobasidium e *Phlyctis*. As principais diferenças entre as correlações foram observadas entre os fungos *Aspergillus* e *Fusarium*, nos quais foram constatadas uma forte correlação positiva apenas com o butan-2-ol, enquanto, para o propan-1-ol, foi observada uma fraca correlação positiva com esses microrganismos.

A formação de butan-2-ol durante o processo de produção de cachaça é associado ao metabolismo de bactérias do gênero *Lactobacillus*, por meio da desidratação enzimática do 2,3-butanodiol a 2-butanona, seguida da redução da 2-butanona em butan-2-ol. Esse composto também pode ser formado por degradação espontânea redutiva do 2,3-butanodiol (CARDOSO, 2020; LIMA et al., 2022). Pode-se observar na Figura 6 que não ocorreu uma correlação positiva entre os teores de butan-2-ol e a abundância relativa de bactérias do gênero *Lactobacillus*, principal gênero associado à formação desse composto. O gênero *Lactobacillus* foi o mais abundante em todas as amostras de cultura inicial; entretanto, há inúmeras espécies que pertencem a esse gênero e possuem metabolismos distintos em relação à produção do butan-2-ol. Apenas algumas espécies de *Lactobacillus* são capazes de produzir esse álcool a partir de 2,3-butanodiol. Outro fator que pode influenciar na formação do butan-2-ol durante a fermentação é a presença de outros gêneros de bactérias que tem habilidade para produzir os seus intermediários, como *Klebsiella*. Algumas espécies desse gênero têm reconhecida a capacidade de metabolizar eficientemente o glicerol, produzindo compostos como 3-HPA e o 2,3-butanodiol (DAMASCENO; ROSSI; AYUB, 2022; GHIACI et al., 2014; MAR et al., 2020; RUSSMAYER; MARX; SAUER, 2019).

A presença de álcoois superiores como o propan-1-ol, 2-metilpropan-1-ol e 3-metilbutan-1-ol na cachaça pode estar relacionada à formação pelo metabolismo natural das leveduras por meio da Via de Ehrlich, onde ocorre a desaminação e descarboxilação de aminoácidos, como a leucina, isoleucina e valina, dependendo da concentração de aminoácidos no mosto de fermentação, para produzir álcoois superiores (CARDOSO, 2020; WALKER; STEWART, 2016). Além do metabolismo das leveduras, a formação de propan-1-ol pode estar relacionada à presença de bactérias do gênero *Lactobacillus* no mosto de fermentação. Ao contrário do observado para o butan-2-ol, a correlação desse composto com bactérias desse gênero foi ligeiramente positiva. Algumas espécies heterofermentativas pertencentes ao gênero *Lactobacillus* têm a capacidade de degradar anaeróbicamente compostos como ácido láctico e glicerol em 1,2-propanodiol, um intermediário que pode ser convertido por meio da catálise enzimática a propan-1-ol (GANZLE, 2015; SELWET, 2020; ZIELINSKA et al., 2017).

Alguns gêneros bacterianos que colonizam o trato gastrointestinal demonstraram alta correlação positiva com o propan-1-ol e butan-2-ol. Essas bactérias, de forma geral, se caracterizam pela utilização versátil de fontes de carbono, podendo crescer usando glicose, acetato e lactato, como substrato e formar butirato e propionato. Além disso, algumas espécies são hábeis para produzir enzimas diol desidratases, o que faz com que essas bactérias sejam capazes de metabolizar o glicerol a 3-HPA ou 1,2-propanodiol a propan-1-ol (ENGELS et al., 2016; GANZLE, 2015; KLARING et al., 2013).

O álcool superior 2-metilpropan-1-ol (álcool isobutílico) foi forte e positivamente correlacionado com o gênero *Pseudomonas*. Para esse mesmo gênero também foi observada uma correlação positiva com o álcool superior 3-metilbutan-1-ol (álcool isoamílico). Há relatos de que algumas espécies pertencentes ao gênero *Pseudomonas* possuem a capacidade de tolerar concentrações elevadas de compostos responsáveis pelo “flavour”, como álcoois superiores, que podem ser tóxicos para outros microrganismos. Espécies desse gênero também já foram associadas à formação desses dois álcoois superiores durante a deterioração do leite e queijo (BASLER et al., 2018; DECIMO et al., 2018; MORALES; GARCÍA; NUÑEZ, 2005). Pode-se observar que a amostra de “pé de cuba” em que foi constatada a maior abundância relativa para esse gênero (Figura 4C e D), também resultou nas maiores concentrações dos álcoois superiores isobutílico e amílico (Tabela 1). Correlações positivas inferiores também foram observadas entre os gêneros *Acetobacter*, *Candidatus Competibacter*, *Klebsiella* e *Weissella*, e o álcool isobutílico.

As mesmas correlações foram observadas entre os teores dos compostos álcool isoamílico e carbamato de etila e a microbiota presente nas culturas iniciais. Os dois compostos foram forte e positivamente correlacionados com *Bradyrhizobium*, *Candidatus Alysiosphaera*, *Lactobacillus*, *Pseudohalicia*, *Thiohalocapsa*, *Wolbachia* e *Saccharomyces*. Além disso, para esses compostos foram observadas fortes correlações negativas, com quase todos os outros gêneros de fungos, com exceção do *Penicillium* (Figura 6). A origem do carbamato de etila em cachaça ainda não foi totalmente elucidada, podendo ser atribuída à presença de composto nitrogenados, como a ureia, arginina, citrulina e glicosídeos cianogênicos, durante o processo fermentativo. Dependendo dos microrganismos presentes no mosto, esses compostos podem ser utilizados como precursores em diferentes mecanismos de formação do carbamato de etila (CARDOSO, 2020; GOWD et al., 2018; LIMA et al., 2022).

Bactérias do gênero *Bradyrhizobium* são hábeis fixadoras de nitrogênio encontradas nas raízes e rizosfera da cana-de-açúcar. A fixação de nitrogênio durante o cultivo da cana-de-

açúcar pode contribuir para o aumento da concentração desse composto na parte aérea da cultura (JUNIOR et al., 2019; MATOS et al., 2021). A cocultura contendo certas espécies de *Saccharomyces* e *Lactobacillus* já foram associadas à formação de carbamato de etila, pois esses microrganismos são capazes de degradar arginina, gerando citrulina e ureia durante a fermentação. Os dois compostos são considerados importantes precursores de formação do carbamato de etila (FANG; ZHOU; CHEN, 2019; FANG et al., 2020; TIAN et al., 2022).

As correlações entre os microrganismos presentes nas culturas iniciais e os compostos voláteis identificados nas frações cabeça, coração e cauda podem ser observadas na Figura 6. Entre os principais compostos identificados, correlações semelhantes às observadas para os teores de ésteres e acidez obtidos pelas análises físico-químicas, com correlações positivas principalmente com a comunidade fúngica foram constatadas com o éster acetato de etila. O octanoato de etila estava presente em todas as amostras com concentrações semelhantes (Tabela 4), e de forma geral, fortes correlações positivas não foram observadas, sendo constatada apenas para o gênero *Pseudomonas*. Bactérias desse gênero foram responsáveis pela formação de octanoato de etila em leite deteriorado, com característica de odor desagradável de fruta semelhante a abacaxi (WHITFIELD; JENSEN; SHAW, 2000). Decanoato de etila foi forte e positivamente correlacionado com *Bradyrhizobium*, *Desulfatiglans*, *Spirochaeta 2* e *Wolbachia*. Esse foi o composto identificado em maior abundância nas frações destiladas. Dodecanoato de etila (laurato de etila) se correlacionou fortemente com *Acetobacter*, *Lutimaribacter*, *Vibrio*, *Zymomonas*, *Cladosporium* e *Penicillium*. Correlações positivas foram observadas entre *Candidatus Alysiosphaera*, *Lactobacillus*, *Pseudohalaea*, *Thiohalocapsa* e *Saccharomyces* e o éster hexadecanoato de etila (palmitato de etila). Outro composto volátil abundante nos resultados de compostos voláteis foi o álcool 3-metilbutan-1-ol. As correlações observadas para esse composto foram semelhantes às obtidas para os teores do álcool isoamílico obtidos pela análise físico-química.

Os compostos voláteis 3-etoxipropanal e 1,1,3-trietoxipropano estavam entre os mais abundantes nas amostras C e D. E correlações semelhantes com a microbiota presente nas amostras de cultura inicial foram observadas entre eles. Os dois compostos foram fortemente correlacionados com *Alloprevotella*, *Bacillus*, *Intetinimonas*, *Lachnospiraceae* NK4A136, *Ruminococcaceae* UCG 014, e com a maioria dos fungos. Essas correlações são semelhantes às encontradas para acroleína, aldeídos e ésteres. Esses dois compostos são relacionados à presença de acroleína. A acroleína é um composto altamente reativo cujo teores tendem a reduzir ao longo do armazenamento da bebida por meio da sua conversão em seus derivados,

como o 1,1,3-trietoxipropano e 3-etoxipropanal. Esses dois compostos voláteis são resultantes da reação de adição da acroleína com o etanol, com a formação do 3-etoxipropanal, seguido da acetilação do grupo carbonila, originando o 1,1,3-trietoxipropano. O 1,1,3-trietoxipropano foi identificado em destilado de sidra e tem o descritor aromático associado a uma baixa qualidade sensorial por ter um defeito denominado “acroleína”. Entretanto, a presença desse composto pode ser considerada positiva, pois está associado à redução dos teores de acroleína, que tem características de pungente e lacrimante, e aumento das notas frutadas, derivadas desse composto (MADRERA; GOMIS; ALONSO, 2003; MADRERA et al., 2011).

Em suma, pode-se perceber que a cachaça é uma matriz complexa com uma ampla diversidade de compostos que contribuem de forma positiva ou negativa para suas características físico-químicas e sensoriais. A presença e os teores desses compostos estão correlacionados ao metabolismo da microbiota que constitui a cultura inicial utilizada para a fermentação do mosto do caldo de cana-de-açúcar, que dará origem a essa bebida destilada. Entretanto, a origem e os mecanismos de formação de muitos compostos ainda não estão completamente elucidados.

4 CONCLUSÃO

As amostras da cachaça e das frações cabeça e cauda produzidas nos alambiques estudados tiveram uma composição físico-química e volátil diversificada, que é influenciada pela presença dos microrganismos que constituem o “pé de cuba” e pelo processo de destilação.

As amostras eram diferentes em relação à riqueza e diversidade bacteriana e fúngica.

Certos microrganismos estavam presentes em todas as amostras, podendo ser indicados como característicos do processo de fermentação de cachaça. *Lactobacillus* foi o principal gênero bacteriano identificado em todas as amostras, com alta dominância em relação aos demais. Gêneros como *Wolbachia*, *Zymomonas* e *Acetobacter* também foram identificados em todas as amostras; porém, com diferenças em relação à abundância relativa.

Entre os gêneros fúngicos identificados, *Saccharomyces* foi o principal, mas uma grande diversidade foi observada em algumas amostras, com a presença de *Cladosporium*, *Geastrumia* e *Fusarium*, com elevada taxa de abundância relativa.

A composição volátil das frações cabeça, coração e cauda era constituída majoritariamente de ésteres e álcoois, sendo acetato de etila, octanoato de etila, decanoato de

etila, dodecanoato de etila, hexadecanoato de etila e 3-metilbutan-1-ol os principais compostos identificados.

As principais correlações positivas foram observadas entre os gêneros bacterianos *Komagataeibacter*, *Bacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e os teores de acidez volátil; os teores de acroleína e os gêneros *Bacillus* e *Lactococcus*; entre as concentrações de butan-1-ol e a presença de *Saccharomyces* e *Lactobacillus*; bactérias *Ruminococcaceae* UCG-014, *Intestinimonas* e *Alloprevotella* e os teores de butan-2-ol e propan-1-ol; os teores dos álcoois isoamílico e isobutílico e o gênero *Pseudomonas*; entre as concentrações de carbamato de etila e os gêneros *Bradyrhizobium*, *Lactobacillus* e *Saccharomyces*.

