

OSWALDO GUIMARÃES FILHO

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO ARTESANAL DA AGUARDENTE DE
BANANA UTILIZANDO *Saccharomyces cerevisiae* CA-1174**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação “Stricto Sensu” em Ciência dos Alimentos,
para obtenção do título de “Doutor”.

Orientadora

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2003**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Guimarães Filho, Oswaldo

Avaliação da produção artesanal da aguardente de banana utilizando
Saccharomyces cerevisiae CA-1174 / Oswaldo Guimarães Filho. --

Lavras: UFLA, 2003.

82 p. : il.

Orientadora: Rosane Freitas Schwan.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Aguardente de banana. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3.
Fermentação. 4. Tecnologia de produção. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD-663.53

OSWALDO GUIMARÃES FILHO

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO ARTESANAL DA AGUARDENTE DE
BANANA UTILIZANDO *Saccharomyces cerevisiae* CA-1174**

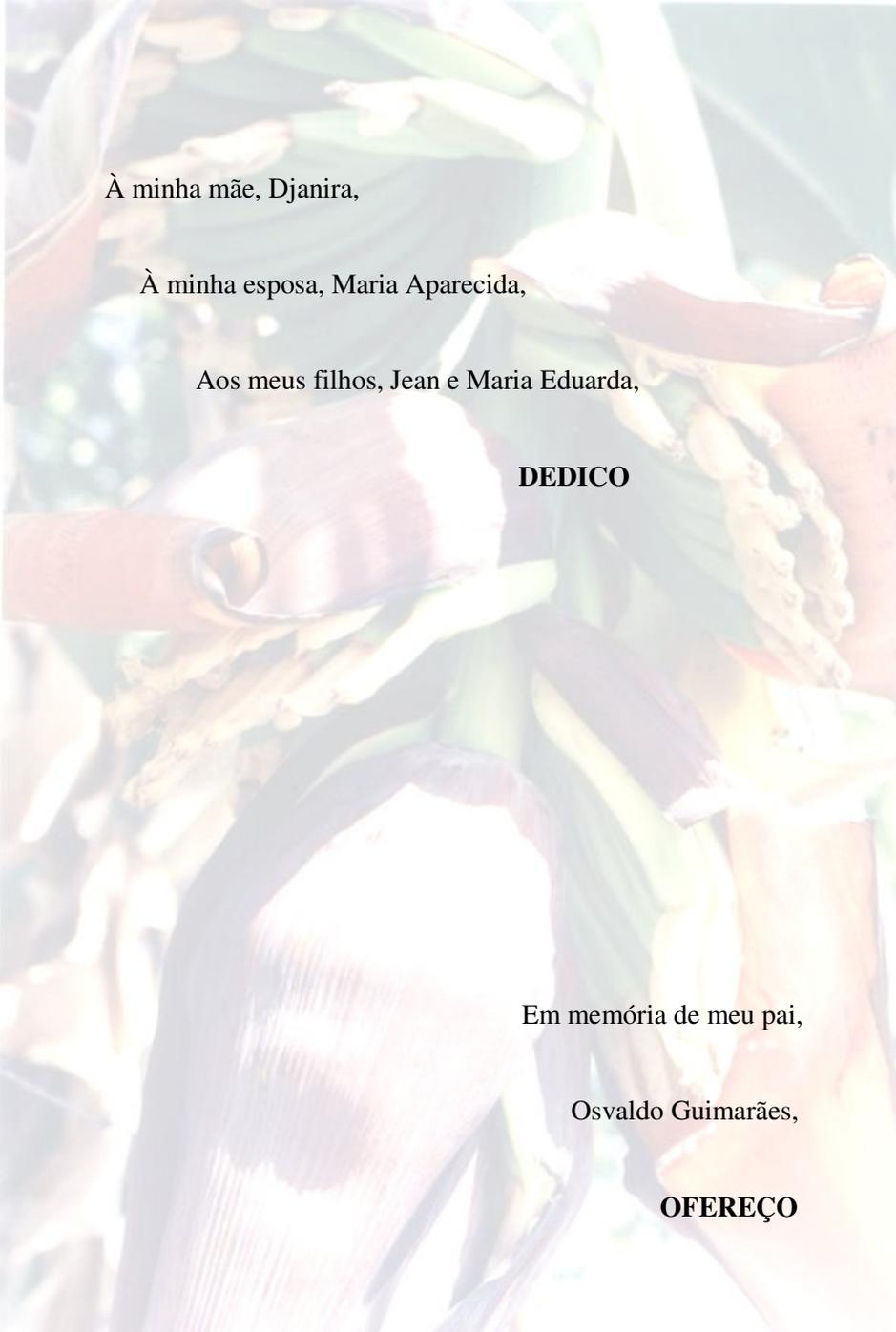
Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação “Stricto Sensu” em Ciência dos Alimentos,
para obtenção do título de ‘Doutor’.

Aprovada em 19 de Dezembro de 2003

- Dr. Mauro dos Santos de Carvalho (UFRJ)
- Dr. Mário César Guerreiro (UFLA)
- Dr. Eduardo Valério de Barros Vilas Boas (UFLA)
- Dr. Luiz Carlos de Oliveira Lima (UFLA)

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan
(Orientadora)

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2003**



À minha mãe, Djanira,

À minha esposa, Maria Aparecida,

Aos meus filhos, Jean e Maria Eduarda,

DEDICO

Em memória de meu pai,

Osvaldo Guimarães,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e vocação profissional.

À orientadora, Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan, pelos ensinamentos, profissionalismo e oportunidade de atuação na linha de pesquisa.

Ao co-orientador, Prof. Dr. Mauro dos Santos de Carvalho (UFRJ), pelas sugestões em todo o trabalho e principalmente pela ajuda constante para a criação do método em cromatografia gasosa.

À co-orientadora, Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli (DCA/UFLA), por se colocar à disposição para esclarecimentos e sugestões pertinentes. Aos membros da banca, Prof. Dr. Mário César Guerreiro (DQI/UFLA), pelo apoio constante, principalmente no conhecimento, aquisição de acessórios e operacionalidade do cromatógrafo gasoso, bem como ao Prof. Dr. Eduardo Valério de Barros V. Boas (DCA/UFLA) e Prof. Dr. Luiz Carlos de Oliveira Lima (DCA/UFLA), pela ajuda e sugestões importantes sobre a fisiologia de pós-colheita da banana.

Ao Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu (DCA/UFLA), pelo empréstimo da coluna cromatográfica.

Ao amigo Élson Luiz R. de Souza, chefe do Laboratório Federal de Análise de Bebidas em Andradas, MG, e demais funcionários, pela receptibilidade e ensinamentos durante o estágio concedido.

À Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso (DQI/UFLA), por colocar à disposição o Laboratório de Análise de Bebidas, e a Técnica de Laboratório Cleusa de Fátima S. Ribeiro, para auxílio na realização de várias análises na aguardente de banana, pelo Método Oficial do Ministério da Agricultura.

Aos componentes da Assembléia Departamental (Departamento de Química da UFLA), representados pelo Prof. Dr. Ruy Carvalho, bem como aos

demais setores responsáveis da Universidade Federal de Lavras, pela liberação parcial, objetivando a realização deste curso.

Aos Departamentos de Biologia e Química da UFLA, que tornou possível a realização dos experimentos.

Ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela aceitação no curso, ensinamentos, auxílios profissionais e muitas amizades.

Ao Departamento de Química, em nome de todos os professores, secretárias (Vera Lúcia, Miriam, Andréia e Andressa) e técnicos de laboratório (Wilson, Marcelo, Liége, Joalis, Cleusa, Marli, Xulita e Leone), pela boa convivência como companheiros de trabalho por vários anos e auxílios profissionais nas análises pertinentes a este trabalho de pesquisa.

Pela ajuda no Laboratório de Microbiologia (DBI/UFLA), as amigas Cidinha e Ivanir. Na secretaria, à amiga Magda.

Aos funcionários da Biblioteca da UFLA, pela atenção e auxílios constantes nas várias consultas bibliográficas.

Ao meu amigo Valery, pela dedicação em auxiliar-me na condução dos experimentos.

À aluna Júlia, do curso de Química (DQI/UFLA), pelo auxílio nas injeções de amostras no cromatógrafo.

Aos meus irmãos, cunhados, sobrinhos e sogros, que são meus pontos de referência.

À vizinha Maria em Itutinga, pelo apoio e amizade para com minha esposa e filhos, bem como à Marcela Aparecida.

Aos meus colegas em Lavras, José Maria, Eliane (incluindo irmãos), bem como ao Cláudio Alves Moreira, com sua esposa Clédina e filhos.

Ao meu grande amigo, Domingos Sávio de Mesquita (UFLA) e familiares, pela amizade permanente.

SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Cultura da banana.....	3
2.1.1 Aspectos econômicos.....	3
2.1.2 Colheita e pós-colheita.....	3
2.1.3 Industrialização.....	6
2.2 Bebidas alcoólicas fermentadas e destiladas.....	11
2.3 Processos fermentativos.....	12
2.4 Inóculo.....	13
2.4.1 Fermento natural.....	16
2.4.2 Fermento selecionado.....	17
2.4.3 Contaminações microbianas.....	19
2.5 Metabólitos produzidos na fruta e durante a fermentação.....	21
2.5.1 Glicerol e ácido succínico.....	23
2.5.2 Aldeído acético.....	24
2.5.3 Ácido acético e outros ácidos.....	25
2.5.4 Álcoois superiores.....	26
2.5.5 Metanol.....	27
2.5.6 Ésteres.....	29
2.6 Qualidade de bebidas alcoólicas.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Processo de produção da aguardente de banana.....	37
3.1.1 Fluxograma do processo produtivo.....	39

3.1.2	Preparação do mosto.....	40
3.1.3	Tratamento enzimático.....	40
3.1.4	Inoculação da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CA-1174.....	41
3.1.5	Filtração com prensagem.....	41
3.1.6	Reutilização do inóculo.....	42
3.1.7	Destilação.....	42
3.2	Análise da polpa, caldo de banana e torta de filtro.....	44
3.3	Avaliação do processo fermentativo.....	47
3.3.1	Avaliação populacional do inóculo e parâmetros fermentativos.....	47
3.3.2	Metabólitos químicos analisados durante as fermentações e nos destilados.....	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1	Processo de produção da aguardente de banana.....	51
4.1.1	Análise da polpa, caldo-de-banana e torta de filtro.....	51
4.1.2	Tratamento enzimático.....	54
4.2	Avaliação do processo fermentativo.....	54
4.2.1	Acompanhamento microbiológico e parâmetros fermentativos.....	57
4.2.2	Metabólitos analisados durante as fermentações.....	60
4.2.3	Rendimento e análise da bebida.....	63
5	CONCLUSÕES.....	70
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

RESUMO

GUIMARÃES FILHO, OSWALDO. **Avaliação da produção artesanal da aguardente de banana utilizando *Saccharomyces cerevisiae* CA-1174**. Lavras: UFLA, 2003. 82 p. (Tese - Doutorado em Ciências dos Alimentos)*

A banana é a fruta de maior produção e comercialização em todo o mundo, entretanto, são altos os índices de perdas, chegando a 40% no Brasil, o segundo maior produtor mundial. Um dos procedimentos para se evitar desperdício é a utilização da fruta na composição de diversos produtos, dentre estes a aguardente de banana. Em diversos países a fabricação e consumo de aguardente de fruta ou *brandy* de fruta são muito populares e no Brasil, apesar de ter-se conhecimento da produção da aguardente de banana, o número de trabalhos científicos sobre o tema é quase inexistente. O objetivo deste trabalho foi o de fornecer subsídios ao desenvolvimento de uma tecnologia adequada à produção desta aguardente pela fermentação de banana 'Nanicão', de baixo valor comercial, devido ao estágio avançado de amadurecimento e/ou injúrias, estabelecendo padrões de qualidade para o produtor e de segurança para o consumidor. Os experimentos foram montados em um alambique experimental, localizado em Lavras, situado no Sul de Minas Gerais, Brasil. Foi utilizado o sistema de fermentação em três bateladas sucessivas, com reutilização do inóculo inicial de *Saccharomyces cerevisiae* CA-1174. O tempo total de fermentação foi de 72 horas, durante os quais efetuaram-se análises em cromatografia gasosa, visando fazer o acompanhamento dos principais metabólitos produzidos. Na bebida, adotou-se o mesmo procedimento de análises, por cromatografia gasosa e pelo Método Oficial do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAAb). Metanol e acetaldeído encontraram-se com maiores concentrações no início da fermentação, declinando ao longo do processo, enquanto os álcoois superiores ocorreram com aumentos crescentes até 24 horas, mantendo-se constante até o final. A levedura utilizada propiciou um rendimento médio de aguardente de 66,52% em relação ao rendimento teórico, porém, a presença de álcoois superiores e metanol, acima da concentração máxima permitida pela legislação sugere pesquisas futuras.

*Comitê Orientador: Dra. Rosane Freitas Schwan - UFLA (Orientadora), Dr. Mauro dos Santos de Carvalho - UFRJ, e Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli - UFLA.

