



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

FRANCISCO TIBERYO FREIRES NEVES

SELEÇÃO DE LEVEDURAS NATIVAS DO BREJO PARAIBANO
PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA

CAMPINA GRANDE - PB
AGOSTO DE 2022

FRANCISCO TIBERYO FREIRES NEVES

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS NATIVAS DO BREJO PARAIBANO
PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias. Área de concentração: Agrobioenergia e agricultura familiar.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Gonçalves Neder

CAMPINA GRANDE – PB

AGOSTO DE 2022

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

N518s Neves, Francisco Tiberyo Freires.

Seleção de leveduras nativas do Brejo Paraibano para a produção de cachaça [manuscrito] / Francisco Tiberyo Freires Neves. - 2022.

38 p. : il. colorido.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2022.

"Orientação : Prof. Dr. Diogo Gonçalves Neder ,
Coordenação do Curso de Agroecologia - CCAA."

1. Microrganismos nativos. 2. Fermentação. 3. Bebida destilada. I. Título

21. ed. CDD 641.2

FRANCISCO TIBERYO FREIRES NEVES

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS NATIVAS DO BREJO PARAIBANO
PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias. Área de concentração: Agrobioenergia e agricultura familiar.

Aprovada em 08 de AGOSTO de 2022

Banca Examinadora



**Prof. Dr. Diogo Gonçalves Neder
(D.Sc., Genética e Melhoramento de plantas)UEPB**



**Prof. Dr. José Félix de Brito Neto
(D. Sc., Agronomia)UEPB**



**Dr. Isaias Vitorino Batista de Almeida
(D.Sc., Genética e Melhoramento de plantas) SEDAP-PB**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado e instruído com muita fé na conclusão desse trabalho.

A minha mãe, Maria de Lourdes (*in memorian*), por todo seu amor e incentivo na minha formação profissional e pessoal, exemplo de mulher.

A minha esposa Angélica e meus filhos, Carol e Theo, onde nos momentos difíceis não me deixaram desistir. Amo vocês!

A meu orientador, Dr Diogo Neder, pela paciência e amizade durante todo o trabalho.

A técnica do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Samara, por todo apoio no trabalho.

Aos colegas de turma, Cristiano, Bruno, Luana, Dayse, Edson, Igor, Ivanice, Alexandre e Ruth, amizades que levarei por toda a vida.

A UEPB/EMBRAPA ALGODÃO em especial ao PPGCA (Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias) por disponibilizar toda estrutura de laboratórios e profissionais para execução dos trabalhos.

A Dr. José Felix e Dr. Isaias Vitorino, pelo convite aceito para participação na banca.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos meios de culturas utilizados nos testes de seleção de leveduras, realizados no Complexo Agroindustrial, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Lagoa Seca, Paraíba, Brasil.....	24
Tabela 2. Isolamento do número de colônias em cada grupo, realizado no Complexo Agroindustrial, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Lagoa Seca, Paraíba, Brasil	28
Tabela 3. Cepas submetidas ao teste de produção de sulfeto de hidrogênio (H ₂ S), realizado no Complexo Agroindustrial, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Lagoa Seca, Paraíba, Brasil.....	29
Tabela 4. Visão geral da produção de sulfeto de hidrogênio (H ₂ S) pelas cepas testadas aos 7 dias após inoculação (D7) e aos 12 dias após inoculação (D12), no Complexo Agroindustrial, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Lagoa Seca, Paraíba, Brasil.....	29
Tabela 5. Crescimento de 14 cepas de leveduras em três concentrações de etanol (10%, 14% e 18%), no Complexo Agroindustrial, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Lagoa Seca, Paraíba, Brasil.....	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Teste de sulfeto de hidrogênio (H ₂ S) no Complexo Agroindustrial, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Lagoa Seca, Paraíba, Brasil.....	25
Figura 2. Teste de fermentação de glicose com tubos de Durham introduzidos em tubos de ensaio, no Complexo Agroindustrial, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Lagoa Seca, Paraíba, Brasil.....	26
Figura 3. Teste de tolerância a etanol no Complexo Agroindustrial, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Lagoa Seca, Paraíba, Brasil.....	27

RESUMO

NEVES, Francisco Tiberyo Freires. Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão; Agosto de 2022; Seleção de leveduras nativas do brejo paraibano para produção de cachaça. Orientador: Diogo Gonçalves Neder.

A cachaça possui importância econômica, social e cultural na microrregião do brejo paraibano. Para produção de cachaça, a fermentação corresponde ao mecanismo central do processo, sendo um fenômeno biológico realizado por leveduras. A seleção de cepas de leveduras é essencial para maximizar o rendimento alcoólico, para manter a qualidade sensorial da bebida produzida e quando se trata de microrganismos nativos, promove uma identidade regional ao produto. Sendo assim, objetivou-se selecionar leveduras nativas do brejo paraibano para produção de cachaça. O experimento foi conduzido no Complexo Agroindustrial, no Campus II da Universidade Estadual da Paraíba, Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Lagoa Seca, Paraíba, Brasil. Inicialmente a cana-de-açúcar foi coletada nos municípios de Areia-PB, Lagoa Seca-PB, Alagoa Nova-PB e Alagoa Grande-PB. Depois, as plantas foram cortadas e levadas para moagem na moenda do referido Complexo Agroindustrial. O caldo obtido foi mantido em frascos de vidro, a temperatura ambiente por 24 horas, visando obter o máximo de diversidade de leveduras nativas. Realizou-se a coleta de alíquota da solução e inoculação em uma placa de Petri. As colônias com morfologia típica de leveduras foram coletadas e transferidas para tubos de ensaios com meio de cultura para uso nos testes de seleção. Obteve-se 126 colônias puras, divididas em quatro grupos: A (32), B (42), C (38) e D (14). Realizou-se a seleção das cepas de levedura com base em quatro teste de exclusão: 1) Produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S); 2) Fermentação de glicose; 3) Tolerância a etanol; e 4) Crescimento a temperatura de $37^{\circ}C$. As cepas A11 e D8 foram promissoras, pois não produziram sulfeto de hidrogênio, foram tolerantes a fermentação de glicose e a concentração de etanol, por fim, atingiram crescimento a uma temperatura de $37^{\circ}C$, sendo recomendadas em futuras pesquisas para produção de cachaça no brejo paraibano.

Palavras-chave: Microrganismos nativos; fermentação; bebida destilada.

ABSTRACT

NEVES, Francisco Tiberyo Freires. State University of Paraíba/Embrapa Cotton; August 2022; Selection of native yeasts from the Brejo Paraibano for cachaça production. Advisor: Diogo Gonçalves Neder.

Cachaça has economic, social and cultural importance in the micro-region of the Brejo Paraibano. For cachaça production, fermentation corresponds to the central mechanism of the process, being a biological phenomenon carried out by yeasts. The selection of yeast strains is essential to maximize the alcohol yield, to maintain the sensory quality of the beverage produced and when it comes to native microorganisms, it promotes a regional identity to the product. Therefore, the objective was to select native yeasts from the Brejo Paraibano for cachaça production. The experiment was carried out at the Agroindustrial Complex, on Campus II of the State University of Paraíba, Laboratory of Food Microbiology, Lagoa Seca, Paraíba, Brazil. Initially, sugarcane was collected in the municipalities of Areia-PB, Lagoa Seca-PB, Alagoa Nova-PB and Alagoa Grande-PB. Afterwards, the plants were cut and taken to the mill at the aforementioned Agroindustrial Complex to be milled. The broth obtained was kept in glass flasks at room temperature for 24 hours, in order to obtain the maximum diversity of native yeasts. An aliquot of the solution was collected and inoculated into a Petri dish. Colonies with typical yeast morphology were collected and transferred to test tubes with culture medium for use in selection tests. 126 pure colonies were obtained, divided into four groups: A (32), B (42), C (38) and D (14). Yeast strains were selected based on four exclusion tests: 1) Production of hydrogen sulfide (H₂S); 2) Fermentation of glucose; 3) Ethanol tolerance; and 4) Growth at 37°C. Strains A11 and D8 were promising, as they did not produce hydrogen sulfide, were tolerant to glucose fermentation and ethanol concentration, finally, reached growth at a temperature of 37°C, being recommended in future research for cachaça production in the Brejo Paraibano.

Keywords: Native microorganisms; fermentation; distilled beverage.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	09
2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	11
2.1 A cana de açúcar.....	11
2.2 A Cachaça.....	13
2.3 Fabricação da cachaça.....	15
2.4 Perfil de qualidade da cachaça.....	16
2.5 Leveduras e a produção de cachaça.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5 CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

A cachaça possui importância econômica, social e cultural para o Brasil (LIZ et al., 2016). É considerada uma bebida tipicamente brasileira, sendo umas das mais produzidas no país e a segunda consumida no território nacional, ficando atrás apenas da cerveja (IBRAC, 2022). Essa bebida passou a ser considerada um produto de qualidade, comparada aos mais nobres destilados do mundo, como uísque e vodca (ALCARDE, 2014), atingindo diversos tipos de consumidores, com destaque para o mercado internacional, sendo exportada para diversos países (STECH; PANDOLFI 2019).

Conforme a Instrução Normativa nº 13 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) denomina-se cachaça como “bebida típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, apresentando características sensoriais peculiares e teor alcoólico variando de 38% a 48%, podendo ser adicionada açúcares até 6g/l, expressos em sacarose” (BRASIL, 2005).

A matéria prima para produção de cachaça é a cana-de-açúcar, cultura de grande importância social e econômica. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, sendo responsável por uma produção de 585.179,4 mil toneladas e produtividade de 70.357 kg/ha⁻¹ na safra 2021/22 em uma área de 8.317,3 mil hectares. O Sudeste é a principal região produtora do país, tendo os estados de São Paulo e Minas Gerais como principais, responsáveis por 61,9% da produção nacional. No Nordeste, os principais estados são: Alagoas, Pernambuco e Paraíba, com uma produção de 17.003,0; 11.827,4 e 6.242,1 mil toneladas, respectivamente. A Paraíba conta com uma produtividade média de 52.769 kg.ha⁻¹ em uma área de 118,3 mil hectares na safra 2020/21, o que representa aproximadamente 1% da área ocupada com a cultura no país (CONAB, 2022). De acordo com a Ibrac (2022), o Brasil produz anualmente cerca de 800 milhões de litros de cachaça, tendo como principais produtores São Paulo, Pernambuco, Ceará, Minas Gerais e Paraíba.