REFERÊNCIAS

ABARENKOV, K. et al. **UNITE general FASTA release for Fungi**. Version 16.10,2022. UNITE Community. 2022

ABDALLAH, M. F. et al. Risk characterization and quantification of mycotoxins and their producing fungi in sugarcane juice: A neglected problem in a widely-consumed traditional beverage. **Food Control**, v. 108, p. 106811, 2020.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Gruver: Texensis Publishing, 2017.

AHMED, A.; DAWAR, S.; TARIQ, M. Mycoflora associated with sugar cane juice in Karachi city. **Pak. J. Bot**, v. 42, n. 4, p. 2955-2962, 2010.

AHMED, S. et al. The *Weissella* genus: Clinically treatable bacteria with antimicrobial/probiotic effects on inflammation and cancer. **Microorganisms**, v. 10, n. 12, p. 2427, 2022.

ALMATAR, M.; MAKKY, E. A. *Cladosporium cladosporioides* from the perspectives of medical and biotechnological approaches. **3 Biotech**, v. 6, p. 1-8, 2016.

AMORIM, J. C.; SCHWAN, R. F.; DUARTE, W. F. Sugar cane spirit (cachaça): Effects of mixed inoculum of yeasts on the sensory and chemical characteristics. **Food Research International**, v. 85, p. 76–83, 2016.

ARAÚJO, T. M. et al. Cachaça yeast strains: alternative starters to produce beer and bioethanol. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 111, p. 1749-1766, 2018.

ARIAS, M. M. D. et al. Diversity and biogeography of sooty blotch and flyspeck fungi on apple in the eastern and midwestern United States. **Phytopathology**, v. 100, n. 4, p. 345-355, 2010.

ASSAF, C. H. et al. Regulation of secondary metabolism in the *Penicillium* genus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 24, p. 9462, 2020.

AZAMBUJA, S. P. et al. Analysis of metabolite profiles of *Saccharomyces cerevisiae* strains suitable for butanol production. **FEMS Microbiology Letters**, v. 366, n. 13, p. fnz164, 2019.

AZAMBUJA, S. P.; GOLDBECK, R. Butanol production by *Saccharomyces cerevisiae*: perspectives, strategies and challenges. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 1-9, 2020.

BECERRA, M. L. et al. Biotransformation of 5-hydroxymethylfurfural and furfural with bacteria of *Bacillus* genus. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 39, p. 102281, 2022.

Badotti, F. et al. *Wickerhamiella dulcicola* sp. nov. and *Wickerhamiella cachassae* sp. nov., yeasts isolated from cachaça fermentation in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. Pt_3, p. 1169-1173, 2013.

BARBOSA, E. A. et al. Quality improvement and geographical indication of cachaça (Brazilian spirit) by using locally selected yeast strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 4, p. 1038-1051, 2016.

Barbosa, R. B. et al. Kinetic, thermodynamic and physical-chemical study of the removal of copper from cachaça using coconut fibers. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 39, n. 9, p. 1544-1554, 2022.

Basler, G. et al. A *Pseudomonas putida* efflux pump acts on short-chain alcohols. **Biotechnology for biofuels**, v. 11, p. 1-10, 2018.

Batzer, J. C. et al. Composition of the sooty blotch and flyspeck complex on apple in Norway is influenced by location and management practices. **European Journal of Plant Pathology**, v. 141, p. 361-374, 2015.

BAUER, R.; COWAN, D. A.; CROUCH, A. Acrolein in wine: Importance of 3-hydroxypropionaldehyde and derivatives in production and detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 3243-3250, 2010.

BERBEGAL, C. et al. A metagenomic-based approach for the characterization of bacterial diversity associated with spontaneous malolactic fermentations in wine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, p. 3980, 2019.

BORA, S. S. et al. Metagenomics analysis of microbial communities associated with a traditional rice wine starter culture (Xaj-pitha) of Assam, India. **3 Biotech**, v. 6, p. 1-13, 2016.

BORTOLETTO, A. M.; SILVELLO, G. C.; ALCARDE, A. R. Good manufacturing practices, hazard analysis and critical control point plan proposal for distilleries of cachaça. **Scientia Agricola**, v. 75, p. 432-443, 2018.

BOUQELLAH, N. A. Identification of Different Isolated Fungi from Scaly Debris of Colocasia Corm With Potential Production of Cellulase. **Egyptian Journal of Botany**, v. 59, n. 2, p. 513-522, 2019.

BRANDUARDI, P. et al. A novel pathway to produce butanol and isobutanol in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Aprova o Manual Operacional de Bebidas e Vinagres. **Instrução normativa n. 24, de 08 de setembro de 2005**. Diário Oficial da União, Setembro 30, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Anuário da Cachaça 2021**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/AECS, 29p, 2022a.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Portaria n° 539, de 26 de dezembro de 2022**. Diário Oficial [da] União, Seção I, p.13. Brasil, DF, 27 de dez. 2022, 2022b.

BREXO, R. P. et al. Yeasts from indigenous culture for cachaca production and brewer's spent grain: Biodiversity and phenotypic characterization for biotechnological purposes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 124, p. 107-120, 2020.

CAETANO, D. et al. Descriptive screening and lexicon development of non-aged artisanal cachaça sensorial profile using principal component analysis and Kohonen artificial neural networks. **Journal of Sensory Studies**, v. 36, n. 3, p. e12645, 2022.

CALLAHAN, B. J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature methods**, v. 13, n. 7, p. 581-583, 2016.

CAMACHO, J. J. R. et al. Combining omics tools for the characterization of the microbiota of diverse vinegars obtained by submerged culture: 16S rRNA amplicon sequencing and MALDI-TOF MS. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022.

CARAGATA, E. P. et al. *Wolbachia* as translational science: controlling mosquito-borne pathogens. **Trends in Parasitology**, v. 37, n. 12, p. 1050-1067, 2021.

CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana**. 4. ed. Lavras: Editora UFLA. 444 p. 2020.

CARVALHO, L. A. L. et al. Farming systems influence the compositional, structural, and functional characteristics of the sugarcane-associated microbiome. **Microbiological Research**, v. 252, p. 126866, 2021.

CARVALHO, F. P. et al. Interaction of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactococcus lactis* in the fermentation and quality of artisanal cachaça. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 37, p. 51-60, 2015.

CARVALHO-NETTO, O. V. D.; ROSA, D. D.; CAMARGO, L. E. A. Identificación of contaminant bacteria in cachaça yeast by 16s rDNA gene sequencing. **Scientia Agricola**, v. 65, p. 508-515, 2008.

CECCATO-ANTONINI, S. R. C. **Microbiologia da fermentação alcoólica: A importância do monitoramento microbiológico em destilarias**. Coleção UAB–UFSCar: Tecnologia das fermentações. São Carlos, EdUFSCAR, 2012.

CHEN, G.; CHEN, C.; LEI, Z. Meta-omics insights in the microbial community profiling and functional characterization of fermented foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 65, p. 23-31, 2017.

CHEN, C. et al. Metagenomic analysis reveals the impact of JIUYAO microbial diversity on fermentation and the volatile profile of Shaoxing-jiu. **Food Microbiology**, v. 86, p. 103326, 2020.

CHEN, H. et al. Fecal microbiota dynamics and its relationship to diarrhea and health in dairy calves. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 1-20, 2022.

CHOI, D. H.; CHO, B. C. *Shimia marina* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium of the Roseobacter clade isolated from biofilm in a coastal fish farm. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 8, p. 1869-1873, 2006.

COSTA, A. C. T. et al. Complete genome sequence and analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* strain used for sugarcane spirit production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 1087-1095, 2021.

DOWNES, J. et al. Description of *Alloprevotella rava* gen. nov., sp. nov., isolated from the human oral cavity, and reclassification of *Prevotella tanneriae* Moore et al. 1994 as *Alloprevotella tanneriae* gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. Pt_4, p. 1214-1218, 2013.

DAMASCENO, A. P. K.; ROSSI, D. M.; AYUB, M. A. Z. Biosynthesis of 1, 3-propanediol and 2, 3-butanediol from residual glycerol in continuous cell-immobilized *Klebsiella pneumoniae* bioreactors. **Biotechnology Progress**, v. 38, n. 4, p. e3265, 2022.

DECIMO, M. et al. Volatile organic compounds associated with milk spoilage by psychrotrophic bacteria. **International Journal of Dairy Technology**, v. 71, n. 3, p. 593-600, 2018.

DENG, Y. et al. The potential role of palygorskite and probiotics complex on the laying performance and faecal microbial community in Xuefeng black-bone chicken. **Italian Journal of Animal Science**, v. 21, n. 1, p. 1660-1669, 2022.

DIAZ, M. et al. Comparison of the microbial composition of African fermented foods using amplicon sequencing. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2019.

DJENI, T. N. et al. Microbial diversity and metabolite profiles of palm wine produced from three different palm tree species in Côte d'Ivoire. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1715, 2020.

DUARTE, W. F. et al. Effect of co-inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus fermentum* on the quality of the distilled sugar cane beverage cachaça. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 9, p. C1307-C1318, 2011.

DUARTE, W. F.; AMORIM, J. C.; SCHWAN, R. F. The effects of co-culturing non-*Saccharomyces* yeasts with *S. cerevisiae* on the sugar cane spirit (cachaça) fermentation process. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, p. 175-194, 2013.

- ENGELS, C. et al. The common gut microbe *Eubacterium hallii* also contributes to intestinal propionate formation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 713, 2016.
- ERNANDES, F. M. P. G.; CRUZ, C. H. G. Uso de caldo de cana-de-açúcar para produção de levana por *Zymomonas mobilis* CCT4494. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 354-360, 2011.
- ESPINOSA, D. V. C. et al. Selection and identification of fungi isolated from sugarcane bagasse and their application for phenanthrene removal from soil. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, v. 41, n. 3, p. 475-486, 2006.
- EZEONUEGBU, B. A. et al. Characterization and phylogeny of fungi isolated from industrial wastewater using multiple genes. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 2094, 2022.
- FANG, R., ZHOU, W., & CHEN, Q. Ethyl carbamate regulation and genomic expression of *Saccharomyces cerevisiae* during mixed-culture yellow rice wine fermentation with *Lactobacillus* sp. **Food Chemistry**, v. 292, p. 90-97, 2019.
- FANG, R. et al. Improving the enzyme property of ornithine transcarbamylase from *Lactobacillus brevis* through site-directed mutation. **LWT**, v. 133, p. 109953, 2020.
- FELL, J. W. et al. Five new species of yeasts from fresh water and marine habitats in the Florida Everglades. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 99, p. 533-549, 2011.
- FENG, Y. et al. Environmental enrichment changes rabbits' behavior, serum hormone level and further affects cecal microbiota. **PeerJ**, v. 10, p. e13068, 2022.
- FENTIE, E. G. et al. Physicochemical properties, antioxidant activities and microbial communities of Ethiopian honey wine, Tej. **Food Research International**, v. 152, p. 110765, 2022.
- FLAVORNET. **Flavornet and human odor space**. Available at <http://flavornet.org/> Accessed in: February, 11 2023.
- FOKUM, E. et al. Recent technological and strategical developments in the biomanufacturing of 1, 3-propanediol from glycerol. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 18, p. 2467-2490, 2021.
- FRANCO, M. D. O. K. et al. Using colorimetric spot test and digital imaging-based technique for volatile acidity determination in cachaça with the aid of a smartphone. **Microchemical Journal**, p. 108416, 2023.
- GABRIEL, A. V. M. D. et al. Effect of the spontaneous fermentation and the ageing on the chemo-sensory quality of Brazilian organic cachaça. **Ciência Rural**, v. 42, p. 918-925, 2012.
- GALIMBERTI, A. et al. Emerging DNA-based technologies to characterize food ecosystems. **Food Research International**, v. 69, p. 424-433, 2015.
- GÄNZLE, M. G. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 106-117, 2015.

GAO, J. et al. Constructing simplified microbial consortia to improve the key flavour compounds during strong aroma-type Baijiu fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 369, p. 109594, 2022.