ABSTRACT

GUIMARÃES FILHO, OSWALDO. **Evaluation of the artisanal production of the banana brandy by utilizing *Saccharomyces cerevisiae* CA-1174.** Lavras: UFLA, 2003. 82 p. (Thesis - Doctorate in Food Sciences)*

Banana is the fruit of greatest production and all over the world commercialization, nevertheless, the loss indices are high, reaching 40% in Brazil, the second greatest worldwide producer. One of the procedures to avoid losses is the use of the fruit in the composition of a number of produces, among these the banana brandy. In several countries, the manufacture and consumption of fruit brandy are very popular and in Brazil in spite of having knowledge of the production of the banana brandy, the number of scientific papers about the subject is almost non-existent. The objective of this work was to give subsidies to the development of the better technology for the production of a brandy produced by the fermentation of “Nanicão” banana, which is of low commercial value due to the advanced ripening stage and/or injuries, establishing quality standards for the producer and of safety for the consumer. The experiments were set up in an experimental Alambique situated in Lavras, situated in Southern Minas Gerais, Brazil. The fermentation system in three successive batches with re-utilization of the initial inoculum of *Saccharomyces cerevisiae* CA-1174 was utilized. The total time of fermentation was of 72 hours, during which gas chromatography analyses were performed aiming to do the follow-up of the main metabolites produced was performed. In the beverage, the same analysis procedure through gas chromatography and by the Official Method of the Ministry of Agriculture and Supply (OMMAS) was adopted. Both methanol and acetaldehyde were at the highest concentrations at the start of the fermentation, decreasing along the process, whilst higher alcohols occurred with growing increases till 24 hours, keeping themselves constant up to the final. The yeast utilized provides an average brandy yield of 66.52% relative to the theoretical yield, but, the presence of higher alcohols and methanol above the maximum concentration allowed by law, suggests further research.

*Guidance Committee: Dra. Rosane Freitas Schwan - UFLA (Adviser), Dr. Mauro dos Santos de Carvalho - UFRJ and Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli - UFLA.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de banana, sendo a maioria da produção brasileira consumida no mercado interno na forma in natura e apenas uma pequena porcentagem é destinada à fabricação de produtos industrializados. Grande parte da produção brasileira de banana é perdida, cerca de 40%. Estas perdas geralmente ocorrem no período de colheita e pós-colheita, tornando-se notória a falta de melhor aproveitamento. Uma das maneiras de evitar desperdício de frutas, é geralmente, a sua utilização na composição de doces, geléias, sucos e na produção de bebidas fermentadas e/ou destiladas, a depender das características de cada fruta. Dentre as possibilidades de produção de aguardente de frutas no Brasil, a de banana parece ser uma das mais promissoras, no entanto, necessita de mais estudos.

A aguardente de fruta ou *brandy* de fruta é a bebida alcoólica de 36% a 54% de álcool em volume, a 20°C, obtida do destilado de mosto fermentado de fruta (Brasil, 1997).

A banana, verde ou madura, pode ser utilizada para a fabricação dessa bebida, visto que, quando verde, possui carboidratos armazenados na forma de amido, sendo estes convertidos por hidrólise enzimática natural a açúcares prontamente fermentescíveis, conforme o amadurecimento. Na utilização de banana verde, o amido deverá sofrer quebra por meio de métodos diversos, como químico, enzimático ou calor e pressão.

A bebida destilada tradicionalmente produzida e consumida no Brasil é a cachaça ou a aguardente de cana-de-açúcar. Para a produção desta bebida, os produtores necessitam de instalações próprias que nem sempre são utilizadas durante todo o ano devido à safra sazonal de cana-de-açúcar, período este em que se encontra facilmente bananeira em plena produção. Estas instalações possibilitam o aproveitamento de parte da estrutura e tecnologia produtivas já

existentes, e, em termos, semelhante ao que se deve adotar para a produção da aguardente de banana. O aproveitamento de banana com baixo valor comercial, que não atende aos padrões de qualidade preestabelecidos pelo mercado, como excesso de injúrias, tamanho, coloração, textura e grau de maturação avançado, pode ocorrer com certos critérios na fabricação desta aguardente.

No Brasil existe produção comercial deste destilado, entretanto, o processo fermentativo é realizado de forma empírica, o que reflete na variação da qualidade da bebida fornecida ao consumidor. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi fornecer subsídios para a tecnologia de produção de destilado de banana. Para atingir este resultado, optou-se por direcionar os estudos para os seguintes aspectos:

- estabelecer um processo produtivo adequado para esta bebida, utilizando a banana ‘Nanicão’ de baixo valor comercial, que seria praticamente descartada. Nestas condições é possível reduzir as perdas proclamadas pelo governo;
- avaliar a população e o desempenho fermentativo da levedura inoculada, a *Saccharomyces cerevisiae* CA-1174, bem como os principais metabólitos produzidos durante três fermentações, no sistema de bateladas sucessivas com reutilização do inóculo inicial;
- determinar a composição química da aguardente, buscando associações com os processos anteriores.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cultura da banana

2.1.1 Aspectos econômicos

A banana (*Musa spp.*) é uma das frutas mais consumidas no mundo, sendo bastante explorada na maioria dos países tropicais. No Brasil, segundo Alves et al. (1999b), as condições climáticas de calor constante, precipitações bem distribuídas e elevada umidade, em quase toda a sua área territorial, são favoráveis para a produção de banana, destacando-se as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, grande parte da região Sudeste e alguns microclimas da região Sul.

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de banana (FAO, 2001). Segundo o IBGE (Brasil, 2000), apesar desta fruta ser a de maior produção e comercialização mundial, e com crescimento de 25% entre 1990 e 1999, a participação do Brasil no mercado externo não é significativa, em razão de sua precária estrutura comercial, da baixa qualidade da produção, além da dimensão do mercado interno que absorve a maioria da produção nacional.

O índice tecnológico da bananicultura no Brasil é, em geral, muito baixo, o que resulta em reduzida produtividade e alto índice de perdas, que podem atingir 40%, desde a produção até a mesa do consumidor (Mascarenhas, 1999). Este alto índice de perdas poderia ser mais bem aproveitado na fabricação de diversos produtos, dentre estes, a aguardente de banana.

2.1.2 Colheita e pós-colheita

A época para colheita da banana tem sido motivo de vários estudos, observando-se a época adequada com relação à maturação. De modo geral, o que se adota no Brasil é realizar a colheita dos frutos mais antecipada no seu grau de maturação quanto maior for o tempo necessário para serem transportados do

local de cultivo ao mercado consumidor e quanto mais quente for a estação do ano (Alves et al., 1999a). Segundo Melussi & Kawamoto (1986), o que se recomenda é a colheita da banana 'Nanicão' no estágio verde-maduro, denominado '3/4 gordo', caracterizado por "quinas" longitudinais pouco salientes. Nessa condição, o diâmetro dos frutos encontra-se entre 30 e 36 milímetros, 3 a 5 meses após o "lançamento" do cacho, em função da época do ano.

Na produção da aguardente com frutos maduros, é desejável que estes estejam com o máximo possível do amido já convertido em açúcares fermentáveis. Macêdo (1993) sugere a utilização de bananas com a casca apresentando uma coloração escura, sendo neste ponto maiores seus teores de açúcares fermentáveis. Almeida (1935) comenta que é desejável aguardar a fruta atingir 3/4 de pontuações escuras.

O estágio muito avançado de amadurecimento do fruto aumenta o risco de contaminações microbianas diversas advindas do exterior da casca. Estas contaminações atingem posteriormente a polpa devido às injúrias da casca, uma vez que os frutos nesta fase, com a textura macia, estarão mais propensos e com grande ocorrência de desprendimento do pedicelo das pencas, com exposição aos microrganismos. A presença de microrganismos contaminantes deve ser controlada, reduzindo ao máximo a sua população, visto estes poderem influenciar negativamente na fermentação, afetando drasticamente o rendimento fermentativo. Foi sugerido por alguns autores (Almeida, 1935; Martins et al., 1985; Hammond et al., 1996) o procedimento do cozimento do mosto a 90⁰C durante uma hora, anteriormente à inoculação do pé-de-cuba ou levedura desejada.

De acordo com o índice de cor da United Brands Company, citado por Wills et al. (1998), a banana do subgrupo Cavendish possui 8 estádios diferenciados de amadurecimento, conforme a cor da casca, podendo ser

observados também, na Tabela 1, os respectivos teores de amido e açúcar. O estágio de cor 6 corresponde à banana com excelente qualidade de consumo, mas não para a fabricação da aguardente, que deverá ser o estágio 8.

TABELA 1 Estádios de cor de banana do subgrupo Cavendish e respectivos teores de amido e açúcar durante a maturação.

Estádios	Cor da casca	Valores aproximados (%)	
		Amido	Açúcar
1	Verde	20,0	0,5
2	Verde com traço amarelo	18,0	2,5
3	Mais verde do que amarela	16,0	4,5
4	Mais amarela do que verde	13,0	7,5
5	Amarela com ponta verde	7,0	13,5
6	Totalmente amarela	2,5	18,0
7	Amarela levemente mosqueada de marrom	1,5	19,0
8	Amarela com grandes áreas marrons	1,0	19,0

Fonte: Wills et al. (1998).

O amido é composto quimicamente pelas moléculas de amilose e amilopectina. Na hidrólise enzimática natural do amido produzem-se, além de dextrina, maltose e glicose (Reguly, 1996).

Existem evidências de que a hidrólise do amido e a conversão de açúcares durante o amadurecimento da banana ocorrem de forma homogênea, no entanto, em estudos realizados por Bassinello et al. (1999), com a banana

‘Nanicão’, ficou demonstrado existirem diferenças quantitativas de amido na região central e periférica do fruto, com maiores quantidades apresentadas na região periférica, refletindo em maiores ou menores teores de sacarose conforme a localização. Com relação às duas enzimas estudadas, a sacarose-fosfato sintase (SPS) e a sacarose sintase (SS), elas aparentemente se localizam de forma homogênea por toda a polpa, e as colorações desenvolvidas na casca são coerentes com a variação de atividade destas enzimas durante o amadurecimento.

Segundo Bleinroth (1990), outro índice que pode indicar o grau de maturação da banana é a relação polpa/casca. Durante o processo de maturação da banana após a colheita, ocorre aumento de peso da polpa, devido à maior absorção da água proveniente da casca e do engaço (Lizada et al., 1990). Almeida (1935) já utilizava este índice para estudos destinados à fabricação do álcool e aguardente de banana, observando, em média, para cinco cultivares diferentes de banana madura, uma relação polpa/casca de 1,6. Segundo Chitarra & Chitarra (1994), a variação desta relação para banana verde e madura é de 1,2 e 2,0, respectivamente. Contudo, segundo citações de Lichtemberg (1999), outros aspectos deverão ser considerados. Quando o cacho é colhido em estádios de desenvolvimento dos frutos mais precoces, anteriores a ‘3/4 gordo’, estes rendimentos que estão em torno de 70% passam a ser comprometidos, podendo ser de 65% ou menos. Isto pode representar uma relação polpa/casca inferior a 1,85 para a banana do subgrupo Cavendish.

2.1.3 Industrialização

A produção brasileira de banana é quase totalmente consumida na forma in natura. Apenas um percentual inferior a 2% é utilizado para a fabricação de produtos industrializados, a exemplo do purê, doce, banana-passa, flocos, farinha, chips e vinagre, sendo as cultivares do subgrupo Cavendish as mais

adaptadas para a industrialização. As exportações brasileiras de produtos industrializados de banana representam uma fração pouco expressiva em relação ao comércio da fruta in natura (Souza & Torres Filho, 1999). Como fruto tropical, a banana é susceptível ao congelamento lento, decorrendo em amolecimento durante o descongelamento; contudo, ela pode ser utilizada em forma de polpa para a produção da aguardente. Com relação ao conteúdo de açúcar, segundo Torija et al. (1998), o armazenamento de banana congelada por 12 meses não apresentou alteração significativa.

Para a fermentação alcoólica de banana, a sugestão é a utilização apenas da polpa, visto a casca contribuir com pequena quantidade de açúcar e constituir-se de fonte de contaminações por microrganismos e eventuais defesivos residuais utilizados no processo de produção (Martins et al., 1985). No entanto, no uso da casca, esta deve passar pelo processo de sacarificação para melhorar o rendimento.

Tewari et al. (1986) constataram que o melhor resultado no rendimento de álcool a partir de casca de banana foi obtido por meio de sacarificação enzimática, comparativamente à sacarificação ácida por calor e pressão. A enzima celulase utilizada foi extraída a partir do fungo *Trichoderma reesei* QM 9414. A casca desidratada que continha, respectivamente, $31 \text{ mg} \cdot \text{g de amido}^{-1}$, $205 \text{ mg} \cdot \text{g de celulose}^{-1}$ e $255 \text{ mg} \cdot \text{g de açúcar}^{-1}$, inicialmente, apresentou-se com $224 \text{ mg} \cdot \text{g de açúcar}^{-1}$ ao final da sacarificação enzimática. Foram obtidos $150 \text{ mL de álcool} \cdot \text{kg}^{-1}$ de casca de banana desidratada (65°C por 48 horas). Na produção de álcool etílico de banana, pelo uso das enzimas alfa amilase ($0,1\% \text{ p} \cdot \text{p}^{-1}$) e a glucoamilase ($0,1\% \text{ p} \cdot \text{v}^{-1}$), com rendimento de polpa de 71%, Hammond et al. (1996) obtiveram os seguintes valores de álcool etílico a partir de 1 kg da fruta: 6 mL com a utilização apenas da casca, 82 mL com a polpa e 91 mL usando o fruto inteiro, sendo considerado baixa a produção de álcool etílico a partir da casca quando comparada ao fruto inteiro.

Na industrialização da banana, o uso de enzimas é freqüente visando basicamente o clareamento e a redução da viscosidade. Nogueira & Torrezan (1999) citam a utilização da enzima pectinolítica comercial na proporção de 0,05% ($p \cdot p^1$), juntamente com o inóculo de levedura, visando à clarificação do vinho e também para aumentar o rendimento da fermentação alcoólica destinada à produção de vinagre. Segundo Cardoso et al. (1999), existe uma grande oscilação com relação à concentração da enzima pectinolítica a ser adotada para a fabricação de suco de banana.