A cachaça é um dos subprodutos da cana-de-açúcar de maior destaque na Paraíba, especialmente na microrregião do Brejo Paraibano, no município de Areia, onde esse produto é a base da economia e está muito associada à tradição local, tendo o mesmo recebido o título de Capital Paraibana da Cachaça através da Lei nº 11.873, de 19 de abril de 2021 (BRASIL, 2021). Muitos dos produtores, visando a crescente tendência para exportação da cachaça, investem em tecnologia e buscam atender padrões internacionais de qualidade (ALCARDE, 2014). Com isso, é imprescindível a aplicação de práticas de padronização e aprimoramento da qualidade sensorial da bebida (FIGUEREDO, 2020).

Durante todo processo produtivo é de fundamental importância manter os padrões de qualidade, permitindo agregar valor às características sensoriais, atender as exigências estabelecidas pela legislação, como de estabelecer limites na concentração de compostos potencialmente danosos à saúde dos consumidores, promover maior eficiência de produção com menor custo e maior competitividade no mercado (TONINI; PACHECO, 2014). Para produção é necessário extrair o caldo da cana-de-açúcar na operação de moagem, convertê-lo em vinho pelo processo de fermentação e transformar o vinho em cachaça por meio da destilação (PATARO et al., 2002). A fermentação é realizada por microrganismos conhecidos por leveduras, com destaque para a espécie *Saccharomyces cerevisiae* (GONÇALVES et al., 2021). Para garantir a qualidade da cachaça é importante a utilização de matéria prima de qualidade e de cepas eficientes no processo (MAICAS, 2020).

A seleção de levedura para utilização durante o processo fermentativo tem sido objetivo de inúmeras pesquisas, visando uma elevada produtividade e alta qualidade da cachaça produzida (MAICAS, 2020). As cepas selecionadas de levedura devem apresentar tolerância às variações físico-químicas, rápido crescimento, boa eficiência na condução do processo fermentativo (STROPPA et al.; 2009) e capacidade de produção de compostos de importância sensorial necessários para melhorar a qualidade organoléptica das bebidas fermentadas (CORDERO-BUESO et al., 2013). Em geral, as cepas utilizadas são obtidas de indústrias do Sudeste do país e, portanto, adaptadas as condições ambientais dessa região (MOREIRA et al., 2015). É de fundamental importância a adaptação de cepas ao local de uso para o sucesso do processo fermentativo, pois o estresse causado pelas condições ambientais pode interferir no desempenho das mesmas (SILVA et al., 2011).

O uso de cepas selecionadas permite um início mais rápido do processo, menor risco de contaminação, fermentação uniforme, menor competição por nutrientes essenciais, maior rendimento, melhor qualidade química/sensorial e padronização da bebida produzida (DUARTE et al., 2013). Alguns estudos buscam compreender a diversidade e atributos específicos de cepas selecionadas associadas à fermentação durante a produção de cachaça, a fim de utilizar a que melhor caracterize a bebida (GUERRA et al., 2001; CAMPOS et al. 2010; BADOTTI et al.;2014; MARTINS et al., 2015; FIGUEREDO, 2020). Diante disso, objetivou-se com essa pesquisa selecionar leveduras nativas do brejo paraibano para produção de cachaça.

2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1 A cana de açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é oriunda da Oceania (Nova Guiné) e da Ásia (Índia e China) e, em seguida, se difundiu, sendo considerada uma das principais culturas cultivadas no mundo (MAGRO et al., 2011). No Brasil, essa cultura sempre foi um dos principais produtos agrícolas, sendo inicialmente implantada no litoral e, posteriormente, em áreas do interior (RODRIGUES; ROSS, 2020).

A chegada da cana-de-açúcar no Brasil fez parte do plano de "ocupação e desenvolvimento" das novas terras exploradas pelos portugueses (CRUZ et al., 2016). Na região Nordeste, encontrou características edafoclimáticas favoráveis e expandiu-se rapidamente sua produção nessa região, concentrando-se principalmente na Zona da Mata dos atuais estados de Pernambuco, Paraíba, Sergipe, Alagoas e Bahia, dando assim origem ao ciclo da cana-de-açúcar, sendo à base da economia do Nordeste brasileiro na época (SCHWARTZ, 1988).

Pertencente à família Poaceae, gênero *Saccharum*, subtribo Saccharinae, tribo Andropogoneae, a cana-de-açúcar se desenvolve em forma de touceira. A touceira é constituída por biomassa subterrânea e biomassa aérea. A biomassa subterrânea é formada por raízes do tipo adventícias e rizoma, constituídos por nós, internódios ou entrenós e gemas que são responsáveis pela formação dos perfilhos da touceira. A biomassa aérea é formada por colmos, que são segmentados em nós e entrenós, onde está localizada a inserção foliar, podendo os mesmos ser de porte eretos, semi-eretos e decumbentes, sendo a estrutura propagativa (colmo) utilizada para estabelecimento da lavoura. A biomassa aérea também é composta por folhas completas, compostas por bainha, colar e lâmina foliar, apresentando inserção alternada no colmo. A lâmina foliar é alongada e relativamente plana, possui inflorescência e frutos do tipo cariopse (MARAFON, 2012).

A propagação comercial da cana-de-açúcar é vegetativa, através de frações do colmo maduro, denominado tolete, contendo 3-4 gemas viáveis e capazes de formar uma nova planta. Os toletes devem ser provenientes de canaviais bem nutridos e com bom estado sanitário. Os constituintes do nó são: gema, o anel de crescimento, cicatriz foliar e a zona radicular. Os primórdios foliares e radiculares presentes ao longo da circunferência do nó do colmo originam a parte aérea e conjunto de raízes que oferecem sustentação física e suplementam a plântula com água e nutrientes (AUDE, 1993).

A cana-de-açúcar é uma planta de metabolismo C4, sendo este definido, segundo Taiz et al. (2017) como um mecanismo de concentração de CO₂ nas células do mesófilo, onde são

mobilizadas e transportadas na forma de uma molécula de quatro carbonos para descarboxilação nas células da bainha vascular. A fotossíntese C4 evoluiu como um dos principais mecanismos de concentração de carbono utilizados por plantas terrestres para compensar as limitações associadas a baixos níveis de CO₂ atmosférico. Algumas das culturas vegetais mais produtivas do mundo, a exemplo da cana-de-açúcar, usam esse mecanismo para aumentar a capacidade catalítica da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (rubisco).

Em meados de 1753, o botânico sueco Carl Von Linnaeus descreveu duas espécies de cana-de-açúcar, a *Saccharum officinarum* e a *Sacharum spicatum* que, atualmente, são classificadas como *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinensis*, *S. barberi* e *S. robustum*, pertencentes à família Poaceae (MARIN; NASSIF, 2013). As variedades comerciais de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil se originaram de cruzamentos entre essas espécies realizados no início do século XX. A *S. officinarum*, que é rica em açúcares, porém mais susceptível a doenças, e a *S. spontaneum*, que é pobre em açúcares, mas é o repositório de genes de resistência e a *S. robustum* que tem alto vigor, alto perfilhamento e alta capacidade de rebrota são utilizadas como base para o melhoramento genético das canas comerciais atuais. Os híbridos oriundos desses cruzamentos possuem capacidade de acumular altos níveis de sacarose no colmo, resistência a doenças, alto vigor e maior tolerância a fatores climáticos adversos (SCARPARI; BEAUCLAIR, 2008).

O cultivo de cana-de-açúcar é amplamente disseminado por todo o planeta com produção em todos os continentes. A importância da cana-de-açúcar para o cenário econômico mundial é devido a cultura possuir múltiplos usos, podendo ser destinada para produção de etanol, açúcar e como fonte energética (CONAB, 2022). Além disso, produtos derivados da cana-de-açúcar também são utilizados na alimentação humana (melaço, cachaça, doces, geleias, caldo e rapadura) e animal (silagem) (BELLÉ et al., 2014). O resíduo da fabricação do etanol (vinhaça) também pode ser utilizado na fertirrigação (SOUZA et al., 2015).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, sendo responsável por uma produção de 585.179,4 mil toneladas e produtividade de 70.357 kg/ha⁻¹ na safra 2021/22 em uma área de 8.317,3 mil hectares. Os estados de São Paulo e Minas Gerais são os principais produtores, responsáveis por 61,9% da produção nacional, com total de 298.494,8 e 63.947,7 mil toneladas, respectivamente, na safra 2021/22 (CONAB, 2022).

No Nordeste, os três principais estados produtores são Alagoas, Pernambuco e Paraíba, com uma produção de 19.199,9; 12.647,7 e 6.081,3 mil toneladas, respectivamente. A Paraíba conta com uma produtividade média de 51.875 kg/ha⁻¹, cultivadas em uma área de 117,2 mil hectares na safra 2020/21 (CONAB, 2022).

2.2 A cachaça

A cachaça foi descoberta em meados do século XVI pelos escravos que trabalhavam nos engenhos de açúcar naquela época, provavelmente através do processo de fermentação espontânea da espuma da caldeira, denominada “cagazza”, local que concentrava o caldo, visando à cristalização do açúcar, seguido da destilação do fermentado em pequenos alambiques de barro (PEREIRA et al., 2006). Atualmente, é considerada como uma “bebida típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, apresentando características sensoriais peculiares e teor alcoólico variando de 38% a 48%, podendo ser adicionada açúcares até 6g/l, expressos em sacarose” (BRASIL, 2005).