GAROFALO, C. et al. Study of kefir drinks produced by backslopping method using kefir grains from Bosnia and Herzegovina: Microbial dynamics and volatilome profile. **Food research international**, v. 137, p. 109369, 2020.

GHIACI, P. et al. Production of 2-butanol through meso-2, 3-butanediol consumption in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 360, n. 1, p. 70-75, 2014.

GOMES, F. C. et al. Identification of lactic acid bacteria associated with traditional cachaça fermentations. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 486-492, 2010.

GONÇALVES, R. C. F. et al. Compostos voláteis em cachaças de alambique produzidas por leveduras selecionadas e por fermentação espontânea. **Magistra**, v. 28, n. 3/4, p. 285-293, 2016.

GONG, Y. et al. A strain of *Saccharomyces cerevisiae* with high production of butanol. **European Food Research and Technology**, p. 1-11, 2022.

GOWD, V. et al. Ethyl carbamate: an emerging food and environmental toxicant. **Food Chemistry**, v. 248, p. 312-321, 2018.

GRAHAME, D. A. et al. Alkaline conditions stimulate the production of 1, 3-propanediol in *Lactobacillus panis* PM1 through shifting metabolic pathways. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 1207-1215, 2013.

GRIMES, D. J. The vibrios: Scavengers, symbionts, and pathogens from the sea. **Microbial ecology**, v. 80, n. 3, p. 501-506, 2020.

GRUHN, G. et al. The genus *Resinicium* in French Guiana and the West Indies: a morphological and molecular survey, revealing *Resinicium grandisporum* sp. nov. **Cryptogamie, Mycologie**, v. 38, n. 4, p. 469-483, 2017.

GUARDADO, R. T. et al. Microbial interactions in alcoholic beverages. **International Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 1-15, 2022.

GULATI, R. et al. Biocatalytic potential of *Fusarium globulosum* lipase in selective acetylation/deacetylation reactions and in ester synthesis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 4, p. 609-613, 2001.

GUTIÉRREZ, T. Reduction of furfural to furfuryl alcohol by ethanologenic strains of bacteria and its effect on ethanol production from xylose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98, p. 327-340, 2002.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.

HERMANSSON, A.; LINDGREN, P. E. Quantification of ammonia oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p. 972–976, 2001.

HIRST, M. B.; RICHTER, C. L. Review of aroma formation through metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in beverage fermentations. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 67, n. 4, p. 361-370.

HONG, X. et al. Metagenomic sequencing reveals the relationship between microbiota composition and quality of Chinese Rice Wine. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 26621, 2016.

IJOMA, G. N. et al. Peculiar Response in the Co-Culture Fermentation of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum* for the Production of ABE Solvents. **Fermentation**, v. 7, n. 4, p. 212, 2021.

IVANOVA, E. P. et al. *Celeribacter neptunius* gen. nov., sp. nov., a new member of the class Alphaproteobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 1620-1625, 2010.

IWAKI, H. et al. Isolation and characterization of a marine cyclohexylacetate-degrading bacterium *Lutimaribacter litoralis* sp. nov., and reclassification of *Oceanicola pacificus* as *Lutimaribacter pacificus* comb. nov. **Current Microbiology**, v. 66, p. 588-593, 2013.

JAMI, M. et al. *Celeribacter persicus* sp. nov., a polycyclic-aromatic-hydrocarbon-degrading bacterium isolated from mangrove soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1875-1880, 2016.

JANG, J. et al. Identification of *Weissella* species by the genus-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, n. 1, p. 29-34, 2002.

JIANG, K. et al. Origin and fate of acrolein in foods. **Foods**, v. 11, n. 13, p. 1976, 2022.

JÚNIOR, I. et al. Occurrence of diverse *Bradyrhizobium* spp. in roots and rhizospheres of two commercial Brazilian sugarcane cultivars. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 759-767, 2019.

KAVITAKE, D.; DEVI, P. B.; SHETTY, P. H. Overview of exopolysaccharides produced by *Weissella* genus—A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 2964-2973, 2020.

KIM, E. et al. A proteomic approach for rapid identification of *Weissella* species isolated from Korean fermented foods on MALDI-TOF MS supplemented with an in-house database. **International Journal of Food Microbiology**, v. 243, p. 9-15, 2017.

KLARING, K. et al. *Intestinimonas butyriciproducens* gen. nov., sp. nov., a butyrate-producing bacterium from the mouse intestine. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. Pt_12, p. 4606-4612, 2013.

KOBAYASHI, F. et al. Inactivation of *Lactobacillus fructivorans* in physiological saline and unpasteurised sake using CO₂ microbubbles at ambient temperature and low pressure. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 6, p. 1151-1157, 2012.

KRAGELUND, C. et al. Ecophysiology of different filamentous *Alphaproteobacteria* in industrial wastewater treatment plants. **Microbiology**, v. 152, n. 10, p. 3003-3012, 2006.

LACERDA, I. C. et al. Identification of the bacterial community responsible for traditional fermentation during sour cassava starch, cachaça and minas cheese production using culture-independent 16s rRNA gene sequence analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 650-657, 2011.

LAGO, L. O. et al. Influence of ripeness and maceration of the grapes on levels of furan and carbonyl compounds in wine—simultaneous quantitative determination and assessment of the exposure risk to these compounds. **Food Chemistry**, v. 230, p. 594-603, 2017.

LAS HERAS, E. et al. Quantitative determination of acrolein in cider by ¹H NMR spectrometry. **Foods**, v. 9, n. 12, p. 1820, 2020.

LEDORMAND, P. et al. Molecular approaches to uncover phage-lactic acid bacteria interactions in a model community simulating fermented beverages. **Food Microbiology**, v. 107, p. 104069, 2022.

LEVANTESI, C. et al. Filamentous Alphaproteobacteria associated with bulking in industrial wastewater treatment plants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 716-727, 2004.

LI, M. et al. *Fusarium*: a treasure trove of bioactive secondary metabolites. **Natural Product Reports**, v. 37, n. 12, p. 1568-1588, 2020.

LI, Q. et al. Recent progress on n-butanol production by lactic acid bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 1-16, 2021.

LI, Y. et al. Microbial diversity and volatile flavor compounds in tibetan flavor Daqu. **Foods**, v. 12, n. 2, p. 324, 2023.

LIAO, R. et al. Ages of weaning influence the gut microbiota diversity and function in Chongming white goats. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 3649-3658, 2021.

LIMA, C. M. G. et al. A state-of-the-art review of the chemical composition of sugarcane spirits and current advances in quality control. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 106, p. 104338, 2022.

LIN, L. et al. Regulation of auxotrophic lactobacilli growth by amino acid cross-feeding interaction. **International Journal of Food Microbiology**, v. 377, p. 109769, 2022.

LINGANI, H. S. et al. Sustainable production of African traditional beers with focus on dolo, a West African sorghum-based alcoholic beverage. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 672410, 2021.

LIU, X. Z. et al. Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. **Studies in Mycology**, v. 81, n. 1, p. 85-147, 2016.

LIU, S. et al. A metagenomic analysis of the relationship between microorganisms and flavor development in Shaoxing mechanized huangjiu fermentation mashes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 303, p. 9-18, 2019.

LIU, S. et al. Microbiome analysis reveals the effects of black soldier fly oil on gut microbiota in pigeon. **Frontiers in Microbiology**, p. 13, 2022.

LONHIENNE, C. et al. Nitrogen fertilizer dose alters fungal communities in sugarcane soil and rhizosphere. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2015.

LÓPEZ, N. G. C. et al. Molecular tools used for metagenomic analysis. Review. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**, v. 11, n. 4, p. 1150-1173, 2020.

LU, S. et al. Bacillus-derived probiotics: metabolites and mechanisms involved in bacteria–host interactions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-14, 2022.

MACHADO, A. M. R. et al. Determination of ethyl carbamate in cachaça produced from copper stills by HPLC. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2-3, p. 1233-1238, 2013.

MADRERA, R. R.; GOMIS, D. B.; ALONSO, J. J. M. Influence of distillation system, oak wood type, and aging time on volatile compounds of cider brandy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 19, p. 5709-5714, 2003.

MADRERA, R. R. et al. Chemical and sensory changes in fresh cider spirits during maturation in inert containers. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 5, p. 797-804, 2011.

MAHAYRI, T. M. et al. Host species affects bacterial evenness, but not diversity: comparison of fecal bacteria of cows and goats offered the same diet. **Animals**, v. 12, n. 16, p. 2011, 2022.

MAR, M. J. et al. Synergy at work: linking the metabolism of two lactic acid bacteria to achieve superior production of 2-butanol. **Biotechnology for Biofuels**, v.13, n. 1, p. 1-10, 2020.

MARQUES, N. P. et al. Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 66-75, 2018.

MARZANO, M. et al. Complexity and dynamics of the winemaking bacterial communities in berries, musts, and wines from *Apulian grape* cultivars through time and space. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0157383, 2016.

MATOS, G. F. et al. Evolution and function of nitrogen fixation gene clusters in sugarcane associated *Bradyrhizobium* strains. **Environmental Microbiology**, v. 23, n. 10, p. 6148-6162, 2021.

MEHNAZ, S. Microbes–friends and foes of sugarcane. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, n. 12, p. 954-971, 2013.

MEHTA, A. et al. Application of lipase purified from *Aspergillus fumigatus* in the syntheses of ethyl acetate and ethyl lactate. **Journal of Oleo Science**, v. 69, n. 1, p. 23-29, 2020.

MILANOVIĆ, V. et al. Profiling white wine seed vinegar bacterial diversity through viable counting, metagenomic sequencing and PCR-DGGE. **International Journal of Food Microbiology**, v. 286, p. 66-74, 2018.

MILANOVIĆ, V. et al. Croatian white grape variety Maraština: First taste of its indigenous mycobiota. **Food Research International**, v. 162, p. 111917, 2022.

MITSUKURA, K. et al. Oxidation of heterocyclic and aromatic aldehydes to the corresponding carboxylic acids by *Acetobacter* and *Serratia* strains. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 1643-1648, 2004.

MORALES, P.; GARCÍA, E. F.; NUÑEZ, M. Volatile compounds produced in cheese by *Pseudomonas* strains of dairy origin belonging to six different species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 17, p. 6835-6843, 2005.

MORRISON-WHITTLE, P.; GODDARD, M. R. From vineyard to winery: a source map of microbial diversity driving wine fermentation. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 75-84, 2018.

MUSCAT, A. et al. Characterization of fungal surface contaminants of the small Maltese June Pear, *Pyrus communis* var. *Bambinella*. **Journal of Food Protection**, v. 83, n. 8, p. 1359-1367, 2020.

MUTTON, M. J. R. et al. The clarification of sugarcane juice and the use of CA-11 yeast produces better quality cachaça. **Revista Ciência Agronômica**, p. 51, 2020.

NAKASONE, K. K.; NAKASONE, K. K. Reexamination of *Odontia sacchari*, *O. saccharicola*, and *Corticium granulare*. **Karstenia**, v. 40, n. 1-2, p. 111-116, 2000.

NASCIMENTO, R. F. et al. Qualitative and quantitative high-performance liquid chromatographic analysis of aldehydes in Brazilian sugar cane spirits and other distilled alcoholic beverages. **Journal of Chromatography A**, v. 782, n. 1, p. 13-23, 1997.

NIELSEN, D. S. et al. *Lactobacillus ghanensis* sp. nov., a motile lactic acid bacterium isolated from Ghanaian cocoa fermentations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 7, p. 1468-1472, 2007.

NIELSEN, P. H. et al. Identity and ecophysiology of filamentous bacteria in activated sludge. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 6, p. 969-998, 2009.

NILSSON, R. H. et al. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D259-D264, 2019.

NIST. National Institute of Standards and Technology. **Chemistry WebBook**. NIST Standard Reference Database Number 69. Available at: <https://webbook.nist.gov/chemistry/> Accessed January, 30, 2023. DOI: <https://doi.org/10.18434/T4D303>

OLIVEIRA, R. E. S. et al. Physicochemical parameters and volatile composition of cachaça produced in the state of Paraíba, Brasil. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e504974409, 2020.