Têm sido realizadas tentativas com a utilização de enzimas associadas, para a produção do álcool de banana (verde e madura). Hammond et al. (1996) utilizaram dois tipos de enzima, sendo uma alfa amilase ($0,1\% p \cdot p^1$) e a glucoamilase ($0,1\% p \cdot v^{-1}$), sendo mencionada pelos autores a utilização do dobro da dosagem recomendada pelo fabricante. Estes autores concluíram ter havido influência positiva destas enzimas, tanto na fermentação com a banana madura, quanto nas fermentações de banana verde, sendo bem mais significativo na última situação.

Pheentaveerat & Amprung (1993) observaram sinergismo de atividade enzimática no aumento da diminuição da viscosidade do suco de banana madura, após incubação com $0,06\% p \cdot p^1$ de celulasas e $0,05\% p \cdot p^1$ de pectinase a 45°C , por 2 horas. Porém, amilases não mostraram atividades na redução da viscosidade e, conseqüentemente, não aumentando o rendimento do suco em relação à polpa. Este resultado era de se esperar, uma vez que as amilases atuam sobre o amido e, neste caso, a fruta totalmente madura não tem mais amido ou, se tem, é cerca de 1% a 2%; mas, as pectinas permanecem um pouco mais, embora tenham uma elevada atividade da enzima poligalacturonase que estaria atuando naturalmente na fruta.

Os teores de pectina, amido, xilana e glucana decrescem durante o processo de amadurecimento da banana, devido ao concomitante aumento da

atividades das enzimas poligalacturonase, α -manosidase, β -galactosidase, amilases, celulasas e hemicelulasas (Prabha & Bhagyalakshmi, 1998). Os mesmos autores, através da marcação do carbono 14 constataram que mais de 80% do amido degradado era convertido à açúcares solúveis, passando de 1,8% para 19% na polpa, e microscopicamente, observaram menor integridade da parede celular, redução dos espaços intercelulares, diminuição da espessura da parede celular, desagregação de células e desaparecimento dos grânulos de amido. Pectinases foram mais eficientes no amolecimento que as celulasas, contudo, outras enzimas como amilase e xilanase também contribuíram para o desagregamento de estruturas celulares.

Segundo Ly-Nguyem et al. (2001), a pectinametilsterase do morango foi mais resistente ao tratamento com alta pressão do que de laranjas e bananas. Em plantas esta enzima é encontrada na parede celular, por interação eletrostática. Na catálise de esterificação do metil éster do polímero de ácido poligalacturônico, forma o ácido pectico e o metanol. No tratamento térmico, a pectinametilsterase do morango foi comparada à encontrada na laranja, porém, menos estável termicamente que a de banana.

Tocchini & Lara (1977) testando a eficiência de quatro enzimas pectinolíticas visando redução da viscosidade para a produção do suco de banana do subgrupo Cavendish, concluíram que a enzima pectinolítica Ultrazym 100 Special® da Ciba-Geigy Química S.A, foi a que propiciou os melhores rendimentos, reduzindo a viscosidade em 92%. A concentração adotada da enzima foi de 0,05% por 10 minutos de atuação a 30^o C e a pH 4,7.

Segundo Goswami & Borthakur (1996), durante o desenvolvimento do fruto a enzima alfa glucana fosforilase relacionada a síntese do amido apresentou-se estável, enquanto a fosfatase ácida declinou constantemente.

Cardoso et al. (1999) observaram 61,1% v · ρ ¹ de rendimento de suco a partir de purê de banana do subgrupo Cavendish utilizando a enzima

pectinolítica Clarex[®], contra 50,31% v · p⁻¹ para enzima pectinolítica CECI - CTAA[®]. Ambas as enzimas foram utilizadas na concentração de 0,03% a 40°C por um período de 15 minutos e, posteriormente, centrifugadas a 4.000 rpm a 30°C por 1,5 minuto.

Na fabricação da cerveja de banana, Dupaigne (1974) cita que o uso de 0,25% a 1% de cal é suficiente para precipitar as pectinas sob a forma de grânulos de pectato de cálcio, fator importante para a precipitação dos colóides; contudo, há necessidade de utilizar ácido sulfúrico para estabelecer o pH. Os grânulos de pectatos e de sulfato de cálcio foram retirados em 80% com a centrifugação e 88% em filtração com prensagem, utilizando, para ambos, a quantidade de 0,5% de cal viva. Feito isso, o material esteve pronto para a fermentação.

Mumyanganize & Coppens (1974) estudaram a extração do suco de banana com adição de cal na polpa, seguida de neutralização com ácido sulfúrico a 3 mol · L⁻¹ até o pH original. O óxido de cálcio, ao agir nos grupos carboxílicos livres da molécula de pectina, provoca a formação do pectato de cálcio com redução da viscosidade da polpa, permitindo assim obter sucos por prensagem ou centrifugação. A adição da cal eliminou a pectina do suco e, em concentrações menores que 1%, não determinou odores. Comparando-se o rendimento obtido, a separação por centrifugação variou entre 65% a 77% e, com a prensagem, entre 82% a 88%. Mumyanganizi & Coppens (1976), quando compararam o rendimento obtido com o uso da cal e com enzimas, observaram 88% de rendimento com o emprego da enzima e de 82% com a cal.

2.2 Bebidas alcoólicas fermentadas e destiladas

De acordo com a legislação atual (Brasil, 1997), bebida alcoólica é aquela que apresenta, em sua composição, teor alcoólico superior a 0,5% em volume de álcool etílico a 20⁰C e não alcoólica aquela que é isenta ou apresenta teor alcoólico inferior a 0,5%, sendo assim classificadas (Tabela 2).

Com relação à preferência do mercado consumidor brasileiro para as bebidas alcoólicas, segundo Crispim et al. (2000), a cerveja é a preferida, com 66% da preferência, seguida da aguardente de cana-de-açúcar ou cachaça, com 18%; o conhaque e o uísque com 5% cada; os vinhos, com 4% e a vodka, com 2%. A quantidade de 18% para a cachaça é um valor muito expressivo, considerando o teor de álcool etílico em torno de 8 vezes, em média, superior ao da cerveja.

TABELA 2 Classificação das bebidas alcoólicas e não alcoólicas

Não alcoólicos		Alcoólicos			
Acéticos	Não fermentados e não alcoólicos	Fermentados alcoólicos	Destilados	Destilados retificados	Alcoólicos por misturas
Vinagre	Água gaseificada, preparados para refrigerantes, sodas, sucos, xaropes e néctares de frutas.	Cerveja, fermentados de cana, fermentados de frutas, hidromel, vinho de uva, saquê e sidra.	Aguardente de cana, aguardente de frutas ou brandy de frutas, conhaque, grappa, cachaça, aguardente de melado, pisco, rum, tequila, uísque e aguardente de cereais.	Vodka, gin, genebra, steinhaeger, aquavit ou acquavita e corn ou korn.	Aguardente composta, amargos, aperitivo alcoólico misto, licor e batida.

Fonte: Brasil (1997)

Diferentemente dos norte-americanos e dos europeus, entre os brasileiros as aguardentes de frutas são pouco difundidas. Em Uganda, segundo Mwesigye & Okurut (1995), a bebida mais tradicional é um fermentado feito de banana (6% -11% de álcool $v \cdot v^1$). No Brasil, existe mercado em potencial, visto ser um dos maiores mercados mundiais de bebidas destiladas. A Associação Brasileira de Bebidas aponta o Brasil com um consumo *per capita* de aguardente de 11 litros/habitante, superando países tradicionalmente consumidores, a exemplo da Alemanha, Hungria e Polônia, os quais ficam na faixa entre 9 a 10 litros/habitante/ano (SEBRAE, 2001).

2.3 Processos fermentativos

O processo fermentativo consiste na transformação dos açúcares existentes em álcool etílico, ocorrendo a formação intensa de gás carbônico. Para cada molécula de etanol produzida ocorre a formação de uma molécula de gás carbônico. Entretanto, a depender de como esta transformação é realizada, pode-se obter maior ou menor quantidade de aguardente e produto de melhor ou pior qualidade (Schwan & Castro, 2001).

Os tipos de processos fermentativos podem ser agrupados sob três pontos: em função de sua condução, podendo ser descontínua (fermentação em batelada) ou contínua; em função do modo de cultivo e desenvolvimento do agente microbiano (processos de superfícies ou submersos) e, ainda, em função do suprimento de oxigênio, quando aerados ou não (Reguly, 2000).

Os processos de fermentações descontínua e contínua são os mais utilizados em fermentações alcoólicas. Abordando este aspecto, Schwan & Castro (2001) subdividem estes processos fermentativos em três sistemas diferentes: convencional em batelada, descontínuo-alimentado e contínuo, conforme o tipo de indústria. O convencional é o comumente adotado pelos produtores de aguardente artesanal e consiste em colocar o inóculo e todo o

meio a ser fermentado, juntos, na dorna de fermentação. O processo fermentativo ocorre em aproximadamente 24 horas. Após este período, o fermentado é destilado e o inóculo descartado. Este método interfere significativamente no metabolismo das leveduras pelo fato delas ficarem expostas a quantidades relativamente altas de etanol. No sistema de bateladas sucessivas ocorre o aproveitamento do fermento (inóculo) em várias fermentações subsequentes. No sistema descontínuo alimentado, a dorna é alimentada aos poucos, de modo que mantenha o teor de açúcar preestabelecido e inferior ao utilizado no sistema de batelada. No processo contínuo, alimenta-se a dorna com fluxo contínuo de substrato, em concentração conveniente e retira-se, também de forma contínua, parte do líquido a ser destilado.

Segundo Yokoya (1995), geralmente os processos adequados para grandes unidades não se adaptam às pequenas fábricas por serem sofisticados demais, necessitando de investimentos maiores e controles elaborados não condizentes com pequenos produtores.

2.4 Inóculo

Anteriormente à escolha e à preparação do inóculo a ser utilizado para a fermentação da aguardente de banana, é necessário caracterizar a composição química desta fruta e aproveitar parte da tecnologia de produção da aguardente de cana, objetivando estabelecer as condições para o desenvolvimento do inóculo, bem como o entendimento da origem dos produtos primários e secundários que poderão ser produzidos durante a fermentação.

Segundo Nogueira & Torrezan (1999), a composição química da banana varia de acordo com cada cultivar. Na Tabela 3 são apresentados valores de composição, principais minerais e vitaminas presentes em algumas cultivares de banana. A cultivar 'Nanicão' é uma mutação da cultivar 'Nanica'; ambas são pertencentes à mesma classificação botânica, qual seja, cultivar AAA, subgrupo

Cavendish. A banana possui altos teores de açúcares, principal matéria-prima da fermentação e, segundo Medina et al. (1998), foi observado para a banana ‘Nanicão’ um teor de sólidos solúveis de 24,1 °Brix , sendo estes constituídos principalmente de açúcares, como sacarose, glicose e frutose.

TABELA 3 Composição química de cinco cultivares de banana

Composição	Cultivares				
	Nanica	Maçã ²	Ouro ¹	Prata ²	Da terra ²
Umidade (%)	75,60	-	59,40	74,80	66,20
Carboidratos (%)	21,60	26,44	36,80	21,60	29,00
Proteína (%)	1,20	1,44	2,39	2,30	2,60
Lipídios (%)	0,20	0,25	0,20	0,20	0,20
Fibras (%)	0,60	-	0,40	0,30	0,90
Cinzas (%)	0,80	-	-	-	-
Minerais (mg · 100g ¹)					
Potássio	373,00	-	-	-	-
Fósforo	28,00	27,00	28,00	31,00	32,00
Cálcio	8,00	30,00	8,00	9,00	23,00
Ferro	0,60	0,60	0,60	0,60	0,10
Vitaminas (em 100g)					
A (UI)	250,00 a 335,00	50,00	-	-	-
B1 (µg)	42,00 a 54,00	48,00	-	79,00	34,00
B2 (µg)	88,00	30,00	-	90,00	-
C (mg)	10,00 a 11,00	12,70	9,40	17,30	14,10

Fonte: ²Motta & Motta (1958); ¹Medina (1985)

Hardisson et al. (2001), em trabalho realizado na Espanha, observaram que a composição mineral da banana *Musa acuminata* variou conforme a área geográfica. Segundo Goswami & Borthakur (1996), a composição mineral e a atividade das enzimas (fosfatase ácida, alfa glucana fosforilase e polifenol oxidase), na banana (*Musa* ABB) 'Kachkal' variaram em função do período de desenvolvimento do fruto. Entre 37 a 65 dias, as concentrações de minerais e a enzima fosfatase ácida foram maiores em estágios mais precoces, declinando durante o desenvolvimento. O inverso ocorreu para a enzima alfa glucana fosforilase, envolvida na síntese de amido. Apesar de ter ocorrido redução dos componentes fenólicos durante o desenvolvimento, esta redução não mostrou correlação positiva com a atividade da enzima polifenol oxidase.

Com relação ao inóculo, na produção de cachaça artesanal e mesmo para a aguardente de banana, a fermentação é iniciada a partir da adição do inóculo (pé de cuba) ao caldo na dorna de fermentação. O inóculo é preparado segundo técnicas regionais práticas ou observando-se tecnologia apropriada com fermentos selecionados. Para que o processo fermentativo se realize com a velocidade desejada, com duração média em torno de 24 horas para a cachaça, faz-se necessária a multiplicação inicial do inóculo. Segundo Crispim et al. (2000), há necessidade de cerca de 2×10^8 células \cdot litro⁻¹ de caldo de cana-de-açúcar para que ocorra uma boa fermentação, sendo este número conhecido como número limite de Brawn. Para se chegar a este número é necessário preparar o pé-de-cuba, que deve representar, no máximo, 20% v \cdot v¹, do volume total a ser fermentado.