Após o processo de destilação, a cachaça pode ser consumida e preparada para comercialização, mas também pode ser envelhecida em tonéis de madeira para melhorar seu sabor. Cachaça envelhecida é a bebida que contém, no mínimo, 50% de aguardente de cana envelhecida, por período de no mínimo ano, podendo ainda, ser adicionado caramelo para a correção da cor, sendo esta etapa opcional (BRASIL, 2009).

Ao longo do tempo a cachaça vem ganhando cada vez mais espaço, atingindo camadas mais altas da população, com poder aquisitivo mais alto, sendo também exportada para outros países (TONINI; PACHECO, 2014). O perfil dos atuais consumidores deixou de vinculá-la à ideia de bebida desvalorizada e de baixa qualidade, sendo a mesma comparada a destilados nobres, como uísque e vodca (ALCARDE, 2014). Para isso, os produtores investiram pesado em controle de qualidade, visando obter um produto de alto padrão. As melhorias ocorream nas características físico-químicas da cachaça, tornando seu sabor mais agradável e suave e em *marketing*, para que as garrafas e rótulos ficassem mais sofisticados, visando valorizar a cachaça e atender um mercado consumidor mais exigente, sendo estas estratégias de aceitação tanto no mercado interno quanto no externo (ROQUE et al., 2021).

Em termos de consumo a cachaça é a terceira bebida destilada mais consumida no mundo. No Brasil, ocupa segunda posição de bebida alcoólica mais consumida, ficando atrás apenas da cerveja. Em relação a exportação, no ano de 2021, a cachaça foi exportada para 67 países, por mais de 50 empresas exportadoras, gerando receita de US\$ 13,17 milhões (7,22 milhões de litros), representando um crescimento de 38,39% em valor e de 29,52 em volume, em comparação a 2020. Os principais países de destino em valor foram: Estados Unidos, Alemanha, Paraguai e Portugal (IBRAC, 2022).

O Brasil produz anualmente em torno de 800 milhões de litros e o setor gera mais de 600 mil empregos diretos e indiretos. Os principais estados produtores de cachaça são: São Paulo, Pernambuco, Ceará, Minas Gerais e Paraíba (IBRAC, 2022). Segundo o Anuário da Cachaça (2021), elaborado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o total de produtores de cachaça registrados em 2020 foi de 955 produtores, um aumento de 2,4% quando comparado com o ano anterior, ficando em primeiro lugar o Sudeste (com 68,7% e 656 produtores), em segundo lugar o Nordeste (com 14,5% e 138 produtores), em terceiro lugar o Sul (com 12,4% e 118 produtores), em quarto o Centro-Oeste (com 3,7% e 35 produtores) e, por último, o Norte (com 0,8% e 8 produtores). A única região que apresentou decréscimo no número de produtores foi a Norte. Com isso, também se observou um aumento considerável no número de marcas de cachaça (18,5%).

A Paraíba aumentou em 21% o número de estabelecimentos produtores de cachaça registrados no Mapa, ocupando o 7º lugar no ranking nacional em 2019 com relação a número de registros de marcas de cachaça (ANUÁRIO DA CACHAÇA, 2021). O município de Areia, na Paraíba, se destacou no cenário nacional, tendo recebido o título de Capital Paraibana da Cachaça através da Lei nº 11.873, de 19 de abril de 2021 (BRASIL, 2021).

Atualmente, a produção de cachaça de qualidade está relacionada ao conhecimento, eficiência e rapidez nos processos de gestão. Além disso o uso de tecnologia e inovação, permitiu às empresas obter reduções de custo, melhorar a qualidade dos produtos e serviços oferecidos e um aumento de produtividade, gerando uma maior competitividade, sendo os resultados verificados nas pequenas, médias e grandes empresas do setor produtor (MARTINS et al., 2018).

O maior desafio que muitos produtores de cachaça enfrentam é encontrar novas formas de aumentar a qualidade do produto (FERREIRA et al., 2020) e ingressar no mercado global para aumentar as vendas de exportação (PAIVA et al., 2017). No geral, para maioria dos produtores, é necessário melhorar o processo produtivo como um todo, pois, apesar de toda a importância econômica e tradição atribuída à produção da cachaça, a cadeia produtiva ainda não é homogênea do ponto de vista tecnológico. Assim, há a necessidade de buscar novas tecnologias para melhorar e controlar a qualidade, bem como padronizar a bebida (SANTIAGO et al., 2020) A cachaça é muito apreciada por seu sabor e aroma característicos, que são formados durante a fermentação, destilação e envelhecimento, sendo esses os principais atributos que o consumidor considera ao fazer sua escolha (LIMA et al., 2021).

2.3 Fabricação da cachaça

Para fabricação da cachaça, inicialmente é necessário realizar a colheita da cana-de-açúcar, matéria prima para esse produto. É necessária a escolha de variedades com bons perfis de qualidade ainda no plantio, pois a mesma deve atingir o teor máximo de sacarose na época de corte, contribuindo para a qualidade do produto final (FIGUEREIDO, 2020). A cana-de-açúcar deve estar perfeitamente madura, ter sido colhida recentemente e não apresentar sinais de deterioração (LIMA, 1983).

O processo de fabricação da cachaça se resume nas seguintes etapas: recepção e descarregamento, moagem, filtração e decantação, preparo do mosto, fermentação, destilação, filtração e engarrafamento. Também existem as etapas secundárias, que são opcionais e garante uma maior qualidade do produto, como o envelhecimento (CHAVES et al. 2003; STECH; PANDOLFI, 2019).

Na recepção, que consiste a primeira etapa de produção da cachaça, a cana chega em caminhões e são retiradas através de sistema motorizado apropriado para o descarregamento. A cana cortada à espera da moagem sofre deterioração, que resulta em perda de rendimento e conseqüentemente qualidade do produto, com isso, o tempo de espera entre o corte e o início da fermentação não pode ultrapassar o limite de 24 horas. Após a moagem, o caldo obtido também sofre deterioração por microrganismos indesejáveis, com isso, é necessário realizar a limpeza, desde a moagem até a fermentação. Para a moagem, a cana deve estar limpa, sem palhas, terras e outras impurezas que são fontes de contaminação do caldo, de redução da capacidade de fermentação e da qualidade da cachaça. O caldo também, ao sair das moendas apresenta grande quantidade de impurezas, que devem ser removidos antes da fermentação, que pode ser realizada por meio de telas (filtros) (CHAVES et al. 2003).

A fermentação consiste no processo de transformação dos açúcares do caldo em álcool pela ação de microrganismos conhecidos por leveduras, com destaque para *Saccharomyces cerevisiae* (GONÇALVES et al., 2021). As leveduras são, portanto, as responsáveis diretas pela transformação de açúcar em álcool e por várias outras reações benéficas ou maléficas, que afetam o rendimento e a qualidade da cachaça. Com isso, o mosto, que é o caldo de cana preparado para início da fermentação, deve conter alto teor de açúcar no caldo. A quantidade de açúcares (°Brix) no caldo depende da qualidade e estado de maturação da cana e da eficiência de extração das moendas (CHAVES et al. 2003). Segundo Bonassa et al., (2015) o Brix apresentar efeito significativo no tempo total da fermentação. Além disso, também é imprescindível a utilização de cepas de levedura eficientes no processo (MAICAS, 2020).

Logo após o término do ciclo de fermentação, o vinho deve passar pelo processo de destilação, para evitar que ocorram fermentações secundárias (ALCARDE, 2014). Com isso, o vinho fermentado é direcionado para a destilação, onde é aquecido em destiladores (alambiques), onde são separados e selecionados os produtos de acordo com as temperaturas de ebulição e é a partir do álcool do vinho que se obtém a cachaça. A qualidade sensorial da cachaça também depende, dentre outras variáveis, da natureza e da composição do vinho, do tipo e da forma que é conduzida a destilação (CHAVES et al. 2003).

Apenas 26% é considerado como cachaça ao final da destilação (ALCARDE, 2014). Este volume ainda é dividido em três produtos relativamente distintos: cabeça, coração e cauda. A cabeça, que corresponde a cerca de 10% do volume total de destilado, é constituída pelo primeiro produto destilado, apresentando alto teor de álcool e grande concentração de compostos indesejados. Para se obter uma cachaça de qualidade, essa primeira fração deve ser descartada. O coração, que representa cerca de 80% do volume total do destilado, contém a menor quantidade de impurezas, constituindo-se na fração desejada. A cauda, que corresponde a cerca de 10% do volume destilado, é conhecida como "água fraca", na qual a quantidade de álcool é pequena e apresenta substâncias indesejadas, e assim como ocorre na cabeça também é descartada (CHAVES et al. 2003; ALCARDE, 2014).

A expansão do mercado consumidor de cachaça estimula melhorias na cadeia produtiva por meio da implementação de controles mais rígidos e estudos mais detalhados sobre o processo de produção da bebida, bem com qualidade físico-química e sensorial (BARBOSA et al., 2016).

2.4 Perfil de qualidade da cachaça

Melhorar a qualidade da cachaça e ampliar o mercado consumidor deste destilado é imprescindível para viabilizar sua comercialização em mercados internacionais (MELO et al., 2021). Além disso, com a crescente tendência para exportação da cachaça, os produtores investem em tecnologia e buscam cada vez mais atender padrões internacionais (ALCARDE, 2014).

A cachaça é produzida a partir de caldo de cana fermentado com teor alcoólico entre 38% a 48% (BRASIL, 2005). Basicamente, cachaça é uma mistura complexa em uma matriz água/etanol. Em menor proporção estão presentes outras substâncias como ácidos carboxílicos, metanol, ésteres, aldeídos e álcoois superiores que são responsáveis pelo sabor e aroma que conferem as características sensoriais particulares de cada produto (AMORIN et al., 2016). Os

ésteres formados a partir de ácidos orgânicos e álcoois durante a fermentação desempenham um papel importante na formação das características sensoriais da cachaça (VICENTE et al., 2006).