PACÍFICO, C. et al. Unveiling the bovine epimural microbiota composition and putative function. **Microorganisms**, v. 9, n. 2, p. 342, 2021.

PAPAGIANNI, M.; PAPAMICHAEL, E. M. Production of the antimicrobial protein weisselin a by *Weissella paramesenteroides* dx in batch fermentations: the type of carbohydrate used as the C-source in the substrate affects the association of production with growth. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, p. 1212-1222, 2012.

PEREIRA, G. V. M. et al. A review of selection criteria for starter culture development in the food fermentation industry. **Food Reviews International**, v. 36, n. 2, p. 135-167, 2020.

PORTILLO, M. C. et al. Bacterial diversity of Grenache and Carignan grape surface from different vineyards at Priorat wine region (Catalonia, Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v. 219, p. 56-63, 2016.

PORTUGAL, C. B. et al. The role of spontaneous fermentation for the production of cachaça: a study of case. **European Food Research and Technology**, v. 242, p. 1587-1597, 2016.

PORTUGAL, C. B. et al. How native yeasts may influence the chemical profile of the Brazilian spirit, cachaça?. **Food Research International**, v. 91, p. 18-25, 2017.

PRUDNIKOVA, S. V. et al. Metabolic activity of cryogenic soils in the subarctic zone of Siberia towards “green” bioplastics. **Chemosphere**, v. 263, p. 128180, 2021.

RAMÍREZ, Y. R. et al. Probiotic activity traits in vitro and production of antimicrobial peptides by Lactobacillaceae isolates from pulque using *Lactobacillus acidophilus* NCFM as control. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 921-933, 2022.

RAMOS, S. C. et al. Enhanced ruminal fermentation parameters and altered rumen bacterial community composition by formulated rumen buffer agents fed to dairy cows with a high-concentrate diet. **Agriculture**, v. 11, n. 6, p. 554, 2021.

RASPOR, P.; GORANOVIĆ, D. Biotechnological applications of acetic acid bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 101-124, 2008.

RUSSMAYER, H.; MARX, H.; SAUER, M. Microbial 2-butanol production with *Lactobacillus diolivorans*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2019.

SABATER, C. et al. Novel methods of microbiome analysis in the food industry. **International Microbiology**, p. 1-13, 2021.

SALVATORE, M. M.; ANDOLFI, A.; NICOLETTI, R. The genus *Cladosporium*: A rich source of diverse and bioactive natural compounds. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 3959, 2021.

SANDERS, J. W. et al. Biodiversity of spoilage lactobacilli: phenotypic characterisation. **Food Microbiology**, v. 45, p. 34-44, 2015.

SANTIAGO, W. D. et al. Physicochemical profile and determination of volatile compounds in cachaça stored in new oak (*Quercus* sp.), amburana (*Amburana cearensis*), jatoba (*Hymenaea carbouril*), balsam (*Myroxylon peruiferum*) and peroba (*Paratecoma peroba*) casks by SPME-GC-MS. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, n. 4, p. 624-634, 2016.

SANTIAGO, W. D. et al. Determination of ethyl carbamate in cachaça stored in newly made oak, amburana, jatobá, balsa and peroba vats and in glass containers. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, n. 4, p. 572-578, 2017.

SCHLOSS, P. D.; LARGET, B. R.; HANDELSMAN, J. Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. **Applied Environmental Microbiology**, p. 70, 5485-5492, 2004.

SCHWAN, R. F.; DIAS D. R. **Fermentação** In: CARDOSO, M. G. Produção de Aguardente de Cana. 4 ed. Lavras: Editora UFLA, p. 93 – 119, 2020.

SCHWAN, R. F. et al. Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 79, p. 89-96, 2021.

SELWET, M. Influence of inoculation with *Lactobacillus* on fermentation, production of 1, 2-propanediol and 1-propanol as well as Maize silage aerobic stability. **Open Life Sciences**, v. 15, n. 1, p. 373-378, 2020.

SEO, H. et al. Characteristics and microbiome profiling of korean gochang bokbunja vinegar by the fermentation process. **Foods**, v. 11, n. 20, p. 3308, 2022.

SERAFIM, F. A. et al. Quantitative chemical profile and multivariate statistical analysis of alembic distilled sugarcane spirit fractions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 1506-1514, 2012.

SERAFIM, F. A. et al. Correlation between chemical composition and sensory properties of Brazilian sugarcane spirits (cachaças). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 973-982, 2013.

SIRÉN, K. et al. Taxonomic and functional characterization of the microbial community during spontaneous in vitro fermentation of *Riesling* must. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 697, 2019.

SILVA, M. et al. Naming potentially endangered parasites: foliicolous mycobiota of *Dimorphandra wilsonii*, a highly threatened Brazilian tree species. **PloS one**, v. 11, n. 2, p. e0147895, 2016.

SILVEIRA, A. L. et al. Profile of volatile organic compounds in musts and cachaças produced by selected *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e23410414009-e23410414009, 2021.

SOARES, T. L.; SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F. Acompanhamento do processo de fermentação para produção de cachaça através de métodos microbiológicos e físico-químicos com diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Science and Technology**, v. 31, p. 184-187, 2011.

SOUZA, A. P. G. et al. Strategies to select yeast starters cultures for production of flavor compounds in cachaça fermentations. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 101, p. 379-392, 2012.

STAMATIS, H. et al. Studies on the synthesis of short-chain geranyl esters catalysed by *Fusarium oxysporum* esterase in organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 4, n. 4, p. 229-236, 1998.

STUART, R. M. et al. Culturable endophytic filamentous fungi from leaves of transgenic imidazolinone-tolerant sugarcane and its non-transgenic isolines. **Archives of Microbiology**, v. 192, p. 307-313, 2010.

STUBNER, S. Quantification of gram-negative sulphate-reducing bacteria in rice field soil by 16S rRNA gene-targeted real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 57, p. 219-230, 2004.

SUN, H. et al. Effects of intestinal microbiota on physiological metabolism and pathogenicity of *Vibrio*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 947767, 2022.

SWIEGERS, J. H. et al. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 11, n. 2, p. 139-173, 2005.

TAN, B. H., M. et al. *Erythrobasidium leptospermi* Y.P. Tan, Gogorza Gondra & R.G. Shivas. **Index Fungorum**, v. 503, n. 2, 2021.

TEKPINAR, A. D.; KALMER, A. Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny. **Nova Hedwigia**, v. 109, n. 1-2, p. 187-224, 2019.

TENORIO, L. M. et al. Non-conventional cuts in batch distillation to brazilian spirits (cachaça) production: a computational simulation approach. **Processes**, v. 11, n. 1, p. 74, 2023.

TIAN, S. et al. Effects of fortified starter culture containing *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus fermentum* on microbial community structure and ethyl carbamate. **Food Control**, v. 137, p. 108890, 2022.

TORRES, L. R.; PUJALTE, M. J.; ARAHAL, D. R. Draft genome sequence of *Shimia marina* CECT 7688T. **Marine Genomics**, v. 28, p. 83-86, 2016.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, v. 296, p. 1064-1066, 2002.

UNNO, R. et al. Causality verification for the correlation between the presence of nonstarter bacteria and flavor characteristics in soft-type ripened cheeses. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 6, p. e02894-22, 2022.

VARGAS, K. C. et al. Genomic profiling of bacterial and fungal communities and their predictive functionality during pulque fermentation by whole-genome shotgun sequencing. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020.

VILELA, F. J. et al. Determination of the physical-chemical composition of homemade cachaças produced in the South of Minas Gerais and their mixtures. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1089-1094, 2007.

Vivek, N., Hazeena, S. H., Rajesh, R. O., Godan, T. K., Anjali, K. B., Nair, L. M., ... & Binod, P. (2019). Genomics of lactic acid bacteria for glycerol dissimilation. *Molecular Biotechnology*, 61, 562-578.

WALKER, G. M.; STEWART, G. G. *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. **Beverages**, v. 2, n. 4, p. 30, 2016.

WANGKEEREE, J. et al. Effect of Wolbachia infection states on the life history and reproductive traits of the leafhopper *Yamatotettix flavovittatus* Matsumura. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 177, p. 107490, 2020.

WANG, L. et al. Relationship between true digestibility of dietary phosphorus and gastrointestinal bacteria of goats. **Plos One**, v. 15, n. 5, p. e0225018, 2020.

WANG, X. et al. Chemical profile and antioxidant capacity of kombucha tea by the pure cultured kombucha. **LWT**, v. 168, p. 113931, 2022.

WEIR, P. M. The ecology of *Zymomonas*: a review. **Folia Microbiologica**, v. 61, p. 385-392, 2016.

WHITFIELD, F. B.; JENSEN, N.; SHAW, K. J. Role of *Yersinia intermedia* and *Pseudomonas putida* in the development of a fruity off-flavour in pasteurized milk. **Journal of Dairy Research**, v. 67, n. 4, p. 561-569, 2000.

WIESE, B. G. et al. *Lactobacillus panis* sp. nov., from sourdough with a long fermentation period. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 449-453, 1996.

WU, J. et al. Analysis of acetic acid, furfural and 5-hydroxymethylfurfural affecting 2, 3-butanediol production using *Klebsiella oxytoca*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 88, n. 12, p. 2239-2243, 2013.

WU, Y.; LIN, Y. H. Fermentation redox potential control on the 1, 3-propanediol production by *Lactobacillus panis* PM1. **Process Biochemistry**, v. 114, p. 139-146, 2022.

XIAO, R. et al. Microbial community starters affect the profiles of volatile compounds in traditional Chinese Xiaoqu rice wine: Assesment via high-throughput sequencing and gas chromatography-ion mobility spectrometry. **LWT**, v. 170, p. 114000, 2022.

XU, Y. et al. Flavor mystery of Chinese traditional fermented baijiu: The great contribution of ester compounds. **Food Chemistry**, v. 369, p. 130920, 2022.

YOON, J. H. et al. *Lutimaribacter saemankumensis* gen. nov., sp. nov., isolated from a tidal flat of the Yellow Sea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 48-52.

YU, J. et al. Taxonomy and phylogeny of *Resinicium sensu lato* from Asia-Pacific revealing a new genus and five new species (Hymenochaetales, Basidiomycota). **IMA fungus**, v. 12, n. 1, p. 1-16, 2021.

ZACARONI, L. M. et al. Caracterização e quantificação de contaminantes em aguardentes de cana. **Química Nova**, v. 34, p. 320-324, 2011.

ZACARONI, L. M. et al. Response surface optimization of SPME extraction conditions for the analysis of volatile compounds in Brazilian sugar cane spirits by HS-SPME-GC–MS. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, n. 2, p. 226-231, 2017.

ZHAO, W.; GU, C. T. *Lactobacillus homohiochii* is a later heterotypic synonym of *Lactobacillus fructivorans*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 1720-1723, 2019.

ZHU, Y. et al. Current advances in microbial production of 1, 3-propanediol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 15, n. 5, p. 1566-1583, 2021.

ZIELIŃSKA, K. et al. Evaluation of the ability to metabolize 1, 2-propanediol by heterofermentative bacteria of the genus *Lactobacillus*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 26, p. 60-63, 2017.

ZOTTA, T. et al. Urease production by *Streptococcus thermophilus*. **Food Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 113-119, 2008.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho mostra cientificamente que a identificação dos microrganismos presentes na cadeia de produção da aguardente de cana-de-açúcar/cachaça, principalmente na cultura inicial (“pé de cuba”), e dos possíveis produtos que podem ser originados do metabolismo desses microrganismos são essenciais para compreender a procedência dos compostos secundários desejáveis e indesejáveis que compõem o destilado. Esses microrganismos influenciam diretamente a composição físico-química e volátil da aguardente/cachaça produzida. O compartilhamento desses dados com a sociedade reafirma aos produtores a importância da adoção de boas práticas de fabricação para evitar a contaminação e proliferação de microrganismos indesejáveis ao longo do processo.