Segundo Almeida (1935), durante a fermentação do mosto na aguardente de banana, ocorre a formação de um "chapéu" (camada mais compacta) na parte superior, o qual deverá ser revolvido com frequência, para evitar que a parte exposta se acidifique. A fermentação continuará até que o "chapéu" decante. Quando se utiliza banana verde, o tempo de fermentação pode ser mais

demorado, em torno de 72 horas, em função da degradação das dextrinas. Este tempo de fermentação é condizente como observado por Hammond et al. (1996), para a fabricação de etanol com banana verde e madura. Existem três maneiras de se iniciar o processo fermentativo, conforme as modificações necessárias para atender às peculiaridades do local: fermento natural, fermento selecionado e o fermento biológico utilizado na panificação, devendo-se evitar a utilização deste último, devido à não especificidade para bebidas alcoólicas, principalmente em função da baixa resistência ao etanol.

2.4.1 Fermento natural

Fermento natural consiste no chamado fermento caipira ou fermento selvagem, no qual os microrganismos que irão atuar no processo fermentativo são oriundos da superfície da matéria-prima, passando para a parte líquida formando a microbiota do mosto. Contudo, podem aparecer outros microrganismos contaminantes oriundos de várias fontes, tanto bactérias, a exemplo de bactérias lácticas, bem como leveduras oxidativas, indesejáveis ao processo.

Segundo Pataro et al. (2002), durante o processo artesanal, os produtores preparam receitas próprias do fermento iniciador, principalmente adicionando fubá de milho e farelo de arroz ao caldo de cana. Esta mistura é deixada por 5 a 20 dias sob intensa aeração, em recipientes separados ou na própria dorna, visando o desenvolvimento da microbiota fermentadora. É recomendável nesta fase que o teor de açúcar não seja superior a 2% - 3% ($p \cdot v^1$), já que concentrações maiores prejudicam a respiração da célula, indispensável para um crescimento populacional eficiente. Segundo Schwan & Castro (2001), durante a fase de multiplicação da levedura, o caldo deve ser bem diluído para evitar a fermentação, devendo-se, portanto, aumentar gradativamente a concentração do açúcar à medida que a massa celular atingir nível considerado adequado ao

processo. Esse aumento de açúcar inibe a multiplicação celular, iniciando-se, assim, a fase fermentativa, sendo esse processo chamado de “efeito Crabtree”. Nesta etapa, o teor máximo tolerado pela levedura é em torno de 15% ($p \cdot V^1$).

O caldo de cana é pobre em proteínas e sais minerais e rico em energia. Dessa forma, Rodrigues Filho & Oliveira (1999) também adotam o complemento do pé-de-cuba com fubá de milho integral e farelo de arroz, na proporção de 6 kg e 1 kg, respectivamente. Os autores recomendam que todo cuidado deve ser observado na adição destes produtos, pois o excesso de fubá aumenta a produção de metabólitos secundários e o excesso de farelo de arroz diminui esses metabólitos durante a fermentação. No mosto de banana, deve-se considerar que o teor de nutrientes é diferente, principalmente com relação a proteínas e concentração de potássio, sendo superior ao da cana-de-açúcar, possivelmente podendo ser dispensada a adição de fubá de milho e farelo de arroz na fase de multiplicação do inóculo, como é normalmente utilizado para a cachaça artesanal.

2.4.2 Fermento selecionado

Usualmente são isolados microrganismos a partir de fontes naturais (plantas, solo, frutas) que apresentam boas características de fermentação. Este processo consiste em selecionar aquelas leveduras com boas características fermentativas, por meio de isolamento em culturas puras e testes fermentativos.

No Brasil, os fermentos selecionados estão disponíveis em algumas instituições de pesquisas, visando atender ao setor sucro-alcooleiro e mesmo para a produção de aguardente. Naturalmente, cada fermento selecionado apresenta suas características próprias e a escolha mais apropriada depende da necessidade de cada usuário ou situações específicas, como resistência à maior concentração de álcool, tolerância a temperaturas elevadas, maior velocidade de fermentação, sedimentação mais rápida após término da fermentação e mesmo

menor acidez e boas propriedades sensoriais, aspectos importantes na fabricação de bebidas.

O emprego de cepas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* que persistem e dominam a fermentação é imprescindível para a obtenção de cachaça de qualidade. Esta qualidade bem como o aumento na eficiência do processo produtivo passam, necessariamente, pela seleção de uma ou mais leveduras apropriadas ao processo (Pataro et al., 2002; Campos, 2003).

Segundo Schwan & Castro (2001), durante a fermentação da cachaça em destilaria do Sul de Minas Gerais, ocorrem várias sucessões de leveduras. Apesar de em cada batelada haver entrada de leveduras oriundas do meio ambiente, as populações de leveduras em termos de espécies foram estáveis durante quatro meses, sugerindo uma forte pressão fisiológica e ecológica para a sua manutenção. A espécie *Saccharomyces cerevisiae* foi predominante. Pataro et al. (2002) citam que várias linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas em alambiques de Minas Gerais estão depositadas nas coleções de leveduras do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e no Laboratório do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Estas linhagens foram identificadas por testes tradicionais e moleculares; muitas desta já foram submetidas a testes fermentativos e até mesmo no âmbito da produção comercial.

Segundo Schwan et al. (2001), de oito cepas de *Saccharomyces cerevisiae* da coleção do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da UFLA que sobressaíram em testes fermentativos, três predominaram por 26 dias dominando o processo em fermentação espontânea de caldo de cana de açúcar em produção semi-industrial. Estas cepas, quando submetidas a testes em alambique comercial por um período de dois anos consecutivos, foram resistentes à competição com a microbiota naturalmente

existente, incluindo cepas selvagens de *Saccharomyces cerevisiae*, decorrendo em aumento na produtividade e na qualidade da bebida produzida, principalmente em relação aos teores de acidez e concentração de álcoois superiores. Em testes comparativos finais entre estas três cepas, realizados por Campos (2003), ficou demonstrada a superioridade da cepa selecionada CA-116, sendo portanto, indicada para os produtores da região do Sul de Minas Gerais, Brasil.

2.4.3 Contaminações microbianas

Os microrganismos contaminantes na fermentação alcoólica podem ser bactérias ou outras espécies de leveduras que alteram o processo fermentativo. Segundo Amorim & Oliveira (1981), os efeitos prejudiciais dos contaminantes implicam em diminuição da produção de álcool. Esta redução pode ser causada por vários motivos, tais como consumo de açúcar, consumo de álcool produzido, morte de células de leveduras por toxinas ou excesso de ácido produzido e, ainda, perdas ou inviabilidade de células de leveduras, causadas pela floculação do fermento devido à “goma” produzida pelas bactérias.

Cabrini & Gallo (1999) definem como leveduras contaminantes aquelas presentes no processo fermentativo, que não seja a levedura selecionada para o processo de fermentação alcoólica.

A origem das leveduras é bastante diversa, uma vez que as mesmas são encontradas amplamente na natureza, podendo estar presentes em folhas, flores, frutos, cascas, grãos de cereais e outros substratos contendo açúcares (Kurtzman & Fell 1998).

Nascimento (1994), estudando 623 linhagens de leveduras isoladas de frutas, caldo e mosto de usinas produtoras de álcool, no aspecto relacionado à produção de fator *killer* (toxina produzida por microrganismos, como mecanismo de antagonismo), conseguiu linhagens identificadas como

Saccharomyces cerevisiae capazes de matar as leveduras comerciais Fleischmann® e Itaiquara®. Isto é relevante, visto que muitos produtores adotam estes fermentos comerciais, na tentativa de se ter um fermento selecionado e padronizado. Contudo, os mesmos poderão sofrer pressão de seleção, dominando a fermentação por períodos curtos.

Para a aguardente de cana, Maia et al. (1993) citam as leveduras dos gêneros *Candida*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* e *Cryptococcus*. Schwan et al. (2001) identificaram 443 leveduras em alambiques comerciais do Sul de Minas Gerais, confirmando a predominância da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, mas, em algumas fermentações, ocorreu a predominância das espécies de *Rhodotorula glutinis* e *Candida maltosa*.

Morais et al. (1997) identificaram microbiota de leveduras semelhantes. Parece haver grande variedade de microrganismo no mosto do caldo de cana, contudo, o grupo da espécie *Saccharomyces cerevisiae* é predominante e se destaca em sua maioria, mesmo com a ocorrência de alternância de espécies de leveduras.

Segundo Maia et al. (1993), entre as bactérias, as espécies *Leuconostoc dextranicum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Streptococcus spp* se destacam como contaminantes da fermentação da aguardente de cana. Os microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica com capacidade deteriorante são restritos a poucos gêneros. Isto se deve ao fato desse ambiente ser altamente seletivo, permitindo o desenvolvimento apenas dos microrganismos resistentes a valores elevados de etanol e a pH baixo.

Em análise de vinhos comerciais, Edwards et al. (1993) conseguiram isolar várias espécies de *Lactobacillus* e, por simulação em placas com variação na quantidade de álcool, algumas espécies, dentre estas o *Lactobacillus plantarum* suportaram até 10% de álcool ($v \cdot v^{-1}$).

Segundo Oliva Neto (1990), o grupo das bactérias láctica é o mais freqüentemente encontrado e adaptado às condições das dornas de fermentação das destilarias de álcool, sendo este o grupo que mais compromete o rendimento fermentativo, por permanecer até o final do processo, interferindo no desempenho das leveduras. O gênero *Leuconostoc*, apesar de contaminar a fermentação alcoólica (oriundo do caldo de cana), raramente chega a causar grandes prejuízos, devido à sua baixa resistência relativa ao etanol. Kaji (1989) simulou a fermentação mista entre leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e as bactérias *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroide subsp. mesenteroide*. Nesta pesquisa, utilizando-se semeadura em placa, apenas os *Lactobacillus* juntamente com leveduras puderam ser recuperados, sendo a morte do *Leuconostoc* atribuída ao efeito inibitório do etanol.

2.5 Metabólitos produzidos na fruta e durante a fermentação

Em estudos realizados com o uso da cromatografia gasosa, por Cano et al. (1997), foi possível identificar as seguintes substâncias em banana: butano 2,3 diona, acetato de etila, 2-pentanona, etanol, 1-butanol, hexanol, acetato de isoamíla, 1-pentanol, acetado de hexila, heptanal, 1-hexanol, butanoato de hexila, octanal, ácido acético, decanal e benzaldeído.

Boudhrioua et al. (2003) identificaram, na banana ‘Grande Naine’, 12 compostos durante o amadurecimento. Estes compostos constituem-se de 2 álcoois, 9 ésteres e 1 fenol. Sete deles, foram identificados como aromáticos, sendo quatro identificados como álcool isoamílico, acetato de isoamíla, acetato de butíla e eleumicina. Quando o fruto foi submetido a temperaturas de 40°C 60°C e 80°C, alguns destes compostos reduziram seus teores, sendo o acetato de isoamila, álcool isoamílico e acetato de butila com reduções constantes. A eleumicina apresentou grande resistência térmica, aparecendo nas amostras submetidas a este tratamento térmico. Durante o aquecimento, as alterações

ocorridas tiveram correlação com o teor de umidade do fruto e a temperatura adotada. A 80⁰C constatou-se a formação de outros compostos antes não existentes.

Dadas a complexidade e a quantidade de problemas que podem ocorrer na fermentação, esta etapa é considerada a de menor eficiência de todo o processo industrial da aguardente, fazendo-se necessários estudos mais detalhados.

A princípio, todas as fermentações alcoólicas são semelhantes, por assim dizer, podendo ser de mosto de cana-de-açúcar, de uva, de banana ou de qualquer outra matéria-prima que possua açúcares em sua constituição, diretamente fermentescíveis ou não, sendo necessário, neste último caso, o procedimento da quebra de moléculas maiores, como, por exemplo, o amido, por meio de métodos diversos (químicos, enzimáticos, ou sob calor e pressão).

Para que ocorra fermentação alcoólica de boa qualidade é necessário que a matéria-prima, contenha nutrientes e açúcares em quantidade e qualidade satisfatórias. Além do álcool etílico, alguns teores de produtos secundários são produzidos durante a fermentação, muito dos quais responsáveis pelo sabor e aroma da bebida.

Rose (1977) cita que o principal processo bioquímico na produção de bebidas alcoólicas está no catabolismo de açúcares simples realizado por cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, onde produz etanol e gás carbônico. Contudo, é sabido que a bioquímica da fermentação é mais complexa e envolve, na verdade, várias rotas metabólicas, sendo a via glicolítica a principal delas. Nesta rota, as reações são catalizadas por enzimas. Por exemplo, a primeira reação envolve a fosforilação da glicose para produzir a glicose 6-fosfato e esta reação é catalizada pela hexokinase. Já na segunda reação, de glicose 6-fosfato para frutose 6-fosfato e vice-versa, ocorre ação da enzima glucose-fosfato-isomerase,

a qual mantém um equilíbrio entre estes açúcares em torno de 3:1. Dessa forma, ocorrem várias reações, até chegar ao etanol.

As leveduras em condições anaeróbicas metabolizam a glicose pela via glicolítica (EMP), produzindo etanol e CO₂. Parte dos açúcares é usada para reações paralelas, dando origem a outros compostos durante a fermentação, além, ainda, dos produzidos pelas bactérias, como o ácido láctico e ácido acético, em caso de contaminações.

Os produtos primários e secundários são formados durante o transcorrer da fermentação. Segundo Crispim et al. (2000), estes produtos encontram-se em números superiores a uma centena. De fato, em trabalho realizado por Boscolo et al. (2000), foram identificados em 25 cachaças nacionais de marcas conhecidas, 51 produtos (apenas entre álcoois e ésteres). Produtos secundários referem-se a todas as substâncias formadas, excetuando etanol e gás carbônico, que são considerados produtos primários ou principais. Os produtos secundários são normalmente encontrados em pequenas quantidades e muitas vezes difíceis de serem determinados ou quantificados. Os produtos secundários em concentrações equilibradas são tão importantes quanto a produção de álcool etílico, contribuindo para a qualidade da bebida.