Para que essa bebida seja registrada e comercializada, os compostos secundários, bem como eventuais contaminantes orgânicos e inorgânicos, devem obedecer aos limites máximos estabelecidos. Na Instrução Normativa nº 13 de 29 de junho de 2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento (MAPA) foi aprovado o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para cachaça (BRASIL, 2005).

Manter os padrões de qualidade permite agregar valor às características sensoriais, atender as exigências estabelecidas pela legislação, promover maior eficiência de produção com menor custo e maior competitividade no mercado (TONINI; PACHECO, 2014). As características físico-químicas e organolépticas da cachaça dependem de vários fatores envolvidos no controle de qualidade (GRANATO et al., 2014), metabólitos produzidos pelas leveduras (AMORIN et al., 2016), destilação e envelhecimento (VICENTE et al., 2006).

Além desses fatores, o caldo pode ser contaminado com microrganismos indesejáveis durante o processo de produção, sendo prejudicial à qualidade da bebida. responsáveis por gerar substâncias químicas, como aldeído e ácido acético, cobre e carbamato de etila (CE), que em altos teores causam depreciação do produto (BORTOLETTO et al., 2015). Dentre estes contaminantes, o carbamato de etila é considerado um composto potencialmente carcinogênico e pode ser encontrado em diversos alimentos e bebidas fermentadas, como cachaça e mesmo em pequenas quantidades é tóxico ao homem (ANJOS et al., 2011). A legislação brasileira estabeleceu um limite máximo de $150,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para esta substância em cachaça (BRASIL, 2014). Com isso, é necessário a higienização e controle desses microrganismos, desde a moagem até a fermentação (CHAVES et al., 2003). Segundo Bonassa et al. (2015) a contaminação é um dos principais fatores que afetam a eficiência da conversão de açúcares em etanol.

Outra prática que permite refinar a qualidade da cachaça é envelhecimento, de preferência em barris de madeira. As práticas de envelhecimento também tem impacto significativo na qualidade final da cachaça. As espécies vegetais que são extraídas as madeiras para confecção dos barris, a intensidade de tostagem da madeira e o período de maturação são os principais fatores que podem modificar a composição química e as propriedades sensoriais da cachaça envelhecida (BORTOLETTO et al., 2016).

Outro fator fundamental para produção de cachaça de alta qualidade é a utilização de cepas de levedura selecionadas (PATARO et al., 2002). As cepas selecionadas de levedura devem apresentar tolerância às variações físico-químicas, rápido crescimento, boa eficiência na condução do processo fermentativo, como menor risco de contaminação, menor competição por

nutrientes, associada ao maior rendimento, qualidade química e sensorial e padronização da bebida produzida (STROPPIA et al.; 2009).

2.5 Leveduras e a produção de cachaça

As leveduras são fungos com importância ecológica, médica e biotecnológica, sendo considerado um dos microrganismos mais valiosos para aplicações industriais. São unicelulares, estão amplamente disseminadas nos diferentes ecossistemas e distribuídas em dois filos: Ascomycota e Basidiomycota (GOULIAMOVA, et al., 2009). Os membros desses dois filos podem apresentar hifas septadas e como estrutura reprodutiva apresentam ascos no caso dos ascomicetos e basídio no caso dos basidiomicetos (SANTOS, 2015).

A nível nutricional, as leveduras não são particularmente exigentes em comparação com outros microrganismos, no entanto, seu crescimento é sustentado pela existência de compostos básicos como açúcares fermentescíveis, aminoácidos, vitaminas, minerais entre outros. Além disso, toleram ambientes ácidos com valores de pH em torno de 3,5. Do ponto de vista morfológico, apresentam uma elevada divergência morfológica, sendo as formas redonda, elipsoidal e oval as mais comuns. Para identificação, a avaliação microscópica é o primeiro recurso seguido por outros testes mais discriminatórios como os bioquímicos (MAICAS, 2020).

Antes a identificação das leveduras a nível de espécie era baseada em caracteres morfológicos e metabólicos, no entanto, estudos taxonômicos recentes mostraram que linhagens que diferem em caracteres morfológicos e metabólicos podem ser membros da mesma espécie. Esses achados colocam em dúvida a importância desses caracteres comumente usados para separação das linhagens, com isso, devem ser utilizadas ferramentas taxonômicas capaz de identificar os microrganismos tanto em nível de espécie quanto de subespécie, de forma rápida e precisa. Exemplos de ferramentas a serem utilizadas são: análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA genômico (RFLP's), análise do polimorfismo dos fragmentos de DNA amplificado (RAPD), análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) e sequenciamento de genes (GOULIAMOVA, et al., 2009).

Dentre as leveduras, a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, pertencente ao filo Ascomycota, é a mais estudada e uma ferramenta valiosa para a maioria das pesquisas básicas sobre organismos eucarióticos. Isso se deve à sua natureza unicelular, que muitas vezes simplifica o uso da mesma, no qual quase todas as funções biológicas encontradas em outros eucariotos também estão presentes e bem conservadas nesse microrganismo e é de fácil manipulação genética (PARAPOULI et al., 2020). *S. cerevisiae* foi o primeiro organismo

eucarioto a ter seu genoma inteiramente sequenciado, através de uma colaboração mundial, envolvendo esforço de cerca de 600 cientistas na Europa, América do Norte e Japão, possuindo cerca de 6 mil genes distribuídos por 16 cromossomos que permitiu elucidar informações sobre sua história evolutiva (GOFFEAU et al., 1996). Além disso, ao contrário de outros organismos modelo, esse microrganismo apresenta grande importância para várias aplicações biotecnológicas e têm sido usado há milênios na panificação, fabricação de cerveja, destilados, entre outros, sendo a levedura mais comum e disponível comercialmente (BADOTTI et al., 2014).

Embora a *S. cerevisiae* seja a principal responsável pela fermentação, outras leveduras, com as mesmas características, podem contribuir de forma positiva durante esse processo, como as leveduras conhecidas como não *Saccharomyces*, sendo essas antigamente eliminadas por ser consideradas contaminantes. Esses microrganismos são utilizados em inúmeros processos fermentativos, uma vez que suas altas diferenças metabólicas permitem a síntese de diferentes produtos finais. Pesquisas demonstram que apesar dessas leveduras apresentarem algumas desvantagens tecnológicas quando comparadas como *S. cerevisiae*, como menor poder fermentativo e produção de etanol, apresentam potencial para uso na fermentação de bebidas tradicionais e não tradicionais, com capacidade de produção de uma ampla variedade de compostos de importância sensorial necessários para melhorar a qualidade das bebidas fermentadas com diferentes perfis sensoriais (CORDERO-BUESO et al., 2013). Entre as leveduras não *Saccharomyces* mais estudadas estão espécies dos gêneros *Candida*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Brettanomyces*, *Pichia*, *Lanchacea* e *Kluyveromyces*, entre outras (MAICAS, 2020).

Na produção de cachaça, a fermentação corresponde ao mecanismo central do processo. As leveduras fermentadoras utilizam a fermentação para obtenção de energia, que ocorre sem a presença de oxigênio, sendo uma via de produção de energia anaeróbica. Consiste em um conjunto de reações enzimaticamente controladas, através das quais uma molécula orgânica é degradada em compostos mais simples, liberando energia. A fermentação é caracterizada como um processo de via catabólica, na qual há degradação das moléculas do carboidrato (glicose ou frutose), no interior da célula dos microrganismos até a formação de etanol e CO₂, acarretando liberação de energia. A levedura é o microrganismo predominante responsável por este tipo de fermentação (MANNAA et al., 2021).

A produção de cachaça pode ser realizada através da fermentação espontânea, utilizando o fermento “natural” ou por culturas *starter* com uso de fermento “selecionado” (MANNAA et al., 2021). O fermento natural é geralmente usado na produção de cachaça em pequena escala e

possui uma alta diversidade de espécies de leveduras, que favorecerem a formação de diversos compostos que dificultam a obtenção de um produto padronizado. Já o fermento selecionado, ocorre a produção de composto por leveduras selecionadas, de uma única espécie, e isso, permite uma alta velocidade de fermentação, redução de contaminantes e obtenção de uma bebida com melhor qualidade e padronizada (DUARTE et al., 2013; MOURA et al., 2020).

A produção de bebidas alcoólicas por leveduras é a mais antiga e economicamente uma das mais importantes biotecnologias. As leveduras desempenham papel vital na produção de todas as bebidas alcoólicas e a seleção de cepas de levedura adequadas é essencial não apenas para maximizar o rendimento alcoólico, mas também para manter a qualidade sensorial da bebida (MAICAS, 2020). Atualmente, esses microrganismos são usados em escala industrial, para garantir que o processo seja controlado e o resultado da fermentação seja estável em qualidade e propriedades. O principal papel desses microrganismos selecionados é acelerar o processo de fermentação, restringem o crescimento de microrganismos nocivos, fornecer propriedades distintas e desejáveis ao produto (MANNAA et al., 2021).

As cepas selecionadas de levedura devem apresentar tolerância às variações físico-químicas, boa eficiência na condução do processo fermentativo (STROPPIA et al.; 2009) e adaptação ao local de uso, pois o estresse causado por condições ambientais pode interferir no desempenho das mesmas (SILVA et al., 2011). O uso de cepas selecionadas permite início antecipado do processo, menor risco de contaminação, taxa de fermentação mais rápida e uniforme, menor competição por nutrientes essenciais, maior rendimento, melhor qualidade e padronização da bebida produzida (DUARTE et al., 2013).

Além da capacidade de fermentar, cepas de leveduras selecionadas apresentam capacidade de flocular e produzir uma variedade de benefícios à indústria de cachaçaria brasileira (VICENTE et al., 2006). Segundo Badotti et al. (2014) a produção utilizando cepas selecionadas apresentaram uniformidade nos compostos produzidos, contribuindo para melhorar a qualidade da cachaça produzida por diferentes destilarias.