ANEXO I

**CACHAÇA SOLD IN POLYETHYLENE TEREPHTHALATE PACKAGING:
DETERMINATION OF THE PHYSICAL-CHEMICAL PROFILE, POLYCYCLIC
AROMATIC HYDROCARBONS AND ETHYL CARBAMATE**

Artigo produzido para a disciplina de Pesquisa Orientada

DOI: 10.1590/1413-7054202347007522

Cachaça sold in polyethylene terephthalate packaging: Determination of the physical-chemical profile, polycyclic aromatic hydrocarbons and ethyl carbamate

Cachaça comercializada em embalagem de polietileno tereftalato: Determinação do perfil físico-químico, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e carbamato de etila

Richard Bispo Barbosa¹, Gabriela Fontes Alvarenga², Vanuzia Rodrigues Fernandes Ferreira¹, Wilder Douglas Santiago¹, David Lee Nelson³, Maria das Graças Cardoso^{1*}

¹Universidade Federal de Lavras/UFLA, Departamento de Química/DQI, Lavras, MG, Brasil

²Universidade Federal de Lavras/UFLA, Departamento de Ciências dos Alimentos/DCA, Lavras, MG, Brasil

³Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri/UFVJM, Diamantina, MG, Brasil

*Corresponding author: mcardoso@ufla.br

Received in July 14, 2022 and approved in January 23, 2023

ABSTRACT

The production of cachaça in Brazil is a historical and cultural practice that has been gaining ground in the commercial sector with the marketing of its product with new labels, derivatives and different types of packaging for the beverage. Polyethylene Terephthalate (PET) packaging has been used by some producers because of its lower cost and greater durability for transport. The influence of storage on 15 samples of commercial cachaça packed in polymeric packaging was investigated. The physical-chemical quality and the presence of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH's) in the beverages were evaluated. Of these samples, 60% contained concentrations of components that were outside the limits of the Quality Standards established by Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA), and most of the samples contained low alcohol concentrations. The samples showed concentrations of ethyl carbamate below the limit established by MAPA (210 µg L⁻¹). All samples studied contained concentrations of PAHs higher than those found in the literature for cachaça stored in other types of packages. Contamination by PAHs can be associated with the thermal processes involved in the production of packages. Sample R12 contained the highest total concentration of the PAHs (20,90 µg L⁻¹), followed by samples R7 (17,23 µg L⁻¹) and R8 (17,61 µg L⁻¹). The mean concentration was 10,91 µg L⁻¹. Fluorene was the PAH found in the largest quantity with a concentration of 18,61 µg L⁻¹ in the R12 sample. Therefore, cachaças stored in PET packaging are unsuitable for consumption and commercialization, as they present high concentrations of contaminants.

Index terms: Beverage; contaminants; PET.

RESUMO

A produção de cachaça no Brasil é uma prática histórica e cultural que vem ganhando espaço no setor comercial com a comercialização de seu produto com novos rótulos, derivados e diferentes tipos de embalagens para a bebida. As embalagens de Polietileno Tereftalato (PET) têm sido utilizadas por alguns produtores devido ao seu menor custo e maior durabilidade para o transporte. A influência do armazenamento em 15 amostras de cachaça comercial acondicionada em embalagens poliméricas foi investigada. A qualidade físico-química e a presença de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA's) nas bebidas foram avaliadas. Destas amostras, 60% continham concentrações de componentes que estavam fora dos limites dos Padrões de Qualidade estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), e a maioria das amostras continha baixas concentrações de álcool. As amostras apresentaram concentrações de carbamato de etila abaixo do limite estabelecido pelo MAPA (210 µg L⁻¹). Todas as amostras estudadas continham concentrações de HPA's superiores às encontradas na literatura para cachaça armazenada em outros tipos de embalagens. A contaminação por HPA's pode estar associada aos processos térmicos envolvidos na produção das embalagens. A amostra R12 continha a maior concentração total de HPA's (20,90 µg L⁻¹), seguida pelas amostras R7 (17,23 µg L⁻¹) and R8 (17,61 µg L⁻¹). A concentração média foi de 10,91 µg L⁻¹. O fluoreno foi o HPA encontrado em maior quantidade com concentração de 18,61 µg L⁻¹ na amostra R12. Portanto, as cachaças armazenadas em embalagens PET são impróprias para consumo e comercialização, pois apresentam altas concentrações de contaminantes.

Termos para indexação: Bebida; contaminantes; PET.

INTRODUCTION

Cachaça is a cultural symbol of Brazil; it has been produced since the colonization period. It was discovered when the slaves who work in the sugar cane mills realized that the leftover sugarcane juice fermented and gave rise to a different beverage. The news quickly reached the sugar mill owners, who improved the techniques for distilling the beverage, giving rise to cachaça. The popularization of the beverage in the country was so great that Portugal banned its production in 1659 because of competition with Portuguese wine. The ban lasted a short time and led to the Cachaça Revolt, which ended the ban by the crown in 1661 (Cardoso, 2020).

According to the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA), distilled sugarcane spirits is defined as the beverage produced by distilling sugarcane must. Cachaça is considered to be the Cane Spirit produced in Brazil, with an alcoholic strength of 38% v/v to 48% v/v at 20 °C, obtained by the distillation of the fermented sugarcane juice with peculiar sensory characteristics, to which up to 6 g L⁻¹ of sugar can be added (Brasil, 2005a).

The beverage has been commercialized in different ways using new types of packaging, labels, and lids. These changes are employed to increase the sales, as well as to reduce packaging costs. The use of glass bottles is the most traditional manner of marketing the beverage; however, the use of polymeric packaging has been an alternative because of its lower cost and durability during storage and transport. The polymeric packaging used is made of polyethylene terephthalate (PET) (Ethylene Poly terephthalate), which has greater resistance to physical shocks, and different models and sizes exist on the market. Storage, physical changes and beverage packaging have been the subject of research in different areas, such as the presence of different compounds that are considered contaminants and can be associated with migration from the plastic packaging to the beverage (Souza et al., 2022).

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) formed from the degradation of organic molecules in thermal treatments are contaminants found in soil, plants, water and air. The control of the amount of these compounds is a topic of discussion in several countries because of their toxic and carcinogenic character. In thermal processes, radicals are formed from the degradation of organic structures. These radicals can react with one another to form cyclic structures that have high stability. These substances can definitively bind to DNA when in contact with the body and cause changes in cells (Lemmens et al., 2020; Singh; Agarwal, 2018). During the production of polymeric packaging, thermal processes are used to prepare the raw material and to mold the shape

of the packaging. These processes can be associated with the formation of PAHs and, consequently, the contamination of the stored beverage (Allassali et al., 2020).

This study sought to elucidate possible ways in which cachaça stored and marketed in PET packaging can be contaminated by PAHs. The discovery of contamination sources and their traceability is an important factor for ensuring that the product reaches the consumer in a safe manner and avoids exposure to unhealthy compounds.

MATERIAL AND METHODS

Cachaça samples

The samples of cachaça sold in 500 mL PET containers were acquired in the local commerce and distribution units in the Southeast region of Brazil. Two 500 mL containers were used for the analysis of each sample. Fifteen samples were obtained from different production units with different production methods (column and alembic), and they were coded from R1 to R15. The R1, R2, R14 and R15 samples were produced using the method of distillation through stainless steel columns. The remaining samples were produced by the method of distillation in copper alembics. These samples were sent to the Laboratory of Quality Analysis of Spirits of the Department of Chemistry (DQI) of the Federal University of Lavras (UFLA) in the state of Minas Gerais. All of the analyses were performed in triplicate, and the results are expressed as means ± standard deviation.

Physicochemical analysis of cachaça

The physicochemical analyses were performed according to the methods established by MAPA (Brasil, 2005b), wherein the dry extract, volatile acidity, alcohol concentration, aldehydes, esters, furfural, higher alcohols and copper were quantified in samples of cachaça. Analyses were performed with the beverage before and after the adsorption test.

Analysis of higher alcohols

The identification and quantification of higher alcohols was performed according to the method of Vilela et al. (2007) with some modifications. Analysis was performed by gas chromatography (Perkin Elmer, Clarus 580) using a flame ionization detector (FID) under the following experimental conditions: DB-WAX column (30 m x 0.25 mm id, film thickness, 0.25 µm); N₂ (White Martins, Rio de Janeiro, Brazil) was the carrier gas at a flow rate of 1.4 mL min⁻¹; injector temperature: 150 °C; detector temperature:

170 °C; volume of sample injected: 1.0 µL diluted; 1:10 split ratio. The temperature program started at 35 °C for four minutes, increased to 80 °C at a rate of 10 °C min⁻¹, held for 1 minute and then increased to 120 °C at a rate of 20 °C min⁻¹, where it was held for 1 minute. The temperature was then raised to 140 °C at a rate of 25 °C min⁻¹ and held for 30 seconds. The total run time was 13.48 min.

HPLC or chromatographic grade standards (butan-2-ol, propan-1-ol, 2-methylpropan-1-ol, butan-1-ol and 3-methylbutan-1-ol (Merck, Darmstadt, Germany) were used. The analytical curve (concentration range) was prepared from a solution with a concentration of 4 g L⁻¹ in 40% ethanol. The samples were distilled via a simple distillation process and analyzed.

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)

The PAHs were identified and quantified by HPLC in a Shimadzu high efficiency liquid chromatograph equipped with two model LC-6AD high pressure pumps, a model DGU-20A3 degasser, a model CBM-20A interface and a model SIL-10AF automatic injector with sampler. The diode array detector (DAD) was used according to the method standardized by Souza et al. (2022).

The quantification of the PAHs was accomplished using an analytical curve previously constructed with the standards at concentrations that varied from 10 to 500 µg L⁻¹. For separations, an Agilent HX891706 column (4.6 x 250 mm, 5 µm) connected to an Agilent HX891706 guard column (4.6 x 12.5 mm, 5 µm) was used. Solvents for the mobile phase were water (Solvent A) and acetonitrile (Solvent B). Samples were eluted according to a gradient from 0 to 3 min (50%); 3 to 10 min (50 to 100%); 10 to 35 min (100%); 35 to 40 min (100 to 50%). The wavelength used was 254 nm, the flow rate was 0.8 mL min⁻¹, and the injected volume was 20 µL.

A stock solution with a concentration of 1000 µg L⁻¹ was prepared containing the analytically pure PAH standards (Merck and Sigma-Aldrich) naphthalene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo(a) anthracene, acephenanthylene and benzo(a) pyrene. Dilutions varying from 10 to 500 µg L⁻¹ were made in ethyl acetate for the construction of the analytical curve.

The sample was extracted by the Solid Phase Extraction (SPE) technique using an Agilent Sampli Q12 collector Manifold, in which samples were passed through 500 mg/6 mL cartridges (ODS-5 Octadecyl; 18% EC - Whatman). Each cartridge was activated with 5.0 mL of dichloromethane, 5.0 mL of methanol and 5.0 mL of Milli-Q water. After conditioning, aliquots of a solution containing

50.0 mL of the sample and 10 mL of acetonitrile were passed through the cartridge. Ethyl acetate was used to elute the analytes. The extract was concentrated on a Buchi R-14 rotavapor at 50 °C, and the final volume was completed to 1.0 mL with ethyl acetate (Machado et al., 2014).

Ethyl carbamate

Ethyl carbamate was quantified by HPLC according to the method proposed by Anjos et al. (2011) using the previously described chromatograph equipped with a model RF-10AXL fluorescence detector (DFL) and an Agilent-Zorbax Eclipse a.a.A column (4.6 x 150 mm, 5 µm) connected to an Agilent-Zorbax Eclipse a.a.A pre-column (4.6 x 12.5 mm, 5 µm). External standardization was used to quantify the contaminant. A stock solution of 10.0 mg L⁻¹ was prepared from ethyl N-xanthyl carbamate (CNXE) in ethyl acetate. In the construction of the analytical curve, eight points in the range of 15.0 - 210.0 µg L⁻¹ were used. The excitation and emission wavelengths employed were 233 and 600 nm, respectively. The samples were derivatized by adding 4 mL of cachaça sample to an amber flask, followed by the addition of 0.8 mL of a propanol solution of 0.02 mol L⁻¹ 9-xanthidrol. After gentle stirring, 0.4 mL of 1.5 mol L⁻¹ hydrochloric acid was added, and the mixture was stirred for one minute. The reaction mixture was kept at rest for 60 minutes and filtered through a 0.45 µm polyethylene membrane (Millipore).