Como produtos secundários podem ser citados o glicerol, o ácido succínico, os álcoois superiores, os aldeídos, os ésteres e alguns ácidos (Valsechi, 1990).

2.5.1 Glicerol e ácido succínico

O glicerol tem a propriedade de tornar a bebida mais “macia”, mas, em âmbito prático, para a aguardente, não apresenta muito interesse devido à quantidade não apresentar muitas variações, sendo considerado um produto típico da fermentação (Valsechi, 1990).

Oura (1977) relata que cerca de 4% a 5% do açúcar são desviados da produção de etanol para atender à formação de subprodutos, dentre os quais incluem-se, além do glicerol e ácido succínico, o butilenoglicol, a acetoína e os álcoois superiores.

Alves (1994) constatou que, em alguns casos, o glicerol e o ácido succínico juntos respondem por 10% do açúcar desviado e, no geral, foram desviados cerca de 5,5% deste açúcar para a síntese do glicerol, valor relativamente constante para os ensaios.

Existe uma relação inversa na quantidade de glicerol formado e a maior concentração de substrato, demonstrando a influência da atividade vegetativa das leveduras na produção desta substância, que é mais favorecida em concentrações menores de substrato. Alves (1994) observou que em substratos com 18% ($p \cdot V^1$) de açúcar ocorreu um desvio de 4,8% deste açúcar para a produção de glicerol, enquanto que para concentrações de substrato de 6% este valor subiu para 8%. Segundo Basso & Amorim (1998), uma intensa aeração pode também provocar aumento da formação do glicerol, acarretando queda do rendimento fermentativo.

O desvio de açúcar para a produção do ácido succínico encontra-se entre 1,5% a 2,5% do açúcar total da fermentação (Alves, 1994). Não foi encontrada na literatura nenhuma necessidade fisiológica da levedura com relação à produção de ácido succínico, contudo, este exerce sinergisticamente uma ação antibacteriana com o etanol, tornando as leveduras mais competitivas, exercendo certo controle das bactérias presentes (Basso, 1996).

2.5.2 Aldeído acético

O aldeído acético advém da oxidação do álcool, por influência do oxigênio do ar ou ação direta de algumas enzimas oxidantes oriundas da própria levedura. De modo geral, aldeídos e ésteres são responsáveis pelo aroma da

cachaça enquanto que os álcoois são os principais responsáveis pelo sabor (Valsechi, 1990).

Os aldeídos são considerados intermediários na formação dos ácidos ou dos álcoois superiores. Os principais aldeídos encontrados são: acético, fórmico, butírico, isobutílico, valérico e caprótico. Durante a destilação, encontram-se presentes em maiores concentrações na fração de “cabeça” e apenas pequena concentração compõe a bebida, na fração conhecida como “coração” (Chaves & Póvoa, 1992).

Nascimento et al. (1997) observaram, por meio de análises realizadas por cromatografia líquida, que a concentração média de acetaldeído encontrada foi de $11,20 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL de álcool anidro}^{-1}$ para 56 aguardentes de cana artesanal e $12,0 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL de álcool anidro}^{-1}$ para outros 19 destilados, dentre estes, uísques, bagaceira, *brandy*, grappa, rum, tequila, vodka e conhaques. Estes valores demonstram haver pouca variação deste composto em destilados, situando-se abaixo do valor máximo de $30 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL de álcool anidro}^{-1}$ permitidos pela legislação brasileira (Brasil, 1997).

2.5.3 Ácido acético e outros ácidos

A maior quantidade do ácido acético encontrado nos vinhos é consequência de contaminações e pequena proporção como produto do metabolismo das leveduras, advindo da oxidação do acetaldeído (Valsechi, 1990). Segundo Hashizume (1983), a concentração do ácido acético advinda do metabolismo das leveduras depende muito da espécie deste microrganismo e composição do caldo (teor de açúcares e substâncias nitrogenadas) e, ainda, das condições de fermentação, como temperatura e aeração.

Segundo Maiorella et al. (1983), os ácidos acético e fórmico possuem mecanismos de inibição semelhantes sobre as leveduras, atuando no transporte de fosfato através da membrana, por serem menos solúveis nos lipídeos desta

membrana. No caso do ácido láctico, este contém um grupo hidroxílico extra, sendo muito menos solúvel em lipídeos e a inibição pode até ocorrer, mas em concentrações altas (10-40 g · L⁻¹).

Alguns pesquisadores têm demonstrado efeito sinérgico entre etanol e ácidos orgânicos, podendo explicar a inibição da fermentação pelo álcool produzido. O ácido acético é produzido tanto pelas leveduras quanto pelas bactérias (Alves, 1994) e, segundo Pampulha & Loureiro (1989), o ácido acético, juntamente com o etanol, aumenta o efeito tóxico da fermentação.

Lima (1983) menciona que pH 4,5 e 5,0 são favoráveis ao desenvolvimento de fermentações alcoólicas regulares, completas e rápidas, com redução do desenvolvimento de microrganismos prejudiciais, sobretudo bactérias lácticas e acéticas. Em função disso, a acidez normal do caldo, pH em torno de 5,6 é desejável; contudo, o processo de diluição do mesmo pode favorecer a microbiota bacteriana.

Segundo Chaves & Póvoa (1992), na aguardente, a acidez tende a aumentar com o envelhecimento, o que é importante, uma vez que os ácidos, ao reagirem quimicamente com os álcoois, formam os ésteres, responsáveis pelo aroma da cachaça. Cardello & Faria (1997) constataram que, no envelhecimento da bebida em tonel de carvalho (*Quercus alba* L.), ocorreram diminuições nos valores de pH e aumento no sabor; contudo, não se constataram diferenças significativas de aroma entre cachaça envelhecida até 48 meses e sem envelhecimento. Isto caracteriza a existência do baixo nível de esterificação ocorrida.

2.5.4 Álcoois superiores

Álcoois superiores são álcoois com maior número de átomos de carbonos quando comparados ao álcool etílico. Os álcoois propílico, isobutílico

e isoamílico, constituem a maior proporção dos álcoois superiores em bebidas (Valsechi, 1990).

Mostos que sofrem fermentações puras, sendo logo após destilados, dão origem a produtos com mínimas proporções de álcoois superiores. A origem da produção destes álcoois parece não estar relacionado somente ao metabolismo dos açúcares, mas também devido à ação das leveduras sobre determinados aminoácidos (Valsechi, 1990).

Rose (1977) refere-se aos álcoois superiores como sendo sintetizados a partir de oxo-ácidos, os quais são, em termos, reduzidos a álcoois. Formalmente, essas reações são análogas à síntese de etanol de piruvato via acetaldeído. Estes oxo-ácidos podem ser formados durante o metabolismo de carboidratos pelas leveduras ou pela deaminação ou transaminação de um aminoácido, podendo-se obter, a partir da isoleucina, o álcool amílico ativo (d-amílico), da leucina o álcool isoamílico e da valina o isobutílico. Entretanto, de acordo com Crowell et al. (1961), Ingraham & Guymon (1960), citados por Cleto (2000), 75% do conjunto de mistura de álcoois homólogos superiores, na fermentação por leveduras, provêm do metabolismo de açúcar do meio e apenas 25% de aminoácidos exógenos.

Ribeiro & Horri (1999) constataram que a produção de álcoois superiores em aguardente de cana foi crescente até 20 horas de fermentação para três linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* testadas, sendo duas destas com capacidade floculante, uma das quais não produtora de sulfeto de hidrogênio. Esta linhagem não produtora de sulfeto de hidrogênio, como característica já inerente, produziu a maior quantidade de álcool superior ($185 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

2.5.5 Metanol

O metanol é constituinte naturalmente presente nas bebidas alcoólicas, em quantidades pequenas em relação aos demais componentes. Entretanto, esta

afirmação diz respeito à maioria das bebidas, devendo-se dar muita atenção quanto se tratar de bebidas elaboradas a partir de frutas, e a depender da quantidade de pectinas metoxiladas associada à ação da enzimas pectinametilesterase, pode ocorrer a formação adicional de metanol (Blindler et al., 1988). Quando se utilizam frutas verdes, o risco da bebida apresentar maiores concentrações de metanol é ainda maior, em função do maior teor de pectina apresentado. Segundo Basié et al. (1998), o metanol é inevitavelmente um componente presente em *brandy* de frutas, como pêra, maçã, uva, dentre outras. Estes autores constataram que 19 amostras, das 58 aguardentes de frutas examinadas, não atendiam à regulamentação quanto à concentração de metanol. Este é um fato preocupante, visto já terem sido constatados casos de envenenamento por metanol devido ao consumo de *brandy*, como o citado por Brocks et al. (1983), com ocorrência de 4 casos simultâneos de envenenamento devido ao consumo de *brandy* de ameixa.

Segundo Richi & Ramaswamy (2003), a utilização combinada de pressão e tempo (400 MPA por 25 minutos), possibilitou inativar a pectinametilesterase. Na produção da aguardente, as pectinas também dificultam o processo de filtração do mosto a ser enviado para a destilação, por conferir maior viscosidade.

A pectina se forma pela decomposição da protopectina em função da ação de enzimas pectinolíticas. A pectina é um polímero formado por várias moléculas de ácido galacturônico. O teor de pectina apresentado nas frutas é variável, existindo algumas frutas, a exemplo da maçã, com altas concentrações. Segundo Palmer (1971), na banana, o teor de protopectina insolúvel situa-se em torno de 0,5% , reduzindo para 0,3% com o amadurecimento. Segundo Lindiger et al. (1997), mesmo no organismo humano pode haver liberação de metanol pela degradação de pectina. Um quilograma de maçã pode conter cerca de 10 a 15 gramas de pectina, gerando de 0,4 a 1,4 g de metanol, equivalente à produção

endógena diária de 0,3 a 0,6 gramas, o mesmo que o consumo de 300 mL de *brandy* a 40 °GL, apresentando 0,5 g de metanol.

No processo natural de fabricação dos diferentes tipos de bebidas alcoólicas pode ocorrer a produção de metanol em até 1,0 g · 100 mL em álcool anidro⁻¹ (Simpkins, 1985).

Na banana, o cozimento resulta na solubilização da pectina e dissolução da lamela média, levando à separação da parede celular. O amido permanece constante, não influenciando na alteração da textura. Temperaturas abaixo de 70°C têm pouco efeito no amolecimento, porém, acima deste valor, com 10 minutos, já houve efeito (Qi et al., 2000).

Segundo Windholz (1976), a ingestão de metanol, mesmo em doses pequenas por longos períodos, pode levar à cegueira e até mesmo à morte. Cardoso (2001), em trabalho de revisões, cita que o metanol é absorvido e metabolizado pelo homem da mesma forma que o etanol, contudo, com velocidade de oxidação menor para o metanol, de modo que sua excreção pode exigir vários dias.

Na elaboração da aguardente de frutas é comum a utilização de enzimas, visando aumentar o rendimento, facilitar a filtração e o clareamento do mosto. A depender da enzima utilizada, ou mesmo daquelas naturalmente presentes na fruta, ou produzidas pelas leveduras, poderá ocorrer maior ou menor liberação de metanol no mosto. A concentração apresentada terá reflexos na bebida produzida, devendo-se atentar para a correta separação das frações no momento da destilação, principalmente no que diz respeito à fração de “cabeça”.

2.5.6 Ésteres

A indústria utiliza aromas artificiais em diversos produtos alimentícios e bebidas. Na produção de sucos não é diferente. *Brandy* de banana também é passivo de falsificações por meio de essências; contudo, Jordán et al. (2001),

estudando a essência de banana e compostos presentes na banana fresca, constataram muitas diferenças na composição dos compostos voláteis entre ambos. Alguns compostos presentes na fruta não foram constatados em produtos com essência e vice-versa. Quando encontrados em ambos, estavam presentes em concentrações diferentes. Enquanto a fruta apresentava-se com 5 tipos de álcoois, na essência encontraram-se 16 e, para ésteres, 16 na fruta contra 20 na essência.

Segundo Lilly et al. (2000), em *brandy* de frutas, dentre muitos compostos responsáveis pelo aroma, encontram-se os ésteres e o aroma característico, no caso do *brandy* de banana, apresentado durante a fermentação deve-se, primeiramente, ao éster acetato de isoamila. Mosha et al. (1996) relatam que os altos índices de ésteres apresentados na cerveja de banana nos países africanos deve-se principalmente, ao éster, acetato de isoamila, que confere o aroma característico desta fruta.

Segundo Wyllie & Fellman (2000), o substrato é o principal determinante da qualidade e quantidade da composição de ésteres, que resulta no perfil de aroma da banana. A quantidade de ésteres produzidos no fruto de banana madura parece ser limitada pelo suprimento de álcool precursor, tendo sido constatado serem mais reativos os álcoois de 5 e 6 carbonos.

Na Figura 1, pode ser observado um esquema simplificado da formação de diversos compostos em processos fermentativos.