Estudos têm buscado compreender a diversidade e atributos específicos de cepas selecionadas associadas à fermentação durante a produção de cachaça, a fim de utilizar a que melhor caracterize a bebida. A fermentação conduzida por leveduras selecionadas pode resultar em uma cachaça com acidez volátil significativamente inferior em comparação com a fermentação espontânea, que indica um processo de produção realizado com baixos níveis de contaminação (GONÇALVES et al., (2016). Acidez volátil alta é um parâmetro associado ao principal defeito sensorial em bebidas destiladas (ALCARDE et al., 2012).

Soares et al. (2011) ao acompanhar o processo de fermentação para produção de cachaça utilizando diferentes isolados de *S. cerevisiae*, observaram que os mesmos apresentaram diferenças na produção de metabólitos secundários durante o crescimento e fermentação em caldo de cana. Os autores selecionaram o melhor isolado para a produção de cachaça através da avaliação de células viáveis, maior taxa de floculação, ausência 1-propanol e presença de 1,3 butanediol.

A fermentação de cachaça apresenta uma alta diversidade ecológica para seleção de leveduras, dotadas de propriedades específicas importantes para uso industrial (ARAÚJO et al., 2018). Brexó et al. (2018) com objetivo de caracterizar leveduras isoladas do ambiente de produção artesanal de cachaça através da morfologia celular, parâmetros de crescimento e fermentativos e cariotipagem visando aplicação em bioprocessos, obtiveram um total de 134 linhagens de leveduras estudadas, sendo 71 *Saccharomyces cerevisiae*, 19 *Torulaspota delbrueckii*, 8 *Wickerhamomyces anomalus*, 6 *Candida parapsilosis*, 5 *Pichia mashurica*, 3 *Candida intermédia*, 2 *Clavispora lusitaniae* e 1 *Candida aaseri*.

Vicente et al. (2006) selecionaram cepas de leveduras *S. cerevisiae* produtoras de maiores teores de compostos aromatizantes para produção de cachaça brasileira por sua capacidade de adaptação às condições de estresse encontradas durante a fermentação do caldo de cana-de-açúcar, capacidade de floculação e fermentativa. Segundo Portugal et al., (2017) vários fatores podem determinar a incidência, diversidade e densidade de microrganismos durante o processo de fermentação, como adaptação as condições ambientais. Em geral, as cepas utilizadas são obtidas de indústrias do Sudeste do país e, portanto, adaptadas as condições ambientais dessa região (MOREIRA et al., 2015). É de fundamental importância a utilização de cepas adaptação ao local de uso para o sucesso do processo fermentativo, pois o estresse causado pelas condições ambientais pode interferir no desempenho das mesmas (SILVA et al., 2011).

É crescente o desenvolvimento de pesquisas visando a aplicação de tecnologias no processo fermentativo da produção de bebidas. O objetivo da aplicação de leveduras selecionadas é a obtenção de produtos diferenciados e de maior valor agregado, alcançado com a distribuição, seleção de cepas adaptadas às condições ambientais e ao processo para produção de bebidas destiladas diferenciadas e de qualidade, com identidade e relevância cultural (PORTUGAL et al., 2017). Alguns estudos propuseram avaliar fermentações regionais a fim de melhor compreender as comunidades microbianas relacionadas, bem como selecionar cepas de leveduras locais (SOUZA et al., 2012; BADOTTI et al., 2014, BARBOSA et al., 2016). Os resultados dessas pesquisas fornecem conhecimento sobre a microbiota associada à produção de cachaça nos respectivos territórios permite a seleção de cepas adaptadas às condições ambientais

e com capacidade de obtenção de um produto com identidade regional. Estudos como esses são fundamentais, já que o microbioma associado ao processo produtivo da cachaça ainda é pouco conhecido (PORTUGAL et al., 2017).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Complexo Agroindustrial, localizado no Campus II da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Lagoa Seca, Paraíba, Brasil. Inicialmente a cana-de-açúcar foi coletada nos municípios de Areia-PB, Lagoa Seca-PB, Alagoa Nova-PB e Alagoa Grande-PB. Depois, as plantas foram cortadas e levadas para moagem na moenda do Complexo Agroindustrial da UEPB. O caldo obtido foi mantido em frascos de vidro, a temperatura ambiente no referido laboratório por 24 horas, em sua conformação natural, sem qualquer adição ou correção, visando assim obter o máximo de diversidade de leveduras nativas.

Realizou-se o isolamento das leveduras, após o período de 24 horas, com caldo em pleno processo de fermentação nos frascos. Para isso, foi coletada uma amostra de 1 ml do caldo com o auxílio de uma pipeta graduada e diluída em 1000 ml de água destilada esterilizada, obtendo uma concentração de 1:1000 (10^{-3}). Após homogeneização, foi coletada uma alíquota da solução e inoculada em uma placa de Petri contendo meio Ágar YPG (glicose a 30%) e espalhada com o auxílio de uma alça de Drigalski. A inoculação foi realizada em condições assépticas em câmara de fluxo. As placas foram preparadas em triplicatas e o grupo controle consistiu na inoculação de água destilada nas mesmas condições do experimento teste, a fim de se mensurar a ausência de contaminação durante os procedimentos. No total foram montadas 16 placas, sendo 12 placas com a solução para isolamento e 4 placas controle. As placas foram incubadas em estufa microbiológica a 28°C por 48 horas.

O controle bacteriano foi realizado sem uso de antibióticos tradicionais, através da alta concentração de açúcar no meio de cultura da etapa de isolamento (meio Ágar YPG a 30% de glicose) conforme apresentado por Kutzman et al. (2011). O alto teor de glicose além de inibir o desenvolvimento de bactérias, também permitiu o isolamento de linhagens de leveduras tolerantes a altas concentrações de açúcar, já funcionando como um meio seletivo aos propósitos do trabalho.

Transcorrido o período de incubação, as colônias com morfologia típica de leveduras e que se desenvolveram de forma isolada no meio, foram coletadas. Os isolados foram transferidos, com auxílio de alça microbiológica esterilizada com álcool a 70% e flambada na chama da lamparina, para um tubo de ensaio contendo meio Ágar YPG (glicose a 2%). A transferência para os tubos foi realizada em réplica para cada isolado, mantendo assim uma reserva de segurança e uma amostra para repiques a serem usados nas etapas posteriores. Os tubos foram mantidos em estufa microbiológica a 28°C durante a condução dos testes.

Utilizou-se os meios de cultura YPG para isolamento, manutenção e tolerância do etanol; o meio YPG líquido para teste de fermentação e o meio Ágar LA para o teste de produção de sulfeto (Tabela 1).

Tabela 1. Composição dos meios de culturas utilizados nos testes de seleção de leveduras, realizados no Complexo Agroindustrial, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Lagoa Seca, Paraíba, Brasil.

Meio Agar YPG	%
Ágar	1%
Peptona	0,3%
Extrato de levedura	0,3%
Glicose	2%
Água destilada	
Meio YPG líquido	%
Peptona	0,75%
Extrato de levedura	0,75%
Glicose	2%
Água destilada	
Meio Ágar LA	%
Glicose	4%
Peptona	0,3%
Extrato de levedura	0,5%
Sulfato de amônio	0,02%
Acetato de chumbo neutro	0,1%
Ágar	2%
Água destilada	

Fonte:

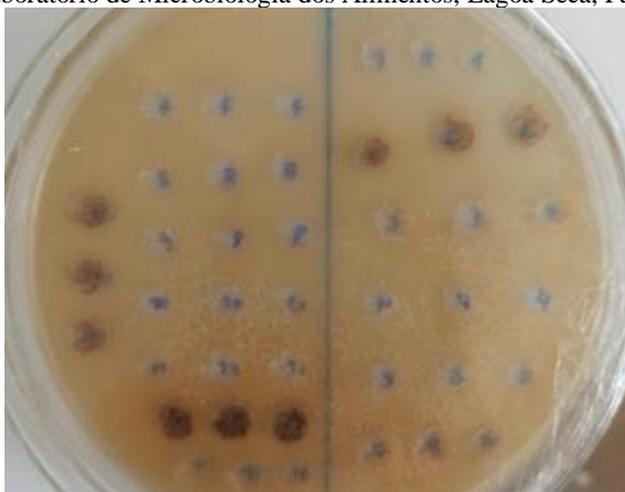
Realizou-se ajustes do Ph em todos os meios, visando obter sempre um nível próximo de 4,0, visto que o desenvolvimento de leveduras se dá mais satisfatoriamente em meio ácido (MAICAS, 2020). Para isso, fez-se uso de ácido cítrico diluído a uma concentração de 10% em água destilada. Todos os meios de cultivo foram esterilizados após formulação em autoclave vertical a 121°C por 15 minutos. As vidrarias utilizadas na condução do experimento, béqueres, placas de Petri, tubos, pipetas e provetas também foram esterilizadas nas mesmas condições.

Para seleção das melhores leveduras do processo fermentativo, realizou-se quatro testes de exclusão, citados a seguir: **1) Produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S); 2) Fermentação de glicose; 3) Tolerância a etanol; e 4) Crescimento a 37 °C.**

Realizou-se o teste de sulfeto de hidrogênio (H₂S). As leveduras foram inoculadas em meio líquido YPG (glicose a 2%) e incubadas durante 24 horas a 28°C em estufa microbiológica. Após o período de desenvolvimento no meio líquido, as cepas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio Agar LA. Para este teste as placas foram preparadas seguindo o esquema de poços no meio solidificado. Com uma micropipeta foi coletada uma alíquota do meio líquido contendo as leveduras sendo então inoculada nos respectivos poços. As placas foram incubadas em estufa microbiológica a 30°C, com leituras realizadas de 7 e 12 dias após a inoculação. O experimento foi realizado em triplicata, tendo como controle placas contendo meio Ágar YPG (glicose a 2%) montadas seguindo os mesmos moldes das placas teste. Ao final do teste, as cepas foram agrupadas como produtoras e não produtoras de H₂S.