Furfural and hydroxymethylfurfural

The quantification of furfural and hydroxymethylfurfural was performed by HPLC using a diode array detector (DAD) according to the method of Rodrigues et al. (2020), with minor modifications. The determination of furfural and hydroxymethylfurfural was achieved using an analytical curve previously constructed with the respective standards at concentrations that varied from 0.1 to 25 mg L⁻¹.

The separation was achieved on an Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 column (4.6 x 250 mm, 5 µm) connected to an Agilent-Zorbax Eclipse XDBC18 (4.6 x 12.5 mm, 5 µm) pre-column. A diode array detector was employed. The mobile phase was composed of 2% acetic acid in water (Solvent A) and methanol: water: acetic acid (70:28:2% w/w/v) (Solvent B). The gradient varied from 0 to 25 min (0-40% B); 25 to 40 min (40 to 55% B); 40 to 43 min (55-60% B); 43 to 50 min (60-100%); 50 to 55 min (100-0% B); 55 to 60 min (0% B). The wavelength employed was 280 nm, the flow rate was 0.8 mL min⁻¹, and the volume injected was 20 µL. Samples and standards were filtered through a 0.45 µm polyethylene membrane (Millipore) and injected directly into the chromatographic system.

Injections were performed in triplicate. The limits of detection (LD) and quantification (LQ) of the chromatographic analyses were calculated according to Ribani et al. (2004) using the parameters obtained from the analytical curves.

RESULTS AND DISCUSSION

The results for the quantification of methanol and higher alcohols in the cachaça samples sold in PET packaging are described in Table 1. The only sample that contained methanol concentrations greater than the detection limit was the R3 sample (6.70 mg 100 mL⁻¹ a.a.); however, the concentration was within the legal limit. Methanol is considered to be an undesirable contaminant in the beverage because of its toxicity (Cardoso, 2020). It can be formed by the degradation of pectin present in the cellular structure of sugarcane through the boiling of plant material during the distillation process. Its formation can be avoided through proper filtration of the sugarcane juice and must before distillation.

Butan-1-ol and butan-2-ol are considered to be contaminants, and their legal limits are 3.0 and 10 mg 100 mL⁻¹ a.a., respectively. All the samples contained

concentrations of butan-1-ol below the legal limit; however, samples R3 (24.48 mg 100 mL⁻¹ a.a.) and R5 (19.53 mg 100 mL⁻¹ a.a.) contained concentrations of butan-2-ol superior to that established by the legislation. High levels of these two alcohols can be associated with contamination of sugarcane or must by butyl bacteria, and this contamination occurs as a result of inadequate cleaning of equipment or the transportation (dragging) and storage of sugarcane in direct contact with the soil (Cardoso, 2020).

The sum of the concentrations of higher alcohols was within the established limits. Sample R3 contained the lowest concentration of higher alcohols (72.83 mg 100 mL⁻¹ a.a.). Despite being a result within legal limits, higher alcohols are desirable in the beverage. They contribute to the formation of the "flavour" of the beverage. Low levels of higher alcohols can be associated with the fermentation process; the type of yeast or stress to which the yeast is submitted during the process can lead to a smaller yield of secondary compounds (Bortoletto; Silvello; Alcarde, 2018).

The results of the physicochemical analyses can be seen in Table 2. Of the 15 samples under study, only five were within the legal limits for the ethanol concentration.

Table 1: Results for concentrations of methanol and higher alcohols in cachaça samples.

	Methanol mg 100 mL ⁻¹ a.a.	Butan-1-ol mg 100 mL ⁻¹ a.a.	Butan-2-ol mg 100 mL ⁻¹ a.a.	Propan-1-ol mg 100 mL ⁻¹ a.a.	2-Methyl-propanol mg 100 mL ⁻¹ a.a.	3-Methyl-butan-1-ol mg 100 mL ⁻¹ a.a.	Sum of higher alcohols mg 100 mL ⁻¹ a.a.
R1	<LD	0.61 ± 0.07 ^a	<LD	53.28 ± 0.34 ^d	68.45 ± 0.22 ^b	154.21 ± 0.70 ^b	275.93 ± 1.26 ^c
R2	<LD	0.36 ± 0.02 ^a	<LD	56.06 ± 0.18 ^c	64.95 ± 0.99 ^c	167.06 ± 0.65 ^b	288.07 ± 1.81 ^b
R3	6.70 ± 0.25 ^a	0.05 ± 0.01 ^a	24.48 ± 0.50^a	44.11 ± 0.72 ^a	19.57 ± 0.16 ^d	9.16 ± 0.35 ^d	72.83 ± 0.90 ^a
R4	<LD	0.85 ± 0.01 ^a	<LD	44.44 ± 0.13 ^a	53.20 ± 0.22 ^f	159.72 ± 1.00 ^b	257.36 ± 1.35 ^f
R5	<LD	0.38 ± 0.05 ^a	19.53 ± 0.23^b	98.61 ± 0.10 ^a	53.35 ± 0.47 ^f	116.21 ± 0.57 ^d	268.17 ± 0.94 ^d
R6	<LD	0.64 ± 0.06 ^d	<LD	33.18 ± 0.02 ⁱ	68.45 ± 0.22 ⁱ	93.62 ± 0.84 ^a	152.68 ± 0.88 ^g
R7	<LD	0.53 ± 0.24 ^a	2.55 ± 0.05 ^a	42.11 ± 0.07 ^f	64.95 ± 0.99 ^b	58.83 ± 0.44 ^f	137.99 ± 0.56 ^h
R8	<LD	0.11 ± 0.18 ^f	<LD	68.69 ± 0.63 ^b	19.57 ± 0.16 ^f	143.63 ± 0.49 ^c	264.37 ± 0.22 ^a
R9	<LD	0.70 ± 0.01 ^b	8.82 ± 0.15 ^c	44.16 ± 1.16 ^a	53.20 ± 0.22 ^a	198.28 ± 0.02 ^a	321.86 ± 0.13 ^a
R10	<LD	0.86 ± 0.01 ^a	<LD	54.13 ± 0.25 ^d	53.35 ± 0.47 ^b	123.88 ± 0.90 ^d	215.05 ± 1.51 ^b
R11	<LD	0.07 ± 0.01 ^a	2.40 ± 0.17 ^a	39.83 ± 0.68 ^a	25.88 ± 0.06 ^b	54.69 ± 0.42 ^a	130.33 ± 0.45 ^a
R12	<LD	0.09 ± 0.01 ^a	3.34 ± 0.01 ^d	44.37 ± 0.11 ^a	37.05 ± 0.19 ^a	59.03 ± 0.02 ^a	140.51 ± 0.13 ^b
R13	<LD	0.43 ± 0.02 ^a	<LD	36.76 ± 0.85 ^b	52.06 ± 0.07 ^a	154.39 ± 0.01 ^b	247.27 ± 1.23 ^a
R14	<LD	0.32 ± 0.02 ^a	<LD	41.92 ± 0.65 ^f	79.43 ± 1.05 ^d	93.56 ± 0.29 ^a	178.96 ± 1.61 ^f
R15	<LD	0.56 ± 0.02 ^d	<LD	54.64 ± 0.14 ^d	37.05 ± 0.36 ^d	155.42 ± 1.65 ^b	269.36 ± 1.31 ^d
Legislation	20.00	3.00	10.00	-	-	-	360.00

<LD: lower than limit of detection; LD for methanol: 1.48 mg 100 mL⁻¹ a.a.; LD for butan-2-ol: 0.19 mg 100 mL⁻¹ a.a. Means followed by the same letter in the columns are not significantly different by the Scott-Knott test ($\alpha = 5\%$); Values in bold are higher than the legal limit.

Table 2: Results of the physicochemical analysis and quantification of ethyl carbamate in the cachaça samples stored in PET and glass containers.

	Ethanol conc. % v/v ethanol at 20 °C	Aldehydes mg 100 mL ⁻¹ a.a.	Furfural mg 100 mL ⁻¹ a.a.	Volatile acidity mg 100 mL ⁻¹ a.a.	Copper mg L ⁻¹	Esters mg 100 mL ⁻¹ a.a.	Dry extract g L ⁻¹	Ethyl carbamate µg L ⁻¹
R1	39.23 ± 0.06 ^b	18.58 ± 0.03 ^d	<LD	22.34 ± 0.03 ^f	0.13 ± 0.01 ^k	21.85 ± 0.03 ^d	15.89 ± 0.05 ^b	57.20 ± 0.88 ^f
R2	39.44 ± 0.05 ^b	14.84 ± 0.30 ^f	<LD	29.63 ± 0.03 ^d	0.31 ± 0.01 ^f	21.73 ± 0.02 ^d	0.88 ± 0.01 ^k	77.80 ± 0.24 ^a
R3	35.52 ± 0.04^a	6.69 ± 0.16 ^a	<LD	18.51 ± 2.08 ^k	0.19 ± 0.01 ^k	18.10 ± 1.23 ^a	0.10 ± 0.01 ^b	18.31 ± 0.10 ^d
R4	38.53 ± 0.05 ^d	10.89 ± 0.01 ^l	<LD	26.54 ± 0.03 ^a	0.80 ± 0.02 ^a	26.70 ± 0.03 ^f	0.04 ± 0.01 ^b	8.31 ± 0.40 ^l
R5	36.45 ± 0.02^a	26.82 ± 0.14 ^a	1.97 ± 0.05 ^b	262.55 ± 2.11^a	4.03 ± 0.01 ^a	119.93 ± 0.05 ^a	1.17 ± 0.01 ^k	<LD
R6	38.30 ± 0.05 ^d	13.84 ± 0.02 ^h	1.77 ± 0.10 ^c	70.57 ± 2.00 ^b	2.90 ± 0.04 ^b	45.87 ± 1.06 ^b	2.26 ± 0.01 ^f	<LD
R7	25.73 ± 0.03^j	17.17 ± 0.02 ^a	5.08 ± 0.07^a	45.42 ± 0.05 ^c	1.07 ± 0.01 ^d	29.98 ± 0.03 ^f	3.57 ± 0.01 ^d	37.24 ± 0.13 ^f
R8	27.88 ± 0.13^j	11.88 ± 0.06 ^l	<LD	68.12 ± 0.32 ^b	0.31 ± 0.01 ^f	29.20 ± 1.40 ^c	0.07 ± 0.01 ^b	<LQ
R9	32.01 ± 0.12^j	22.43 ± 0.26 ^b	<LD	70.75 ± 2.55 ^b	2.26 ± 0.15 ^c	33.47 ± 1.46 ^c	0.02 ± 0.01 ^b	51.57 ± 1.46 ^d
R10	31.99 ± 0.01^j	11.05 ± 0.01 ^l	<LD	27.40 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.02 ^b	26.79 ± 0.01 ^c	0.07 ± 0.02 ^b	11.59 ± 0.53 ^l
R11	27.64 ± 0.11^j	14.38 ± 0.06 ^k	<LD	31.71 ± 0.13 ^a	1.00 ± 0.01 ^d	29.45 ± 1.43 ^c	0.08 ± 0.01 ^b	37.43 ± 0.13 ^f
R12	29.24 ± 0.04^j	13.60 ± 0.02 ^h	<LD	24.98 ± 0.03 ^a	1.11 ± 0.07 ^d	30.77 ± 1.42 ^c	2.62 ± 0.01 ^a	47.53 ± 0.20 ^a
R13	40.00 ± 0.21 ^a	14.36 ± 0.08 ^k	<LD	27.40 ± 1.97 ^a	0.39 ± 0.01 ^f	27.85 ± 0.15 ^c	28.68 ± 0.09 ^a	13.2 ± 0.30 ^h
R14	31.07 ± 0.04^j	7.11 ± 0.01 ^k	<LD	23.51 ± 0.03 ^f	0.13 ± 0.01 ^k	30.34 ± 2.71 ^c	0.14 ± 0.01 ^b	6.73 ± 0.60 ^h
R15	38.94 ± 0.02 ^c	21.27 ± 0.27 ^c	0.61 ± 0.01 ^d	23.51 ± 0.03 ^a	0.18 ± 0.02 ^k	24.21 ± 2.21 ^d	14.76 ± 0.38 ^f	61.44 ± 0.22 ^b
Legislation	38-48	30,00	5,00	150,00	5,00	200,00	-	210,00

ND: Not detected. <LD: lower than limit of detection; LD for ethyl carbamate: 1.71 µg L⁻¹; LQ for ethyl carbamate: 5.69 µg L⁻¹; LD for furfural: 0.017 mg 100 mL⁻¹ a.a.; Means followed by the same letter in the columns are not significantly different by the Scott-Knott test (α = 5%); Values in bold are higher than the legal limit.