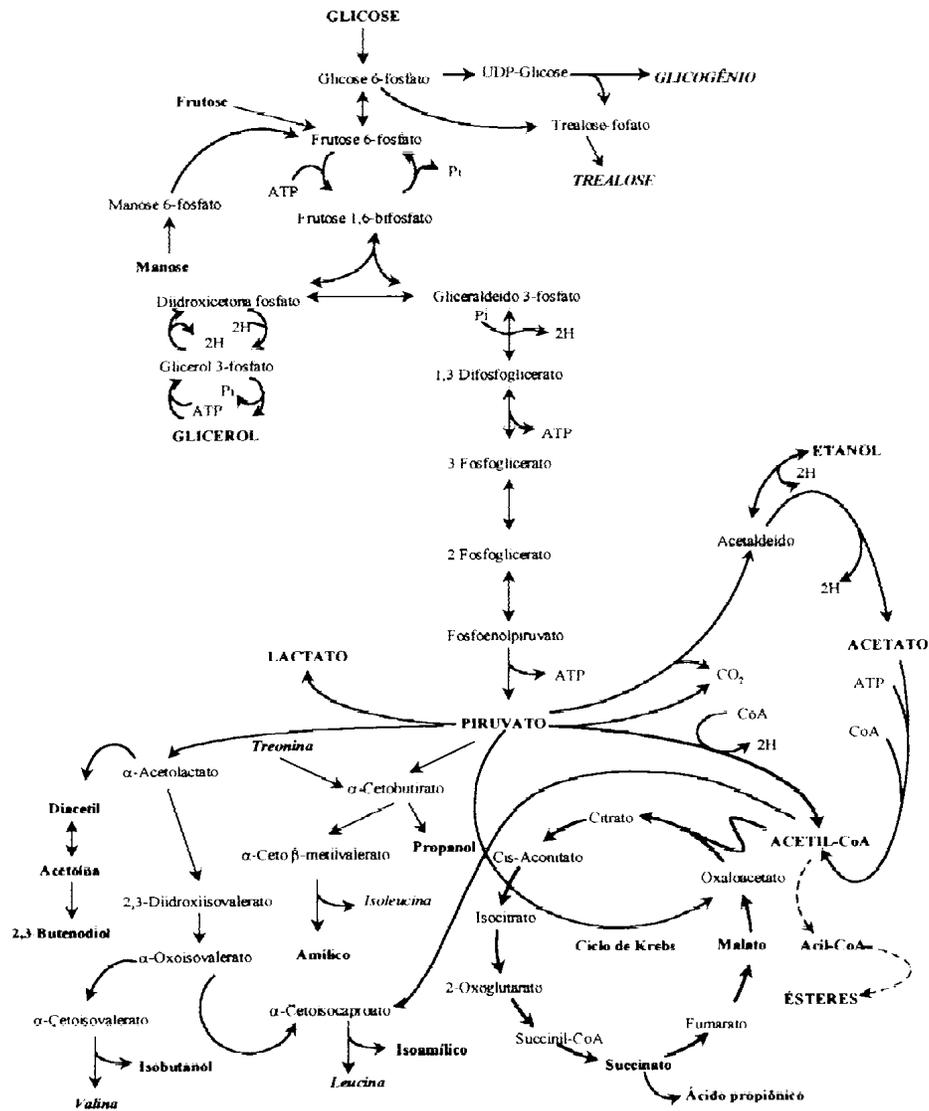


FIGURA 1 Esquema simplificado da formação de compostos em processos fermentativos. Fonte: adaptado por Dias (2001), a partir de Weeb & Ingrahan (1963); Daudt & Ough (1975); Romano & Suzzi (1996); Nielsen & Richelieu (1999) e Ostergaard; Olsson & Nielsen (2000).

2.6 Qualidade de bebidas alcoólicas

O resultado a ser obtido na qualidade de uma bebida advém, necessariamente, dos procedimentos adotados desde o início do processo, começando pela escolha da matéria-prima, passando pelo beneficiamento, fermentação, destilação e armazenamento criterioso do produto obtido. Basicamente, a qualidade de uma bebida alcoólica pode ser analisada considerando-se três aspectos importantes: físico-químico, microbiológico e sensorial.

Para as bebidas apenas fermentadas, como as cervejas e os vinhos, todos os aspectos anteriormente citados deverão ser considerados. Por exemplo, no aspecto microbiológico, devido aos baixos teores de álcool etílico raramente superiores a 15^oGL, estas bebidas, quando armazenadas de forma inadequada, ficam expostas a diversas deteriorações, tal qual ocorre com frequência em vinhos, principalmente por ação de bactérias acéticas, na presença de oxigênio.

Com relação à parte química, além dos metabólitos normais formados durante a fermentação, em função destas bebidas não sofrerem destilação, compostos não voláteis poderão vir a interferir na qualidade do produto final, tanto devido à composição da matéria-prima em decorrência de condições de solo, clima, variedade, bem como devido ao uso de recipientes inapropriados durante a fase de elaboração e de conservação ou, mesmo, de produtos utilizados no controle fitossanitário da cultura, a exemplo de produtos à base de cobre.

Silva et al. (1999), examinando vinhos do Sul de Minas Gerais, constataram que a utilização de vasilhames não revestidos propicia a liberação de teores elevados de cobre e ferro, que determinam o surgimento de casses cúpricas e férricas nestes vinhos. Parte do ferro encontrado nos vinhos provém do solo, mas a maioria origina-se de contaminações durante a colheita e da utilização de equipamentos de vinificação contendo este metal. A casse férrica deve-se ao ferro em excesso, passando a interferir na coloração e *flavour* dos

vinhos. Segundo Hashizume (1983), vinhos com teores acima de $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ são suscetível à casse férrica. Quanto ao cobre que surge em excesso no processo de vinificação, ele é eliminado na sua maioria, durante a fermentação alcoólica na primeira trasfega; entretanto, se, durante a conservação do vinho, houver contaminação com teor maior que $0,7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, a casse cúprica poderá ocorrer, chegando até a turvação com formação de grande quantidade de precipitado, quando os níveis de cobre situarem-se entre $1,5$ a $2,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Para bebidas destiladas, como as aguardentes, uma vez produzidas, os aspectos microbiológicos são pouco preocupantes, em função do aquecimento do fermentado durante a destilação, além do alto teor alcoólico que apresenta a bebida. Contudo, é freqüente durante a destilação a ocorrência de contaminações químicas com cobre, em decorrência de falta de limpeza adequada dos alambiques de cobre tradicionalmente utilizados.

Segundo Crispim et al. (2000), a legislação brasileira determina que a concentração máxima permitida de cobre seja de $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, contudo, em 76 amostras de aguardentes analisadas, a faixa de teores de cobre apresentada esteve entre $0,01$ e $14,3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e, entre estas, as aguardentes artesanais produzidas por pequenos produtores apresentaram as maiores concentrações de cobre, em média, $4,96 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Para minimizar os problema de contaminação com o cobre, Cardoso (2001) sugere encher o alambique e o condensador com água, quando em desuso principalmente, e, no momento das reutilizações contínuas, proceder anteriormente, duas destilações com água, sendo a primeira com adição de limão (ácido cítrico), na quantidade de $50 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$.

Na aguardente, a parte química é muito preocupante, principalmente devido à concentração ocorrida dos metabólitos durante o processo de destilação e, muitos dos quais extremamente prejudiciais à saúde, como no caso do metanol. Uma correta separação durante a destilação das frações de “cabeça”,

“coração” e “cauda”, contribui para melhorar a qualidade do produto, minimizando os metabólitos tóxicos.

No aspecto físico, é importante evitar a presença de substâncias contaminantes, advindas por exemplo, da etapa de envelhecimento e/ou durante embalagem do produto ou, mesmo, na condução inadequada do processo de destilação, possibilitando a passagem do fermentado diretamente no condensador sem estar em estado gasoso, o que normalmente ocorre devido ao excesso de temperatura na destilação ou de excesso de fermentado no alambique.

A qualidade e a inocuidade das bebidas alcoólicas são verificadas por meio dos laudos emitidos por laboratórios credenciados pelo Ministério da Agricultura. Os limites mínimos e máximos dos componentes são específicos para cada bebida e estabelecidos pela legislação em vigor (Brasil, 1981, 1997), determinando enfim, a liberação ou não para o consumo. Da mesma forma, pela legislação (Brasil, 1986), são estabelecidos os métodos analíticos que passam a constituir padrões oficiais para a análise de bebidas.

Em função da metodologia utilizada, pode haver diferenças na quantificação das concentrações de certos compostos analisados, conforme observado por Araújo e Ferreira (1975) para álcoois superiores. Estas diferenças ocorrem pelo fato de existir uma baixa correlação entre as análises para álcoois superiores realizadas pelos métodos espectrofotométrico e cromatográfico. Os autores concluem que, quanto maior for a presença do álcool superior 1-propanol, maior serão estas diferenças, sendo menores no método espectrofotométrico. O 1-propanol não é eficientemente detectado na análise espectrofotométrica, e isto decorre em virtude da fraca reação com o reagente dimetilaminbenzaldeído - DMAB utilizado, resultando em menor intensidade de cor, subestimando a concentração real deste álcool, que estaria contido na amostra.

O Decreto Federal 2314, de 4 de setembro de 1997, seção 6 e artigo 96 (Brasil, 1997), estabelece os valores dos padrões de qualidade da aguardente de frutas ou brandy de frutas. O teor alcoólico deve estar entre 36-54% v · v¹, à temperatura de 20⁰C e a soma dos componentes voláteis (aldeídos, ácidos, ésteres, furfural e álcoois superiores) não poderá ser inferior a 200 mg · 100 mL⁻¹ em álcool anidro, nem superior a 650 mg · 100 mL⁻¹ em álcool anidro.

A destilação deve ser efetuada de forma que o destilado tenha o aroma e o sabor dos elementos naturais voláteis do mosto fermentado e a bebida elaborada com matéria-prima que corresponda ao nome do produto. Em função disso, a aguardente de fruta poderá ter as seguintes denominações: *cherry brandy*, *kirchs*, *dirchwasser* ou aguardente de cereja; *estch brandy*, *katzch brandy*, *slivowicz*, *slibowika*, *mirabella* ou aguardente de ameixa; *peach brandy* ou aguardente de pêssego; *calvados*, *apple brandy* ou aguardente de maçã e *pear brandy* ou aguardente de pêra (Brasil, 1997).

Segundo o Decreto 2314, artigo 88 (Brasil, 1997), o destilado alcoólico simples de origem agrícola usado para a elaboração de diversos tipos de bebidas, com teor alcoólico maior, variando entre 54% a 95% v · v¹, não poderá apresentar álcool metílico superior a 200 mg · 100 mL de álcool anidro⁻¹, com exceção dos provenientes de bagaço de uva e de polpa de frutas fermentadas, cujo limite máximo será de 700 mg · 100 mL de álcool anidro⁻¹. Nogato et al. (2001) citam que, na legislação atual (Brasil, 1997), o máximo de metanol permitido em aguardentes de cana-de-açúcar, uísques e outras bebidas destiladas, é de 200 mg de metanol · 100 mL de álcool anidro⁻¹; já para conhaques e aguardentes de frutas, este limite é de 400 mg de etanol · 100 mL de álcool anidro⁻¹.

Segundo Blinder et al. (1988), citados por Badolato & Duran (2000) o consumo de 20 mL de metanol provoca cegueira e 60 mL constituem a dose letal. Nesse sentido, o metanol é muito indesejável nas bebidas alcoólicas,

apesar do uso concomitante com o álcool etílico amenizar seus efeitos no organismo, devido à concorrência pela mesma enzima de metabolização, a álcool desidrogenase hepática.

Clemente (2001) cita que a parte sensorial de uma bebida alcoólica é fator crucial. O aroma e o sabor da aguardente são determinados pelas quantidades de produtos secundários formados no decorrer da fermentação, e boa aguardente é aquela que apresenta características sensoriais importantes na aparência, cor, aroma e sabor. Por meio da análise sensorial, pode-se avaliar a aceitabilidade e a qualidade da bebida, utilizando um painel de julgadores integrado por pessoas selecionadas e treinadas para analisar as diferentes características organolépticas.

Dessa forma, o fornecimento de subsídios direcionados para a produção da aguardente de banana, por meio do estudo microbiológico, bem como quantitativo dos principais metabólitos produzidos durante a fermentação e na bebida, contribui para o desenvolvimento de uma tecnologia adequada de produção dessa bebida, beneficiando o produtor e oferecendo garantia de segurança e qualidade para o consumidor.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Processo de produção da aguardente de banana

Os experimentos objetivando avaliar a produção da aguardente de banana foram montados e conduzidos em um alambique experimental, localizado no município de Lavras, situado no Sul de Minas Gerais, Brasil. Estes experimentos foram realizados com a banana ‘Nanicão’ em estágio avançado de amadurecimento e com injúrias (Figura 2), constando de três fermentações no sistema de bateladas sucessivas com reutilização do inóculo inicial (*Saccharomyces cerevisiae* CA-1174).

As análises foram realizadas na Universidade Federal de Lavras (UFLA) e na Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), as quais foram, especificamente: análises microbiológicas - Laboratório de Microbiologia (Departamento de Biologia - UFLA); minerais na polpa e na torta de filtro - Laboratório de Análise Foliar (Departamento de Química - UFLA); análise de metabólitos nos fermentados e nas bebidas, por meio da cromatografia gasosa - Laboratório de Química Inorgânica, bem como análise nas bebidas pelo método do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAAb) - Laboratório de Análise Físico-Química de Bebidas (ambos no Departamento de Química - UFLA). As demais análises, como umidade, fibra, fenólicos totais, pH, acidez total titulável, amido e açúcares (não redutores, redutores e totais), foram realizadas no Laboratório de Análise de Qualidade do Café, localizado na Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG).

Bananas ‘Nanicão’, no total de 180 kg, foram adquiridas no mercado do CEASA em Belo Horizonte. Os frutos, após prévia seleção, foram descascados manualmente e as polpas acondicionadas em embalagens plásticas de polietileno com o peso médio de 2 kg por embalagem e, em seguida, foram congelados e armazenados, para posterior utilização nos experimentos estabelecidos.