O meio Ágar LA possui componentes em sua formulação que evidenciam as cepas produtoras de H₂S, por possuírem coloração enegrecida na colônia durante seu desenvolvimento. As cepas que apresentaram a pigmentação escura, enegrecida, divergente do grupo controle, foram consideradas como produtoras de H₂S e, conseqüentemente, eliminadas nesta etapa da seleção (Figura 1).

Figura 1: Teste de sulfeto de hidrogênio (H₂S) no Complexo Agroindustrial, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Lagoa Seca, Paraíba, Brasil.



Fonte: O autor, 2021.

As leveduras que não apresentaram produção de H₂S foram submetidas ao teste de fermentação, seguindo a metodologia de Figueiredo (2020). Em tubos de ensaio com tampa de rosca foi colocado 10 ml de meio líquido YPG (glicose a 2%) com Ph ajustado para 4,5 e introduzido um tubo de Durham invertido, de modo que o mesmo ficasse completamente

preenchido pelo meio, sem bolhas de ar. Os tubos foram esterilizados anteriormente e após resfriamento foi realizada a inoculação das leveduras nos tubos de ensaio. Com uma alça microbiológica esterilizada foi coletada uma porção da colônia preservada e transferida para o tubo com meio líquido teste. Para cada cepa analisada foram preparados dois tubos, os quais foram mantidos em estufa microbiológica a 28°C durante a condução do experimento.

A fermentação foi mensurada pela produção gradual de gás nos tubos, atribuindo os valores +1, +2 e +3 conforme a proporção de gás acumulado nos tubos de Durham. Esses valores são atribuídos visualmente, sendo +1 quando o volume de gás corresponde a 1/3 do tubo, +2 correspondendo a 2/3 e +3 quando o tubo estava completamente cheio (Figura 1).

Figura 2: Teste de fermentação de glicose com tubos de Durham introduzidos em tubos de ensaio, no Complexo Agroindustrial, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Lagoa Seca, Paraíba, Brasil.



Fonte:O autor,2021.

Após a inoculação, realizou-se as leituras durante 4 dias, quando todos os isolados apresentaram fermentação e atingiram o preenchimento máximo dos tubos de Durham. As cepas que não fermentaram foram eliminadas da seleção e as que atingiram maior fermentação foram submetidas aos próximos testes: Tolerância a etanol e Crescimento a 37 °C, conseqüentemente.

Para tolerância a etanol realizou-se as mesmas diretrizes do teste para produção de H₂S. O inóculo foi preparado 24 horas antes em meio líquido YPG 2%. Em seguida, as cepas foram inoculadas em meio de cultura Ágar YPG 2% com adição de etanol antes de verter o meio nas placas de Petri. O volume de etanol adicionado no meio foi de 10%, 14% e 18%. As placas foram montadas em triplicata seguindo o esquema de poços descrito anteriormente. Instalou-se placas controle com o meio Ágar YPG 2% sem adição de etanol. As placas foram incubadas em estufa microbiológica por 48 horas a 30°C. As cepas que atingiram desenvolvimento igual ou aproximado ao observado no controle foram consideradas tolerantes à concentração testada.

Selecionou-se as leveduras que demonstraram tolerância no volume mínimo de 14% do teor alcoólico, para seguir para o teste final (Crescimento a 37 °C).

Figura 3: Teste de tolerância a etanol no Complexo Agroindustrial, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Lagoa Seca, Paraíba, Brasil.



Fonte: O autor, 2021.

Por fim, as leveduras selecionadas no teste de tolerância a etanol foram submetidas ao ensaio de crescimento a 37°C. O experimento foi realizado em placas de Petri contendo meio Ágar YPG 2% previamente esterilizado. As placas foram montadas com três repetições, em câmara de fluxo e incubadas em estufa microbológica por 48 horas a 37°C.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia aplicada para o isolamento de leveduras permitiu a obtenção de 126 colônias puras, aptas para aplicação nos testes de exclusão, as quais foram divididas em grupos, conforme representado na Tabela 2. Os isolados foram distribuídos em quatro grupos: “A”, “B”, “C” e “D”, com total de 32, 42, 38 e 14 colônias, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Isolamento do número de colônias em cada grupo, realizado no Complexo Agroindustrial, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Lagoa Seca, Paraíba, Brasil.

Grupo	A	B	C	D	Total
Isolados	32	42	38	14	126

Fonte:

Observou-se menor contagem de colônias no grupo D, fato correlacionado ao curto tempo do processo (24 horas), baixa concentração de uma comunidade microbiana na matéria-prima (caldo de cana) e/ou do ambiente circundante (BREXÓ et al., 2020). O processo de isolar em 24 horas, tem como finalidade obter cepas dominantes da fermentação e evitar a ocorrência de microrganismos contaminantes (WANG et al., 2016).

Para os demais grupos (A, B e C), obteve-se uma maior representatividade do número de colônias isoladas da microbiota. Em outros destilados, pesquisadores obtiveram números aproximados em relação ao presente estudo, a exemplo de Wlodarczyk et al. (2012), pois conseguiu um total de 120 linhagens de leveduras para produção de vinho, na região de Pinto Bandeira, Bento Gonçalves-RS. Guimarães (2005) verificou um total de 61 leveduras em Colombo-PR, para produção artesanal de vinho, sendo um resultado inferior ao observado na presente pesquisa.

Vale ressaltar que a seleção de representantes locais mais eficientes, durante o processo fermentativo para produção de cachaça na região do brejo paraibano, fornece informações sobre a diversidade de microrganismos nessa localidade e contribui com a identidade regional do produto (BARBOSA et al., 2016), sendo uma característica importante para a produção de cachaça, visando a expansão de novos mercados, principalmente pelos produtores da região.

No teste de sulfeto de hidrogênio (H₂S) as cepas agruparam-se como produtoras e não produtoras, conforme descrito nas Tabela 3 e Tabela 4. Observou-se produção de H₂S em 58 cepas, representando 46% do total. Os isolados produtores de H₂S foram eliminados no processo seletivo, por ser uma característica indesejável em leveduras produtoras de cachaça, conforme destacam Wlodarczyk et al. (2012), onde indicam a seleção de cepas de leveduras que não

produzam H₂S durante a fermentação. Eles enfatizam ainda que, a produção de H₂S por leveduras é um problema na fabricação de bebidas destiladas. Essa substância é um produto secundário da fermentação alcoólica, que possui um aroma desagradável e que prejudica a qualidade do produto. Portanto, os 68 isolados de leveduras (54%) do presente estudo, consideradas não produtoras de H₂S, foram selecionadas para os próximos ensaios.

Tabela 3. Cepas submetidas ao teste de produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), realizado no Complexo Agroindustrial, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Lagoa Seca, Paraíba, Brasil.

Produtoras de H₂S		
<i>A2, A4, A8, A10, A11, A12, A17, A21, A22, A29, A30, A31, B1, B3, B5, B6, B7, B10, B13, B15, B16, B17, B19, B22, B25, B28, B29, B31, B34, B35, B36, B37, B38, B40, C10, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C21, C22, C24, C25, C27, C28, C30, C32, C33, C36, D1, D2, D3, D5, D8, D9, D12</i>		
Não produtoras de H₂S		
<i>A1, A3, A5, A6, A7, A9, A13, A14, A15, A16, A18, A19, A20, A23, A24, A25, A26, A27, A28, A32, B2, B4, B8, B9, B11, B12, B14, B18, B20, B21, B23, B24, B26, B27, B30, B32, B33, B39, B41, B42, C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C11, C12, C19, C20, C23, C26, C29, C34, C37, C38, D6, D7, D10, D11, D13, D14</i>		

Fonte:

Cepas isoladas na região Demarcada do Douro, Portugal, para produção de vinho mostraram valores elevados de leveduras produtoras de H₂S (90,3%) e os resultados demonstram que a composição do mosto influenciou significativamente a capacidade das leveduras em produzir esse produto (NETO; MENDES-FERREIRA, 2005). O material que é utilizado para extrair o caldo (cultura e cultivar) e/ou tipo de tratamento fitossanitário recebido pelas cultivares e a composição química do mosto (presença de nitrogênio assimilável) pode influenciar a produção de H₂S nas leveduras isoladas em diferentes regiões (WLODARCZYK et al., 2012).

Tabela 4. Visão geral da produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) pelas cepas testadas aos 7 dias após inoculação (D7) e aos 12 dias após inoculação (D12), no Complexo Agroindustrial, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Lagoa Seca, Paraíba, Brasil.