Low values for the alcohol concentration can be associated with different factors, such as failure during the production process, incorrect cutting of fractions, storage, among others. The dilution of beverages to an alcoholic strength inferior to the legal limit is an illegal practice. It increases the yield of the product and reduces the cost of the final product. However, the product delivered to the consumer is of a low quality that does not match the label on the beverage (Bortoletto; Silvello; Alcarde, 2018).

Samples R7, R8 and R11 had the lowest ethanol concentrations observed in this study, and these values were about 10 - 12% below the concentration required by the legislation. Despite the possible losses during the production process and storage of the beverage, the values are much lower than others reported in the literature.

Santiago, Cardoso and Nelson (2017) determined the concentrations of higher alcohols, phenolic compounds, color intensity and dry extract in cachaça stored and aged in different types of wood and mentioned that the beverage can be stored in wooden barrels or stainless steel drums before commercialization. For the authors, the sealing of these containers and control of the temperature in the storage

room must be performed correctly to avoid the evaporation of volatile compounds.

During the aging and storage of beverages, a decrease in the alcohol concentration is common. It can be corrected with the use of a freshly distilled white cachaça or by adding a beverage with a higher alcohol content during aging to compensate for the loss during storage.

Packaging can influence the loss of volatile compounds during storage, and the type of sealing, material, exposure and transport conditions are extremely important variables in this process. However, Holanda et al. (2015) stored cachaça in glass and plastic containers for 120 days, and observed that there were no differences in the ethanol concentrations of cachaça stored in the PET or glass containers. These results do not corroborate those found in this work, where several variations occurred.

The aldehyde concentration in the beverage was within the legal limits for all the samples. Acetaldehyde is the principal compound in this class. It is formed during the fermentation of the beverage, where it is reduced to ethanol. Sample R5 had the highest concentration of this compound (26.82 mg 100 mL⁻¹ a.a.), whereas sample R14 contained the lowest concentration.

In large quantities, it is undesirable because it is associated with sensory damage, and it is responsible for the hangover after drinking the beverage (Cardoso, 2020).

Furfural and hydroxymethylfurfural are two aldehydes that are controlled separately and are considered to be undesirable contaminants in the beverage because of their toxicity. Its presence can be associated with different factors, including the burning of sugarcane before harvesting, aging of the beverage in charred barrels, or the distillation of the fermented must without the total consumption of sugar by the yeasts (Bortoletto; Silvello; Alcarde, 2018; Masson et al., 2007). Glucose and fructose undergo a dehydration reaction when exposed to thermal processes, a water molecule is eliminated, and furfural and hydroxymethylfurfural, respectively, are formed (Alcarde, 2017).

The volatile acidity in most of the samples was within the established limit of 150.0 mg 100 mL⁻¹ with the exception of sample R5, which contained a 262.55 mg 100 mL⁻¹. The volatile acidity arises during the fermentation process, and it contributes to the aroma and flavor of the beverage at low levels. To control the volatile acidity in cachaça, the still must be well sanitized, and the yeasts that ferment the must should be homogeneous so as to avoid contamination by bacteria during fermentation. In addition, other factors such as must management and control of time and temperature during fermentation are essential to prevent high levels of volatile acidity in the cachaça (Cardoso, 2020).

The concentrations of copper were within the legal limits. This metal is a contaminant in the beverage and comes from the distillation apparatus. It is found in beverages produced in copper stills. Sample R5 had the highest concentration of the contaminant, 4.03 mg L⁻¹. The copper from copper stills can result in the complexation of dimethyl sulfide (DMS). As a consequence, the removal of this sulfur compound improves the sensory quality of the beverage. In adequate concentrations and with adequate cleaning of the stills, copper can be an alternative that helps improve the final quality of the distillate (Bortoletto; Silvello; Alcarde, 2018).

Esters are compounds responsible for the composition of the "flavour" of the beverage. In ideal concentrations, they provide fruity and floral aromas that contribute to the sensory quality of the beverage (Cardoso, 2020). In the samples analyzed, all the concentrations found were within the established limits, and sample R5 contained the highest concentration (119.93 mg 100 mL⁻¹).

Esters can be associated with the fermentation and production process. Ribeiro et al. (2017) studied the influence of must treatment and the use of native and selected yeast. There was a difference in the total contents of these compounds in cachaças produced with different yeasts. The levels found were higher in the cachaça fermented with the native yeast, for which the concentrations ranged from 32.75 to 37.16 mg 100

mL⁻¹. These results that corroborate most of the samples in this work, with the exception of sample R5, which contained the highest concentration among the samples.

The results obtained for the concentrations of dry extract were low, ranging from 28.68 mg 100 mL⁻¹ for the R13 sample, 15.89 mg 100 mL⁻¹ for the R1 sample, to 14.76 mg 100 mL⁻¹ for R15. After production, the beverage can be sweetened by adding sugar, which in turn dissolves in the beverage and is detected in the dry extract analysis (Brasil, 2005a). Oliveira et al. (2020) studied cachaça produced in the state of Paraíba and found values of up to 6.21 g L⁻¹ of dry extract in the cachaça samples. The authors associated the high values of dry extract with the fact that the samples had been sweetened. The results found in this work corroborate those of the authors because the highest values for dry extract were found in the sweetened cachaça samples.

The ethyl carbamate concentrations of the samples analyzed in this work are within the legal limit (Table 2). The highest concentrations were found in samples distilled through stainless steel columns: R1 (57.20 µg L⁻¹), R2 (77.80 µg L⁻¹) and R15 (61.44 µg L⁻¹). The presence of these contaminants can be associated with the distillation system used in the production of the beverages. Rodrigues et al. (2020) studied organic contaminants in cachaça produced in copper stills and stainless steel columns and observed higher ethyl carbamate concentrations in beverages produced by the fractional distillation through stainless steel columns. Values ranging from <LQ to 245.31 µg L⁻¹ were found. Their results corroborate those found in this work, where the highest values found were those obtained with beverages distilled through a stainless steel column. Other factors can be associated with the presence of ethyl carbamate in other samples, such as those studied by Cravo et al. (2019). The authors studied the presence of cyanogenic glycosides in different sugarcane varieties and observed a correlation of the compound dhurrin, a cyanogenic glycoside, with the levels of ethyl carbamate found in the cachaça samples.

The results obtained in the identification and quantification of 10 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) can be seen in Table 3. All the samples contained PAHs, and the lowest concentrations (0.731 and 0.741 µg L⁻¹) were found in samples R4 and R13, respectively. Sample R12 had the highest concentration of all the PAHs (20.90 µg L⁻¹), followed by samples R7 (17.23 µg L⁻¹), R8 (17.61 µg L⁻¹) and R9 (17.02 µg L⁻¹). The mean value found for all the samples in this study was 10.91 µg L⁻¹.

PAHs with up to three rings were found in higher concentrations in all the samples, and anthracene was not detected in any sample. Acenaphylene was detected in all the samples. Fluorene was found in large concentrations in the samples with the highest levels of PAHs, R7 (15.98 µg L⁻¹) followed by R12 (18.61 µg L⁻¹).

Table 3: Concentration of PAHs ($\mu\text{g L}^{-1}$) in samples of cachaça sold in PET packaging.

	 Naphthalene	 Acenaphthylene	 Fluorene	 Phenanthrene	 Anthracene	 Fluoranthene	 Pyrene	 Benzo (a) anthracene	 Acenaphthylene	 Benzolopyrene	Sum of the PAHs
R1	0.26 ± 0.01 ^b	1.34 ± 0.01 ^b	<LQ	0.60 ± 0.01 ^c	<LD	<LQ	3.25 ± 0.02 ^c	0.86 ± 0.01 ^b	2.84 ± 0.06 ^c	<LD	9.15 ^b
R2	<LQ	7.51 ± 0.01 ^b	0.84 ± 0.01 ^c	1.56 ± 0.11 ^b	<LD	<LD	1.74 ± 0.02 ^c	0.67 ± 0.02 ^c	0.98 ± 0.01 ^b	<LD	13.31 ^a
R3	<LD	0.87 ± 0.01 ^b	3.09 ± 0.02 ^b	0.54 ± 0.01 ^d	<LD	<LD	<LQ	<LD	0.71 ± 0.01 ^c	<LD	5.21 ^a
R4	0.09 ± 0.01 ^b	<LD	<LQ	0.12 ± 0.01 ^c	<LD	<LQ	0.52 ± 0.01 ^c	<LD	<LQ	<LD	0.73 ^a
R5	<LD	5.39 ± 0.11 ^c	7.39 ± 0.04 ^c	<LD	<LD	<LQ	<LD	0.53 ± 0.02 ^d	0.97 ± 0.01 ^b	<LD	14.29 ^d
R6	<LD	7.70 ± 0.13^a	3.57 ± 0.05 ^a	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	1.47 ± 0.04 ^c	<LD	12.75 ^f
R7	<LD	<LD	15.98 ± 0.11 ^b	<LD	<LD	<LQ	<LQ	<LD	1.24 ± 0.03 ^f	<LD	17.23 ^a
R8	2.97 ± 0.05 ^b	1.12 ± 0.04 ^f	6.48 ± 0.05 ^d	<LQ	<LD	<LQ	0.37 ± 0.01 ^c	2.47 ± 0.03 ^a	2.21 ± 0.01 ^c	1.99 ± 0.04 ^e	17.61 ^b
R9	4.72 ± 0.04^a	2.35 ± 0.08 ^f	0.65 ± 0.02 ^c	0.49 ± 0.02 ^a	<LD	1.12 ± 0.03 ^b	0.87 ± 0.01 ^c	2.63 ± 0.01 ^a	2.49 ± 0.02 ^b	1.71 ± 0.02 ^b	17.02 ^a
R10	0.25 ± 0.02 ^f	0.57 ± 0.09 ^f	5.53 ± 0.06 ^a	1.78 ± 0.01^a	<LD	0.26 ± 0.01 ^c	<LD	<LD	1.07 ± 0.01 ^b	1.46 ± 0.01 ^c	10.91 ^b
R11	0.37 ± 0.01 ^c	0.29 ± 0.09 ^f	4.55 ± 0.03 ^f	<LD	<LD	<LQ	<LQ	<LD	0.43 ± 0.22 ^a	0.62 ± 0.01 ^a	6.20 ^a
R12	0.25 ± 0.01 ^c	<LD	18.61 ± 0.04^a	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	0.86 ± 0.01 ^c	1.17 ± 0.01 ^d	20.90 ^a
R13	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0.27 ± 0.02 ^f	<LD	0.47 ± 0.01 ^a	<LD	0.74 ^a
R14	0.68 ± 0.01 ^d	0.53 ± 0.02 ^f	3.11 ± 0.05 ^b	<LD	<LD	<LQ	<LQ	<LD	0.97 ± 0.01 ^b	<LD	5.28 ^b
R15	1.24 ± 0.02 ^c	<LQ	<LD	<LD	<LD	1.68 ± 0.04^a	3.01 ± 0.03^b	0.69 ± 0.02 ^c	0.43 ± 0.01 ^b	<LD	7.09 ^a
LD	0.06	0.08	0.19	0.11	0.16	0.07	0.08	0.13	0.09	0.17	-
LQ	0.21	0.27	0.62	0.36	0.54	0.24	0.27	0.45	0.29	0.57	-

<LD: lower than the limit of detection; <LQ: lower than the limit of quantification; ND: not detected. Means followed by the same letter in the columns are not significantly different by the Scott-Knott test ($\alpha = 5\%$). The highest values are in bold.