FIGURA 2 Bananas de baixo valor comercial, em estágio avançado de maturação e com injúrias

No momento da utilização nos experimentos, cerca de 10 dias após o armazenamento sob congelamento, procedeu-se ao descongelamento de 38 kg, sendo esta uma quantidade suficiente e com margem de segurança, visando à preparação de 50 kg de mosto a 15^oBrix, ou seja, foram diluídas com água destilada, visto a polpa possuir nestas condições valores de sólidos solúveis acima de 20^oBrix. A polpa foi descongelada parcialmente, em razão de terem sido realizadas três fermentações sucessivas com o aproveitamento do inóculo inicial (*Saccharomyces cerevisiae* CA-1174), ou seja, em tempos diferentes, a cada intervalo de 72 horas. Procedeu-se ao descongelamento por 8 horas em temperatura ambiente, sendo a polpa posteriormente desestruturada em mixer (modelo 15 da Arpifrio). Para melhor desestruturação, adicionou-se água

destilada, até obter-se a diluição desejada de sólidos solúveis totais para 15° Brix a 20° C, leitura realizada em refratômetro portátil da marca Mercúrio.

3.1.1 Fluxograma de produção da aguardente de banana

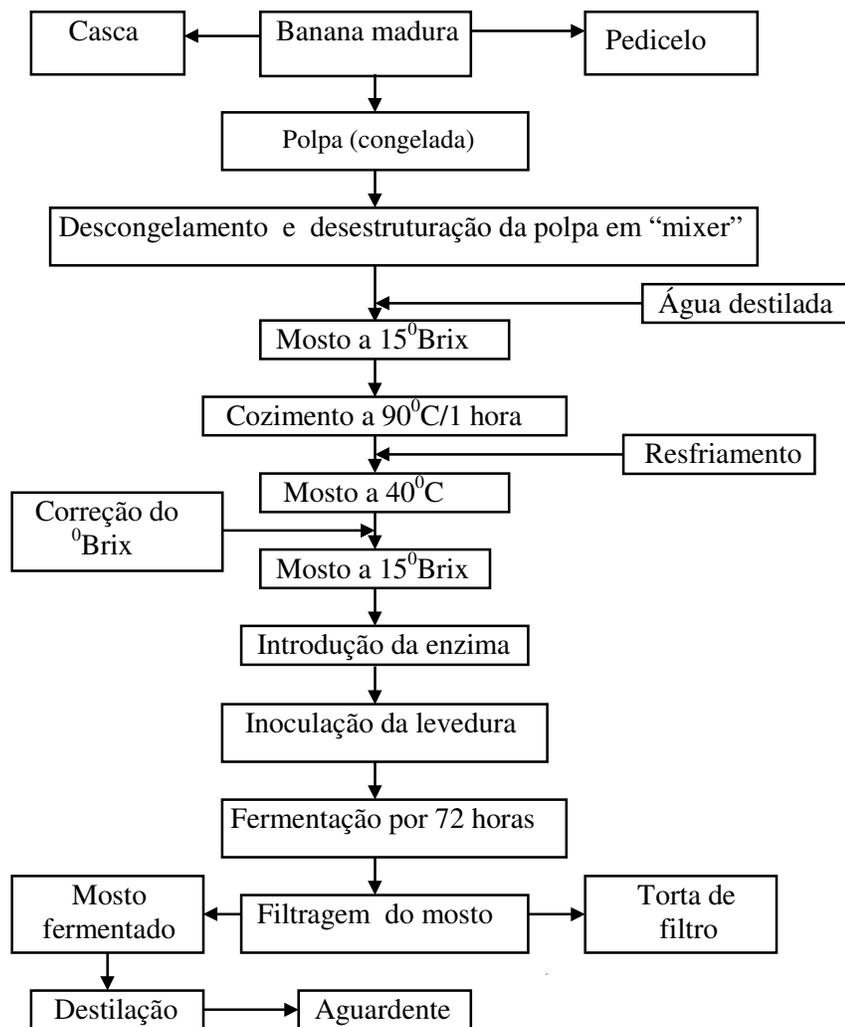


FIGURA 3 Fluxograma de produção da aguardente de banana.

3.1.2 Preparação do mosto

O caldo de banana com o teor de sólidos solúveis totais a 15⁰Brix na quantidade de 50 kg por dorna foi submetido a um processo de aquecimento com homogeneizações contínuas. Este aquecimento foi realizado em um reservatório de cozimento de aço inox com fogo direto, por um período de 1 hora, a 90°C, sendo este procedimento sugerido por outros autores (Almeida, 1935; Martins et al., 1985; Hammond et al., 1996), objetivando a dispersão da massa e redução dos microrganismos contaminantes. Neste aquecimento, objetivou-se também a inativação enzimática que, dentre outros efeitos, evita o processo de escurecimento.

Após este período de aquecimento, o caldo foi resfriado com jato de água no exterior da parede do reservatório até reduzir a temperatura a 40⁰C. O teor de sólidos solúveis totais foi corrigido acrescentando-se água destilada, visando recompor a água perdida por evaporação durante o aquecimento. Para este ajuste, retirou-se uma alíquota do caldo e, com o auxílio de refratômetro da marca Mercúrio, procedeu-se a leitura com a temperatura da amostra a 20⁰C, visto este refratômetro não possuir compensador de temperatura.

3.1.3 Tratamento enzimático

Com a temperatura a 40⁰C, objetivando aumentar o rendimento no processo de filtração com prensagem, a enzima pectinolítica Pectinex® foi introduzida na concentração de 0,025 mL · 100g de caldo¹, correspondendo a 12,5 mL · 50 kg de mosto¹ e, em seguida, o caldo foi homogeneizado. Esta concentração adotada foi semelhante à concentração de 0,03% v · p¹, adotada por Cardoso et al. (1999), visando aumentar o rendimento de suco de banana do subgrupo Cavendish.

3.1.4 Inoculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CA-1174

Uma hora após a introdução da enzima ao caldo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CA-1174 liofilizada foi inoculada na concentração de $0,025 \text{ g} \cdot 100\text{g de caldo}^{-1}$; conseqüentemente, 12,5 g foram inoculados em cada fermentação de 50 kg de caldo de banana. Esta concentração correspondeu a $1,02 \times 10^8 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$ de caldo. As leveduras, anteriormente à inoculação, foram ativadas em água destilada, na proporção de 1:10, sendo, respectivamente, levedura e água destilada. Esta suspensão de leveduras foi agitada em banho-maria regulado a 40°C , permanecendo nesta temperatura por um período de meia hora. Em seguida, foi inoculada uma única vez na primeira fermentação, sendo que, para as demais, foi estabelecida a reutilização do inóculo (batelada sucessiva).

Uma vez que o mosto continha a enzima e a levedura, a fermentação foi conduzida em temperatura ambiente, por 72 horas em dorna de aço inox e também em um recipiente de vidro transparente de 20 litros, da marca Pyrobras[®], para o acompanhamento visual da fermentação também no perfil. As amostras foram coletadas a cada intervalo de 6 horas, para a realização das análises.

3.1.5 Filtração com prensagem

Decorridas 72 horas de fermentação, procedeu-se, no mosto fermentado, a filtração com prensagem (prensa vertical em sistema de rosca giratória). A torta de filtro obtida foi congelada para a realização de análises posteriores. O mosto fermentado ausente da torta de filtro foi decantado por 2 horas, retirando-se o sobrenadante para ser destilado e as leveduras decantadas para a reutilização nas fermentações posteriores.

3.1.6 Reutilização do inóculo

O inóculo obtido ao final de cada fermentação de 72 horas foi lavado e reutilizado, adicionando-se o dobro do seu volume em água destilada e, após duas horas de repouso, o sobrenadante foi eliminado e o inóculo decantado reutilizado.

Anteriormente à lavagem do inóculo, efetuou-se a contagem do número de células viáveis $\cdot \text{mL}^{-1}$. A contagem foi realizada em câmara de *Newbauer* após diluições, utilizando-se a coloração com azul de metileno (Fink & Kuhler, 1993). As leveduras foram observadas em microscópio óptico de campo claro no aumento de 400 vezes, adotando-se a contagem de 5 dos 25 quadrículos do quadrante central da câmara de *Newbauer* (Bio-Rad Laboratories, 1992).

3.1.7 Destilação

As destilações foram realizadas em alambique de cobre de 1 “corpo”, com capacidade de 100 litros de mosto fermentado (Figura 4). Procedeu-se a limpeza do mesmo com água e limão, segundo citações de Cardoso (2001). O aquecimento foi efetuado lentamente até a temperatura de 90°C por meio de fogo direto, pelo uso do GLP. No final do condensador, colocou-se uma proveta de 500 mL para acompanhamento do grau alcoólico dos destilados e, a cada 400 mL do destilado produzido, procedeu-se à leitura na escala de Gay-Lussac ($^{\circ}\text{GL}$) a 20°C, com auxílio de um alcoômetro da marca Mercúrio. Durante o processo de destilação, os primeiros 10% foram separados, constituindo a fração de “cabeça”, bem como os 10% finais, conhecido como fração “cauda”; ambos proporcionalmente ao volume de álcool esperado. A aguardente propriamente dita constituiu-se dos 80% do destilado obtidos entre as frações de “cabeça” e “cauda”, conhecida como “coração”.

As aguardentes produzidas foram armazenadas em recipientes de vidro, objetivando averiguar a qualidade das mesmas.

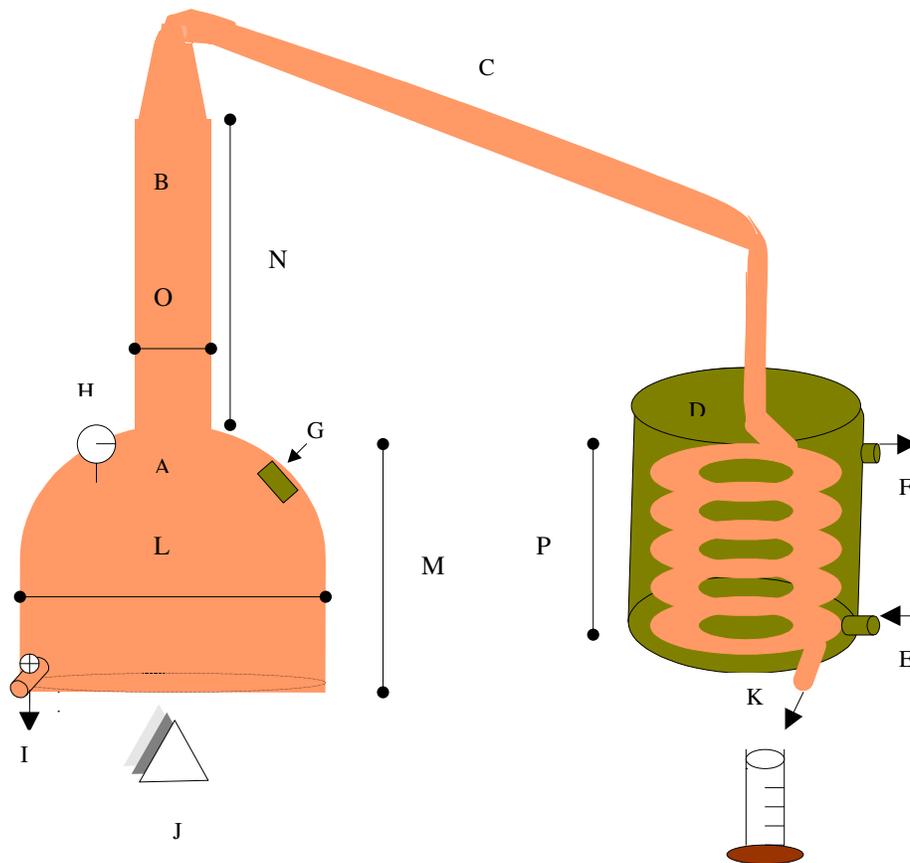


FIGURA 4 Esquema do alambique (sem refluxo), utilizado na destilação da aguardente de banana. A) cuba; B) capitel; C) alonga; D) serpentina de resfriamento E) entrada de água; F) saída de água; G) entrada do mosto fermentado; H) termômetro; I) saída de vinhoto; J) aquecimento com GLP; K) saída de aguardente e coleta em proveta; L) diâmetro da cuba = 0,6 m; M) altura da cuba = 0,5 m; N) altura do capitel = 0,8 m; O) diâmetro do capitel = 0,18 m; P) condensador = 4,1 m linear x 0,018 m de diâmetro.

3.2 Análise da polpa, caldo-de-banana e torta de filtro

Diversas análises específicas para cada etapa do processo anterior à fermentação e na torta de filtro (Tabela 4) foram realizadas para as três fermentações, sendo: I) relação polpa/casca – P/C; II) densidade; III) sólidos solúveis totais – SST; IV) pH; V) umidade; VI) fibra bruta; VII) minerais; VIII) acidez total titulável – AAT; IX) açúcares (totais – AT, redutores – AR, não redutores – ANR); X) amido; XI) fenólicos totais – FT.

TABELA 4 Análises específicas para cada etapa, efetuadas na polpa, caldo de banana e torta de filtro, nas três fermentações.

Etapas	Análises
1. Fruta in natura	I
2. Polpa in natura	III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X e XI
3. Polpa após descongelamento	IV, V, VIII, X e XI
4. Caldo diluído para 15° Brix	II, III, IV, V, VIII, X e XI
5. Caldo após aquecimento (90°C)	IV, V, VIII, X e XI
6. Antes da adição da enzima	IV, V, VIII, X e XI
7. Uma hora após a adição da enzima	IV, V, VIII, X e XI
8. Torta de filtro	IV, V, VII, VIII, X e XI

As análises foram realizadas em laboratório nas seguintes metodologias:

I. Relação polpa/casca (P/C)

Foram realizadas por amostragem de frutos e em três repetições, efetuando-se a relação polpa/casca na banana despencada, separadamente, por meio de pesagem da casca e da polpa, com auxílio de balança digital (BC 400

PV da Gehaka). Em seguida, as polpas foram aproveitadas, com a finalidade de serem realizadas determinações químicas diversas.