Grupo A			Grupo B			Grupo C			Grupo D		
CEPA	D7	D12									
<i>A1</i>	-	-	<i>B1</i>	-	+	<i>C1</i>	-	-	<i>D1</i>	+	+
<i>A2</i>	-	+	<i>B2</i>	-	-	<i>C2</i>	-	-	<i>D2</i>	+	+
<i>A3</i>	-	-	<i>B3</i>	-	+	<i>C3</i>	-	-	<i>D3</i>	-	+

<i>A4</i>	+	+	<i>B4</i>	-	-	<i>C4</i>	-	-	<i>D5</i>	+	+
<i>A5</i>	-	-	<i>B5</i>	+	+	<i>C5</i>	-	-	<i>D6</i>	-	-
<i>A6</i>	-	-	<i>B6</i>	+	+	<i>C6</i>	-	-	<i>D7</i>	-	-
<i>A7</i>	-	-	<i>B7</i>	+	+	<i>C7</i>	-	-	<i>D8</i>	+	+
<i>A8</i>	+	+	<i>B8</i>	-	-	<i>C8</i>	-	-	<i>D9</i>	-	+
<i>A9</i>	-	-	<i>B9</i>	-	-	<i>C10</i>	-	+	<i>D10</i>	-	-
<i>A10</i>	+	+	<i>B10</i>	+	+	<i>C11</i>	-	-	<i>D11</i>	-	-
<i>A11</i>	+	+	<i>B11</i>	-	-	<i>C12</i>	-	-	<i>D12</i>	+	+
<i>A12</i>	+	+	<i>B12</i>	-	-	<i>C13</i>	+	+	<i>D13</i>	-	-
<i>A13</i>	-	-	<i>B13</i>	-	+	<i>C14</i>	+	+	<i>D14</i>	-	-
<i>A14</i>	-	-	<i>B14</i>	-	-	<i>C15</i>	-	+			
<i>A15</i>	-	-	<i>B15</i>	-	+	<i>C16</i>	+	+			
<i>A16</i>	-	-	<i>B16</i>	-	+	<i>C17</i>	+	+			
<i>A17</i>	-	+	<i>B17</i>	-	+	<i>C18</i>	+	+			
<i>A18</i>	-	-	<i>B18</i>	-	-	<i>C19</i>	-	-			
<i>A19</i>	-	-	<i>B19</i>	-	+	<i>C20</i>	-	-			
<i>A20</i>	-	-	<i>B20</i>	-	-	<i>C21</i>	+	+			
<i>A21</i>	+	+	<i>B21</i>	-	-	<i>C22</i>	+	+			
<i>A22</i>	+	+	<i>B22</i>	+	+	<i>C23</i>	-	-			
<i>A23</i>	-	-	<i>B23</i>	-	-	<i>C24</i>	+	+			
<i>A24</i>	-	-	<i>B24</i>	-	-	<i>C25</i>	+	+			
<i>A25</i>	-	-	<i>B25</i>	+	+	<i>C26</i>	-	-			
<i>A26</i>	-	-	<i>B26</i>	-	-	<i>C27</i>	-	+			
<i>A27</i>	-	-	<i>B27</i>	-	-	<i>C28</i>	+	+			
<i>A28</i>	-	-	<i>B28</i>	+	+	<i>C29</i>	-	-			
<i>A29</i>	+	+	<i>B29</i>	+	+	<i>C30</i>	-	+			
<i>A30</i>	+	+	<i>B30</i>	-	-	<i>C32</i>	+	+			
<i>A31</i>	+	+	<i>B31</i>	-	+	<i>C33</i>	+	+			
<i>A32</i>	-	-	<i>B32</i>	-	-	<i>C34</i>	-	-			
			<i>B33</i>	-	-	<i>C36</i>	-	+			
			<i>B34</i>	-	+	<i>C37</i>	-	-			
			<i>B35</i>	+	+	<i>C38</i>	-	-			
			<i>B36</i>	+	+						
			<i>B37</i>	+	+						

	<i>B38</i>	+	+		
	<i>B39</i>	-	-		
	<i>B40</i>	-	+		
	<i>B41</i>	-	-		
	<i>B42</i>	-	-		

Fonte:

No ensaio de fermentação de glicose realizou-se uma nova varredura, ou seja, das 68 cepas oriundas do teste anterior, somente 14 cepas foram escolhidas (A4, A11, A29, A31, B5, B7, C17, C18, C21, C24, D1, D2, D8 e D12), com base na produção de CO₂ no menor tempo, indicando o melhor perfil de eficiência fermentativa, onde todas atingiram o máximo de volume do tubo no segundo dia do processo. As demais cepas tiveram uma fermentação tardia, lenta e foram eliminadas.

De acordo com Kayikci; Nielsen, (2015) o número elevado de cepas fermentadoras pode estar relacionado com o meio de cultivo utilizado na etapa de isolamento, o que resultou numa seleção prévia de cepas tolerantes a altas concentrações de açúcar na presente pesquisa. Os autores descrevem que embora as células de levedura possam utilizar uma ampla gama de fontes de carbono, a glicose é a fonte primária de energia para esses microrganismos.

Na Tabela 5 observa-se os resultados do teste de tolerância a etanol (v/v), em três concentrações (10%, 14% e 18%). Verificou-se que as 14 cepas selecionadas obtiveram crescimento nos meios contendo 10% e 14%, sendo, portanto, tolerantes a tais concentrações. Já no meio contendo 18% de etanol, observou-se crescimento de 4 isolados (B5, C18, C21 e D8). Dessa forma, todas as cepas avaliadas seguiram para o ensaio final, pois segundo Oliveira (2015), a maioria das cepas de *S. cerevisiae* são capazes de fermentar o açúcar até o teor alcoólico de 12%. Silva et al. (2013) destacam que altas concentrações de etanol reduzem a multiplicação e a viabilidade das leveduras, devido a desnaturação, inibição de enzimas e danos à membrana plasmática. Ressaltam ainda, que a avaliação da capacidade de sobrevivência das células expostas ao etanol é uma ferramenta útil para selecionar e comparar a tolerância de diferentes cepas de leveduras.

Tabela 5. Crescimento de 14 cepas de leveduras em três concentrações de etanol (10%, 14% e 18%), no Complexo Agroindustrial, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Lagoa Seca, Paraíba, Brasil.

Isolados	FG	Et 10%	Et 14%	Et 18%
A4	x	x	x	-
A11	x	x	x	-

A29	x	x	x	-
A31	x	x	x	-
B5	x	x	x	x
B7	x	x	x	-
C17	x	x	x	-
C18	x	x	x	x
C21	x	x	x	x
C24	x	x	x	-
D1	x	x	x	-
D2	x	x	x	-
D8	x	x	x	x
D12	x	x	x	-

Fonte:

As 14 cepas selecionadas da etapa anterior foram submetidas ao teste final (Crescimento a 37° C). Nesta etapa selecionou-se apenas dois isolados (A11 e D8), pois foram as únicas que obtiveram crescimento a 37 °C. Segundo Figueiredo (2020) é essencial a seleção de cepas resistentes a altas temperaturas, pois no processo de produção de cachaça, durante a fermentação, ocorre aumento da temperatura do mosto e com isso evita perdas na produtividade e na qualidade do produto. A temperatura é um fator limitante para a sobrevivência de qualquer organismo vivo, e no caso específico de leveduras a temperatura ótima para crescimento é em torno dos 30 °C, sendo recomendado o uso de cepas com resistência ao aumento dessa faixa. Guimarães (2005) selecionando cepas de leveduras *S. cerevisiae* para elaboração de vinho, obteve resultado superior em relação ao presente estudo, pois 87% dos isolados permaneceram viáveis quando incubadas a 37 °C.

5 CONCLUSÃO

As cepas A11 e D8 foram promissoras, pois não produziram sulfeto de hidrogênio, foram tolerantes a fermentação de glicose e a concentração de etanol, por fim, atingiram crescimento a uma temperatura de 37°C, sendo recomendadas em futuras pesquisas para produção de cachaça no brejo paraibano.

REFERÊNCIAS

- ALCARDE, A. R. **Cachaça: ciência, tecnologia e arte**. São Paulo: Blucher, 2014. 96p.
- ANJOS, J. P. D.; CARDOSO, M. D. G.; SACZK, A. A.; ZACARONI, L. M.; SANTIAGO, W. D.; DÓREA, H. S.; MACHADO, A. M. D. R. Identificação do carbamato de etila durante o armazenamento da cachaça em tonel de carvalho (*Quercus* sp.) e recipiente de vidro. **Química Nova**, v. 34, n. 874-878, 2011.
- AUDE, M. I. D. S. Estádios de desenvolvimento da cana-de-açúcar e suas relações com a produtividade. **Ciência Rural**, v. 23, n. 2, p. 241-248, 1993.
- BARBOSA, E. A., SOUZA, M. T., DINIZ, R. H. S., GODOY-SANTOS, F., FARIA-OLIVEIRA, F., CORREA, L. F. M.; ALVAREZ, F.; COUTRIM, M. X.; AFONSO, R. J. C. F.; CASTRO, I. M.; BRANDAO, R. L. 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.
- BADOTTI, F.; VILAÇA, S. T.; ARIAS, A.; ROSA, C. A.; BARRIO, E. Two interbreeding populations of *Saccharomyces cerevisiae* strains coexist in cachaça fermentations from Brazil. **FEMS yeast research**, v. 14, n. 2, p. 289-301, 2014.
- BELLÉ, C.; KULCZYNSKI, S. M.; GOMES, C. B.; KUHN, P. R. Fitonematoides associados à cultura da cana-de-açúcar no Rio Grande do Sul, Brasil. **Nematropica**, v. 44, n. 2, p. 207-217, 2014.
- BONASSA, G.; SCHNEIDER, L. T.; CREMONEZ, P. A.; OLIVEIRA, C. D. J.; TELEKEN, J. G.; FRIGO, E. P. Optimization of first generation alcoholic fermentation process with *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Scientiarum**. V. 37, n. 3, p. 313-320. 2015.
- BORTOLETTO, A. M.; CORREA, A. C.; ALCARDE, A. R. Aging practices influence chemical and sensory quality of cachaça. **Food Research International**. v. 86, p. 46-53, 2016.
- 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. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário Oficial da União de 05/06/2009, p. 20.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº. 13, de 29 de junho de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça. Diário Oficial da União de 30/06/2005, Seção 1, p. 3.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei nº 11.873, 19 de abril de 2021. Confere o Título de Capital Paraibana da Cachaça à cidade de Areia, no Estado da Paraíba.

Diário Oficial do Estado da Paraíba: 1ª Parte, João Pessoa, PB, Ano 2021, Edição: 17.348, p. 1, 20 de abril de 2021.

CAMPOS, C. R.; SILVA, C. F.; DIAS, D. R.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; SCHWAN, R. F. 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.

CHAVES, J.; FERNANDES, A.; SILVA, C. **Produção artesanal de cachaça de qualidade** (Capacidade de 3000L por dia), 2003.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Série Histórica das Safras**. Brasília: 2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras>. Acesso em: 25 de abril de 2022.

CORDERO-BUESO, G.; ESTEVE-ZARZOSO, B.; CABELLOS, J. M.; GIL-DÍAZ, M.; ARROYO, T. Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.). **European Food Research and Technology**, v. 236, n. 1, p. 193-207, 2013.