Research carried out by Wenzl and Zelinnova (2019) showed that PAHs of lower molar mass are the most common in food contamination; their formation occurs at lower temperatures, and they are more easily absorbed by the food matrix. These data corroborate those found in this work, where it was observed that the greatest contamination by compounds with up to three rings were found in the R12 sample, representing about 90% of the total concentration of the contaminants in the beverage.

Other studies on the quantification of PAHs in cachaça have obtained similar results, Silva et al. (2018) found contaminants in the 20 samples of alembic cachaça analyzed. Benzo(a)pyrene was present in 19 of the samples analyzed, a result that partially corroborates those of this work because the compound was detected in only five samples.

Galinaro, Cardoso and Franco (2007) and Riachi et al. (2014) studied cachaça produced with burnt and unburned sugarcane and observed a higher concentration of PAHs in cachaça produced with burnt sugarcane. The increase was associated with the thermal process that played a role in the degradation of organic molecules of residual agricultural pesticides, which is one of the pathways for formation of PAHs.

The quality of the raw material used for the production of cachaça can contribute to the presence of PAHs in the final drink. The inappropriate practice of burning sugarcane during harvesting can result in the formation of PAHs in sugarcane, contributing to the presence of these contaminants in products produced from this raw material (Singh et al., 2016). Tfouni and Toledo (2007) analyzed commercial sugars and found that the concentration of PAHs in the final product depended on the amount of burned sugarcane being processed, and PAHs were detected in 57% of the samples at concentrations ranging from not detected to $1.35 \mu\text{g kg}^{-1}$. Silva et al. (2011) measured PAHs in rapadura produced in different regions of Brazil, and the contents of the sum of PAHs in the samples ranged from 4.03 to $0.50 \mu\text{g kg}^{-1}$. The authors associated the presence of these contaminants with the burning of sugarcane used as the raw material.

The emergence of PAHs is associated with thermal combustion or pyrolysis processes by some authors. According to Purcaro, Moret and Conte (2016), the ideal temperature for formation of these compounds is between 500 and $750 \text{ }^\circ\text{C}$. The breakdown of organic compounds into unstable and small radicals occurs. These radicals recombine through successive reactions to form cyclic and structures stabilized through resonance of electron pairs. During the manufacturing process, PET packaging undergoes thermal processes in material synthesis and

polymer molding so that it obtains the desired shape. These processes can be associated with the formation of PAHs and other contaminants found in polymeric packaging for food purposes (Souza et al., 2022)

Machado et al. (2014) investigated the storage of cachaça in high-density polyethylene drums and glass containers. The beverage samples stored in glass bottles were contaminated only by PAHs of up to three rings, whereas high concentrations of PAHs with more than three rings were found in the samples stored in polyethylene drums. Among the compounds with high molar mass, fluoranthene and pyrene were the most frequently found, whereas benzo(a)anthracene, acphenanthylene and benzo(a)pyrene were almost not detected in the samples. The contamination of cachaça by PAHs from high-density polyethylene packaging can be associated with the production of the packaging at high temperatures, which can cause the formation of these compounds.

When he evaluated five brands of cachaça stored in PET packaging for different periods of time, Souza et al. (2022) observed that the types of packaging interfered in the concentration of these contaminants. Samples stored for a longer time in PET packaging contained higher concentrations of these contaminants in all the brands of cachaça analyzed. The highest total concentration of PAH's in the packages at the times analyzed was found in the Ap1_{6m} sample ($17.916 \mu\text{g L}^{-1}$), a result that corroborates those found in this work.

The toxic and carcinogenic effect of PAHs is associated with the number of condensed aromatic rings present in their structure. High molecular weight PAHs are more toxic and potential carcinogens. The carcinogenic effect of individual PAHs can be obtained from comparison with benzo(a)pyrene using a conversion factor called Toxicity Equivalence Factor (TEF). Based on the TEF, FAO/WHO concluded that 13 PAHs are clearly carcinogenic and genotoxic. Among the PAHs evaluated in this study, benzo(a)pyrene is considered carcinogenic to humans, naphthalene and benzo(a)anthracene are considered possibly carcinogenic to humans. These three PAHs deserve special attention and must have their concentrations and intake controlled (Silva et al., 2011; Codex Alimentarius Comition - CAC, 2005; World Health Organization - Who, 2005).

No limits are defined for the presence of PAHs in foods and beverages by Brazilian legislation. The only limitations found were for the levels of benzo(a)pyrene in specific products such as ice, water and olive oil, which range from 0.03 to $2.00 \mu\text{g Kg}^{-1}$; According to European regulation No. 835/2011, which determines the maximum levels of PAHs in some foods, the maximum levels must be safe and represent the lowest possible values (EC, 2011; Garcia et

al., 2014). The total sum of PAH's suggested by the German Society for Fat Science is $25 \mu\text{g L}^{-1}$ for smoked foods (Da Silva et al., 2021; Galinaro; Franco, 2009). In this work, no sample contained concentrations higher than those suggested by this legislation. However, the lack of specific legislation for cachaça can be a problem for controlling the content of these substances to ensure the safety and health of the consumer.

CONCLUSIONS

The storage of cachaça in PET packaging is an alternative to replacing glass packaging. However, 60% of the samples analyzed contained concentrations of contaminants outside the legal limits, and most samples had low concentrations of ethanol. All samples stored in polymeric packaging contained PAHs with concentrations higher than those found in the literature for cachaça stored in other types of packaging. This may be associated with the thermal processes involved in the production of these packages. Establishing limits for these compounds in legislation would be necessary to ensure product quality and consumer safety.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptual idea: Cardoso, M. G.; Barbosa, R. B.; Methodology design: Cardoso, M. G.; Barbosa, R. B.; Santiago, W. D.; Data collection: Barbosa, R. B.; Alvarenga, G. F.; Ferreira, V. R. F.; Data analysis and interpretation: Barbosa, R. B.; Cardoso, M. G.; Writing and editing: Barbosa, R. B.; Alvarenga, G. F.; Nelson, D. L.; Cardoso, M. G.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the scholarships and financial support and the Central of Analysis and Chemical Prospecting of the Federal University of Lavras for supplying the equipment for chromatographic analyzes. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) project CAG/APQ 02390/2018, the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) project 311183/2022-0 and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance code 001.

REFERENCES

- ALASSALI A. et al. The degree and source of plastic recycles contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons. *RSC Advances*, 10(73):44989-44996, 2020.
- ALCARDE, A. R. Cachaça: Ciência, tecnologia e arte. 2ed. São Paulo, Brasil: Blucher, 2017. 96p.
- ANJOS J. P. D. et al. Identification of ethyl carbamate during the aging of cachaça in an oak barrel (*Quercus* sp) and a glass vessel. *Química Nova*, 34(5):874-878, 2011.
- BORTOLETTO, A. M.; SILVELLO, G. C.; ALCARDE, A. R. Good manufacturing practices, hazard analysis and critical control point plan proposal for distilleries of cachaça. *Scientia Agricola*, 75(5):432-443, 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. Instrução normativa n.13, de 29 de junho de 2005. Diário Oficial da União, June 30, 2005. 2005a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Aprova o Manual Operacional de Bebidas e Vinagres. Instrução normativa n.24, de 08 de setembro de 2005. Diário Oficial da União, Setembro 30, 2005. 2005b.
- CARDOSO, M. G. Produção de aguardente de cana. 5 ed. Lavras: Editora UFLA, 2020. 445p.
- CODEXALIMENTARIUS COMITON - CAC. CX/FAC/05/37/4 - Action required as a result of changes in acceptable daily intake (ADI) status and other toxicological recommendations. The Hague, 2005. 6p.
- COMMISSION REGULATION (EU) N° 835/2011 of 19 August 2011. Official journal of the European Union, p. L 215/4 - L 215/8, 2011. Available in: <<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:215:0004:0008:En:PDF>> Access in: January 26, 2023.
- CRAVO, F. D. C. et al. Composition of cachaças produced from five varieties of sugarcane and the correlation of the presence of dhurrin in the cane with that of ethyl carbamate in the product. *American Journal of Plant Sciences*, 10(2):339-350, 2019.
- DA SILVA, M. E. A. et al. Determinação de HPAs em preparações comerciais com base em pimenta. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, 12(6):484-498, 2021.
- GALINARO, C. A.; CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W. Profiles of polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian sugar cane spirits: Discrimination between cachaças produced from nonburned and burned sugar cane crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:3141-3147, 2007.
- GALINARO, C. A.; FRANCO, D. W. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in cachaça, rum, whiskey and alcohol fuel. *Química Nova*, 32(6):1447-1451, 2009.

- GARCIA, L. P. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food: A review. *Pubvet*, 8(19):2292-2450, 2014.
- HOLANDA, V. B. et al. Análise sensorial e desenvolvimento de embalagem para aguardente de algaroba. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 10(4):6-11 2015.
- LEMMENS, A. K. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon formation chemistry in a plasma jet revealed by IR-UV action spectroscopy. *Nature Communications*, 11:269, 2020.
- MACHADO, A. M. D. R. et al. Contamination of cachaça by PAHs from storage containers. *Food Chemistry*, 146:65-70, 2014.
- MASSON, J. et al. Physicochemical and chromatographic parameters in sugar cane brandies from burnt and non-burnt cane. *Ciência e Agrotecnologia*, 31(6):1805-1810, 2007.
- OLIVEIRA, R. E. S. et al. Physicochemical parameters and volatile composition of cachaça produced in the state of Paraíba, Brazil. *Research, Society and Development*, 9(7):e504974409, 2020.
- PURCARO, G.; MORET, S.; CONTE, L. S. Polycyclic aromatic hydrocarbons. *Encyclopedia of Food and Health*, 406-418, 2016.
- RIACHI, L. G. et al. A review of ethyl carbamate and polycyclic aromatic hydrocarbon contamination risk in cachaça and other Brazilian sugarcane spirits. *Food Chemistry*, 149:159-169, 2014.
- RIBANI, M. et al. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. *Química Nova*, 27(5):771-780, 2004.
- RIBEIRO, M. L. D. et al. Physico-chemical treatment of sugarcane juice produces quality cachaça. *Revista Ciência Agronômica*, 48(3):458-463, 2017.
- RODRIGUES, L. M. A. et al. Organic contaminants in distilled sugar cane spirits produced by column and copper alembic distillation. *Research, Society and Development*, 9(7):e930974879, 2020.
- SANTIAGO, W. D.; CARDOSO, M. D. G.; NELSON, D. L. Cachaça stored in casks newly constructed of oak (*Quercus* sp.), amburana (*Amburana cearensis*), jatoba (*Hymenaea caribouil*), balsam (*Myroxylon peruiferum*) and peroba (*Paratecoma peroba*): alcohol content, phenol composition, colour intensity and dry extract. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(2):232-241, 2017.
- SILVA, F. S. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in raw cane sugar (rapadura) in Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(3):346-350, 2011.
- SILVA, M. C. et al. Simultaneous extraction of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian cachaça using a modified QuEChERS method followed by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry quantification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67:399-405, 2018.
- SINGH, L. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons' formation and occurrence in processed food. *Food Chemistry*, 199:768-781, 2016.
- SINGH, L.; AGARWAL, T. Polycyclic aromatic hydrocarbons in diet: Concern for public health. *Trends in Food Science & Technology*, 79:160-170, 2018.
- SOUZA, R. H. Z. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in cachaças packed in bottles of polyethylene terephthalate. *Journal of Food Science*, 87(4):1906-1915, 2022.
- TFOUNI, S. A. V.; TOLEDO, M. C. F. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cane sugar. *Food Control*, 18(8):948-952, 2007.
- VILELA, F. J. et al. Determination of the physical-chemical composition of homemade cachaças produced in the South of Minas Gerais and their mixtures. *Ciência e Agrotecnologia*, 31(4):1089-1094, 2007.
- WENZL, T.; ZELINKOVA, Z. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and feed. *Encyclopedia of Food Chemistry*, 455-469, 2019.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. Rome, 2005. 47p.