CRUZ, C. H. D. B.; SOUZA, G. M.; CANTARELLA, H.; CORTEZ, L. A. B.; SLUYS, M. A. V.; MACIEL FILHO, R. **Universidades e empresas: 40 anos de ciência e tecnologia para o etanol brasileiro**. São Paulo: Blucher. 2016, 225p.

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, v. 1, p. 175-194, 2013.

FERREIRA, R. J.; ROSA, T. R.; RIBEIRO, J.; BARTHUS, R. C. Simultaneous metal determination in artisanal cachaça by using voltammetry and multivariate calibration. **Food Chemistry**, v. 314, 126126, 2020.

FIGUEIREDO, D. R. D. **Isolamento e seleção de leveduras fermentadoras da cana-de-açúcar para produção de cachaça na região do brejo paraibano**. 2020. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão - UEPB, Campina Grande, 2020.

GOFFEAU, A.; BARREL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R.; DUJON, B.; FELDMAN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J. D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E. J.; MEWES, H.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVIER, S. G. Life with 6000 genes. **Science**, 274(5287), 546-567, 1996.

GONÇALVES, C. M.; CARVALHO, S.; NETO, A. G.; SERENO, H. R.; HUGHES, A. S.; OLIVEIRA, B.; PINHEIRO, C. S. R.; UETANABARO, A. P. Produção e análise química de cachaça de alambique a partir de cepa selecionada de *Saccharomyces cerevisiae*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.37, n.2, p. 1-17, 2021.

GOULIAMOVA, D.; DIMITROV, R.; PETROVA, P.; STOYANCHEVA, G.; PETROV, K. Genomic Approaches to Yeast Taxonomy. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 23, p. 519-523, 2009.

GUERRA, J. B.; ARAÚJO, R. A. C.; PATARO, C.; FRANCO, G. R.; MOREIRA, E. S. A.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; ROSA, C. A. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 106-111, 2001.

IBRAC – Instituto Brasileiro de Cachaça: **Mercado interno**. Disponível em: <<https://ibrac.net/servicos/mercado-interno>>. Acesso em: 25 de abril de 2022.

KAYIKCI, Ö.; NIELSEN, J. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, v. 15, n. 6, fov068, 2015.

LIMA, C. M. G.; BENOSO, P.; PIEREZAN, M. O.; SANTANA, R. F.; HASSEMER, G. S.; ROCHA, R. A.; NORA, F. M. D.; VERRUCK, S.; CAETANO, D.; SIMAL-GANDARA, J. 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, 2021.

LIMA, U. A. Aguardentes. In: AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. (Ed.) **Alimentos e bebidas produzidas por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher, 1983. cap.4, p. 79-102. (Série Biotecnologia, v.5).

LIZ, C. N.; RODRIGUES, R. A.; SILVA, S. W.; SANTOS, A. C.; MELO, T. F. Produção de cachaça artesanal e seu contexto: um estudo de caso com alambiques do sul de Minas Gerais. **Revista da UI_IPSantarém-Unidade de Investigação do Instituto Politécnico de Santarém**, p. 1-20, 2016.

MAGRO, F. J.; TAKAO, G.; CAMARGO, P. E.; TAKAMATSU, S. Y. Biometria em cana-de-açúcar. *Produção Vegetal*, ESALQ, Piracicaba, 2011. 18p.

MAICAS, S. The role of yeasts in fermentation processes. **Microorganisms**, v.8, n. 8, p. 1142, 2020.

MANNAA, M.; HAN, G.; SEO, Y. S.; PARK, I. Evolution of Food Fermentation Processes and the use of multi-omics in deciphering the roles of the microbiota. **Foods**, v. 10, n. 11, p. 2861, 2021.

MARAFON, A. C. **Análise quantitativa de crescimento em cana-de-açúcar: uma introdução ao procedimento prático**. Embrapa Tabuleiros Costeiros-Documents (INFOTECA-E), 2012. 29p.

MARIN, F; NASSIF, D. S. Mudanças climáticas e a cana-de-açúcar no Brasil: Fisiologia, conjuntura e cenário futuro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 2, p. 232-239, 2013.

MARTINS, M. F.; SILVA, N. C.; OURIQUES, R. A. B.; CÂNDIDO, G. A. Gestão e tecnologia em engenhos produtores de cachaça no brejo da Paraíba-Brasil. **Revista Gestão Industrial**, v. 14, n. 3, p. 209-230, 2018.

MARTINS, S. C. S.; LIMA, R.; MARTINS, C. M. Isolamento e caracterização de leveduras de caldo de cana de uma indústria de fermentação alcoólica no nordeste brasileiro. **Enciclopédia Biosfera**, v.11 n.22; p. 3019, 2015.

MELO, T. S.; MAGALHÃES, A. E. M.; SILVA, A. P. G.; SILVA, E. L.; LINS, H. T. S.; FERREIRA, M. C.; MELO, T. S. Processo de produção da aguardente e cachaça: Uma revisão. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 10, p. 95981-96001, 2021.

MOREIRA, C. S.; SANTOS, M. D. S. M.; BARROS, N. S.; CARDOSO, C. A. L.; BATISTOTE, M. Evaluation of morphological and physiological parameters of industrial yeast strains with potential biotechnological for the production of etanol. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 4, p. 55-63, 2015.

MOURA, J. A. A.; BELISÁRIO, C. M.; VIANA, L. F.; SILVA FILHO, M. P.; MOURA, B. A. Qualidade de cachaças artesanais produzidas com leveduras de diferentes origens. **Scientia Plena**, v. 16, n. 3, 2020.

NETO, L.; MENDES-FERREIRA, A. A. Pesquisa de atividade sulfito redutase em leveduras de origem enológica. **Food Science and Technology**, v. 25, p. 275-278, 2005.

PAIVA, A. L. D.; SOUZA, R. B. D.; BARRETO, I. D. D. C.; BRITO, M. J. D. FLUXO das Exportações Brasileiras de Cachaça: traços da influência do Estado no setor. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 55, n. 4, p. 733-750, 2017.

PARAPOULI, M.; VASILEIADIS, A.; AFENDRA, A. S.; HATZILOUKAS, E. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. **AIMS microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1, 2020.

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

PEREIRA, J. A. M. S.; ROSA, C. A.; FARIA, J. B. **Cachaça de Alambique**. LK Editora, Brasília, 2006, 179p.

RODRIGUES, G. S. D. S. C; ROSS, J. L. S. **A trajetória da cana-de-açúcar no Brasil: perspectivas geográfica, histórica e ambiental**. EDUFU, 2020. 272p.

ROQUE, D. W. B.; SOUZA, P. A.; VILELA, A. F.; NASCIMENTO, J. P.; SANTOS, J. T. D. L. A.; MORAIS, A. C. A.; SILVA JÚNIOR, J. B. Avaliação do perfil das embalagens e rótulos de cachaça artesanal do brejo. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, p. 4, p. 6062-6071, 2021.

SANTIAGO, W.D.; BORGES, C. N.; BARBOSA, R. B.; MENDONÇA, H.; NELSON, A. D. L. CARDOSO, M. G. Investigation of Brazilian sugarcane spirits regarding their standardization and quality. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, e387974117, 2020.

SCARPARI, M. S; BEAUCLAIR, E. G. F. Anatomia e botânica. In: DINARDO-MIRANDA, L. L. *et al.* **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. 882p.

SCHWARTZ, S. B. **Segredos internos: engenhos e escravos na sociedade colonial 1550-1835** (v. 456). São Paulo: Companhia das Letras, 1988. 463p.

SILVA, R. O; BATISTOTE, M.; CEREDA, M. P. Wild strains of fermenting yeast isolated of sugar cane juice from an alcohol distillery from Mato Grosso, Brazil. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n.3, p. 22-27, 2011.

SILVA, R. O. D.; BATISTOTE, M.; CEREDA, M. P. Alcoholic fermentation by the wild yeasts under thermal, osmotic and ethanol stress. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 2, p. 161-169, 2013.

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.; VICENTE, M. A.; KLEIN, R. C.; FIETTO, L. G.; COUTRIM, M. X.; AFONSO, R. J. C. F.; ARAÚJO, L. D.; SILVA, P. H. A.; BOIULLET, L. E. M.; CASTRO, I. M.; BRANDAO, R. L. Strategies to select yeast starters cultures for production of flavor compounds in cachaça fermentations. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 101, n. 2, p. 379-392, 2012.

SOUZA, J. K. C.; MESQUITA, F. O.; NETO, J. D.; SOUZA, M. M. A.; FARIAS, C. H. A.; MENDES, H. C.; NUNES, R. M. A. Fertirrigação com vinhaça na produção de cana-de-açúcar. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 11, n. 2, p. 7-12, 2015.

STECH, W. R.; PANDOLFI, M. A. C. Estudo de Viabilidade Econômica na Produção de Cachaça Artesanal. **Revista Interface Tecnológica**, v.16, n. 1, p. 360-369, 2019.

STROPPA, C. T.; ALVES, J. G. L. F.; FIGUEIREDO, A. L. F.; CASTRO, C. C. Kinetic parameters of yeasts strains isolated from cachaça distilleries in Minas Gerais/Brazil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1978-1983, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.

TONINI, M.; PACHECO, F. P. Perspectivas da produção de cachaça no Brasil. **Journal of Agronomic Sciences**, v. 3, p. 193-201, 2014.

VICENTE, M. A.; FIETTO, L. G.; CASTRO, I. M.; SANTOS, A. N. G.; COUTRIM, M. X.; BRANDAO, R. L. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains producing higher levels of flavoring compounds for production of “cachaça” the Brazilian sugarcane spirit. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, n. 1, p. 51-59, 2006.

WLODARCZYK, S. R.; SOUZA, R. C.; BONFIM, T. M. B.; BRAND, D.; SILVA, G. A. Evaluation of isolated yeasts from grapes of Pinto Bandeira region, Bento Gonçalves (RS) in relation to production of H₂S and fermentation rate. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, 2012.