II. Densidade

A densidade do caldo de banana com o teor de sólidos solúveis em 15^oBrix a 20^oC, foi obtida com auxílio de balança digital (BC 400 PV da Gehaka), por meio da pesagem, de um volume conhecido de caldo contido em balão volumétrico. Em seguida, a densidade foi determinada, por meio da relação da massa obtida pelo volume conhecido.

III. Sólidos solúveis totais

Foi determinado por meio de leitura a 20^oC, realizada em refratômetro portátil da marca Mercúrio.

IV. pH

O pH foi determinado pelo método potenciométrico com eletrodo combinado de vidro, segundo técnica da AOAC (1990), utilizando medidor de pH digital, modelo DMPH-2 da Digimed.

V. Umidade

A umidade foi determinada em estufa ventilada com temperatura regulada a 65^oC, na qual as amostras homogeneizadas foram colocadas em cápsulas de porcelana e mantidas nesta temperatura até atingir peso constante, segundo a técnica do Instituto Adolfo Lutz (1990).

VI. Fibra bruta

Foi determinada segundo a técnica de Hennenberg (1947).

VII. Minerais

A polpa de banana e a torta de filtro desidratadas, foram analisados segundo Malavolta (1996) e os resultados convertidos através da utilização do teor de umidade predeterminado. As análises de cálcio, magnésio, zinco, manganês e ferro foram realizadas, utilizando-se espectrofotômetro de absorção atômica (Varian, modelo AA-175); a determinação do fósforo, enxofre e boro, por espectrofotômetro de colorimetria (Cary 50, da Varian) e o potássio, por fotômetro de chama (Micronal, modelo B 262). O nitrogênio foi determinado com auxílio de destiladores de nitrogênio do tipo Kjeldahl, da marca Micronal, com posterior titulação com ácido clorídrico.

VIII. Acidez total titulável (ATT)

A acidez foi determinada por titulação com NaOH a $0,05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, conforme técnica da AOAC (1990).

IX. Açúcares (totais – AT; redutores – AR; não redutores – ANR)

Foram determinados pela técnica de Somogy, adaptada por Nelson (1994), sendo os açúcares extraídos pelo método de Lane-Enyon, descrito pela AOAC (1990).

X. Amido

A determinação do amido foi realizado segundo a AOAC (1990).

XI. Fenólicos totais (FT)

Os fenólicos totais foram extraídos pelo método de Godstein & Swain (1963) e determinados pelo método de Folin Denis (AOAC, 1990).

3.3 Avaliação do processo fermentativo

Nos experimentos de fermentação realizados neste trabalho, optou-se pela utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CA-1174, devido à inexistência de uma levedura específica, selecionada para a fermentação da banana e a levedura utilizada ter sido selecionada a partir de fruta (uva).

3.3.1 Avaliação populacional do inóculo e parâmetros fermentativos

As análises microbiológicas foram realizadas em amostras retiradas a cada intervalo de 6 horas, durante as 72 horas de fermentação. A partir das amostras, foram preparadas diluições decimais sucessivas em água peptonada estéril ($10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de peptona de soja e $5,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de cloreto de sódio) e uma alíquota de 0,1 mL da amostra de mosto diluído (10^{-6} e 10^{-7}) foi plaqueada, em meio de cultura WL (Difco) solidificado. As placas inoculadas em triplicata em cada diluição foram incubadas à temperatura controlada em B.O.D a 28°C , por um período de 48 horas. Placas apresentando-se com 30 a 300 colônias, foram selecionadas para a quantificação do inóculo.

Os parâmetros fermentativos adotados foram os seguintes: pH, açúcares (reduzidos, não reduzidos e totais), sólidos solúveis totais e temperatura. Para a determinação do pH foi utilizado o peagâmetro digital da marca Mercúrio e os sólidos solúveis totais foram determinados em refratômetro portátil da marca Mercúrio e sacarímetro com termômetro acoplado, objetivando o acompanhamento também da temperatura. Os teores de açúcares foram determinados pela técnica de Somogy, adaptada por Nelson (1994), sendo os açúcares extraídos pelo método de Lane-Enyon, descrito pela AOAC (1990).

3.3.2 Metabólicos químicos analisados durante as fermentações e nos destilados

Durante as fermentações, a cada 6 horas de intervalo, e nos referidos destilados originados, os principais metabólitos químicos foram quantificados por meio de cromatografia gasosa (cromatógrafo Varian 3800, versão 4.5), injetando as amostras em três repetições. Na bebida, efetuou-se também a análise tradicional, pelo Método Oficial do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAAb).

Pelo MAAb, foram determinados: acetaldeído, metanol, acetato de etila, soma dos álcoois superiores, soma dos componentes secundários, etanol, cobre, densidade relativa, e ainda, realizou-se o exame organoléptico.

Por cromatografia gasosa, foram determinados: acetaldeído, acetato de etila, metanol, n-propanol, isobutanol, álcool isoamílico, álcool amílico, n-hexanol e etanol. O etanol foi determinado por meio de uma solução de calibração separada, devido a alta concentração nas amostras, sendo necessária inclusive, a realização de diluições (20x no mosto e 100x no destilado). Adotou-se o método de padrão interno, sendo escolhido o tolueno por meio de critérios químicos e ausência nas amostras a serem analisadas. As soluções de calibrações foram preparadas, pipetando 0,5 mL da solução contendo os padrões e 1,0 mL da solução de padrão interno.

Na solução de padrão interno, objetivando a determinação do etanol, utilizou-se a acetona como solvente e, para os demais compostos, utilizou-se o etanol. Os solventes utilizados foram do Laboratório Merck, com prévia determinação da pureza química.

Como condições de trabalho no cromatógrafo, por meio do desenvolvimento de um método na estação de trabalho, adotou-se o seguinte: temperatura de 250⁰C para o detector e 240⁰C para o injetor; volume de injeção de 1µl, em razão de split de 15; nitrogênio como gás de arraste a 7,8 psi por 2',

passando a 10,6 psi (1,27 psi · min⁻¹) e, finalmente, chegando a 14 psi (1,27 psi · min⁻¹); fluxo da fase móvel a 0,8 mL · min⁻¹; temperatura da coluna Carbowax 20M (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ) a 32^oC por 2', chegando a 100^oC (10^oC · min⁻¹) e, finalmente, a 180^oC (30^oC · min⁻¹). O tempo total da corrida foi de 11,47 minutos.

Na preparação da solução de calibração utilizada (Figura 5), primeiramente foi determinado o tempo de retenção na coluna para cada composto a ser analisado (acetaldeído, acetato de etila, metanol, etanol, n-propanol, isobutanol, isoamílico, amílico e hexanol). Estes compostos foram adquiridos de três laboratórios diferentes, quais sejam: álcoois superiores (n-propanol, isobutanol, isoamílico, amílico e hexanol) do Laboratório Sigma-Aldrich; acetaldeído do Laboratório Supelco e os demais compostos do Laboratório Merck. Eles foram injetados individualmente, juntamente com a solução de padrão interno, objetivando constatar a pureza química e determinar a concentração a ser adotada em função da concentração esperada nas amostras a serem analisadas. Em seguida, foram preparadas as soluções padrões, as quais, juntamente a solução de padrão interno, constituíram as soluções de calibrações.

As amostras de mosto a serem injetadas foram previamente preparadas por centrifugação a 5000 rpm a 4^oC, seguida de filtração em filtro “millipore”, enquanto que, para as amostras de destilados, foi adotado somente o processo de filtração em filtro “millipore”. As amostras na quantidade de 0,5 mL, acrescida de 1,0 mL da solução de padrão interno, foram injetadas após a solução de calibração, em três repetições.

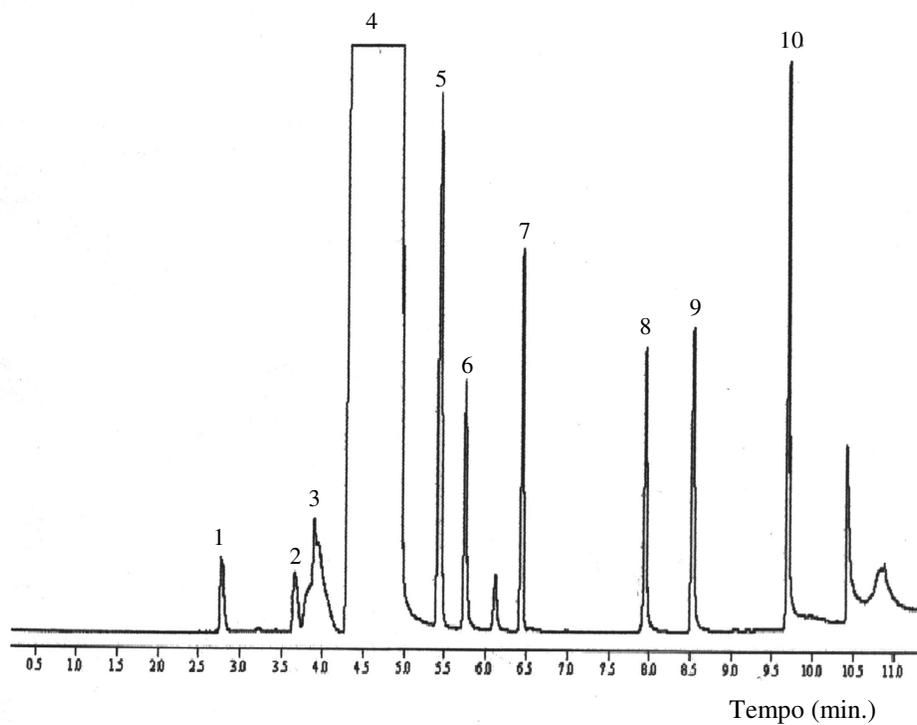


FIGURA 5 Cromatograma CG - Varian 3800 - FID, pela injeção da solução de calibração. Coluna cromatográfica Cwax 20 M (30 m x 0,25 mm D. I. x 0,25 μ de filme da fase estacionária); os números de 1 a 10 indicam os seguintes picos de compostos: (1) acetaldeído; (2) acetato de etila; (3) metanol; (4) solvente; (5) padrão interno - tolueno; (6) 1-propanol; (7) isobutanol; (8) álcool isoamílico; (9) álcool amílico e (10) 1-hexanol.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Processo de produção da aguardente de banana

4.1.1 Análise da polpa, caldo de banana e torta de filtro

A relação polpa/casca encontrada foi de 1,72, significando que, em média, de 100 kg de banana ‘Nanicão’, foram obtidos 63,3 kg de polpa e 36,7 kg de casca. Resultados próximos foram encontrados por Almeida (1935), que observou uma relação de 1,6. Apesar do resultado encontrado ter sido superior ao encontrado por Almeida (1935), a literatura retrata índices maiores para a banana madura (Chitarra & Chitarra, 1994). Segundo Bleinroth (1990), a relação polpa/casca é um índice confiável para observar o grau de maturação da banana. Contudo, segundo citações de Lichtemberg (1999), outros aspectos deverão ser considerados. Quando o cacho é colhido em estádios de desenvolvimento dos frutos mais precoces, anteriores a ‘3/4 gordo’, o rendimento pode ser de 65% ou menos, representando uma relação polpa/casca inferior a 1,85 para a banana do subgrupo Cavendish.

O teor de sólidos solúveis totais (SST) encontrado na polpa in natura variou entre 23,2° a 24,0°Brix, valor semelhante ao encontrado por Medina et al. (1998) para a banana ‘Nanicão’, que foi de 24,1°Brix. A densidade do mosto a 15°Brix de sólidos solúveis foi de 1,06, estando dentro da faixa sugerida por Almeida (1935), que é de 1,02 a 1,06. A porcentagem da fração fibra encontrada foi de 0,6%, estando dentro da faixa citada por Nogueira & Torrezan (1999) para cinco cultivares de banana. Estes autores relataram valores de 0,3% a 0,9%, com valor de 0,6% para a banana ‘Nanica’. Os teores de açúcares encontrados na polpa in natura foram de 8,64% para os redutores, 12,21% para os não redutores e 21,72% para açúcares totais.

Observando-se a Tabela 5, percebe-se que, durante o processo de preparação da polpa para a fermentação, anteriormente a inoculação da levedura, o pH oscilou de 4,99 a 4,46. Este decréscimo observado foi gradativo entre cada etapa e parece ter contribuído para a redução de bactérias contaminantes. A acidez total titulável de 0,31% encontrada é próxima à observada por Medina et al. (1998) para a banana ‘Nanicão’, que foi de 0,29%. Os teores de 1,94% de amido e 73,38% de umidade (Tabela 5), juntamente com o teor de 21,72% de açúcares encontrados na polpa, neste trabalho, são condizentes com os relatados por Wills (1998), para a banana do subgrupo Cavendish e por Nogueira & Torrezan (1999) para a banana ‘Nanica’. Observou-se um aumento no teor de fenólicos totais, acompanhado de escurecimento na superfície do caldo, em função da ação de enzimas na presença do oxigênio do ar.

TABELA 5 Média das análises químicas realizadas antes do processo fermentativo e torta de filtro, nas três fermentações sucessivas.

Etapa	pH	ATT (%)	CFT (mg/100g)	Amido (%)	Umidade (%)
1	4,99	0,31	61,08	1,94	73,38
2	4,69	0,42	70,66	1,55	72,09
3	4,63	0,32	61,57	1,21	81,73
4	4,62	0,28	63,65	1,06	80,55
5	4,57	0,35	73,61	0,97	81,37
6	4,46	0,33	73,56	1,06	82,75
7	4,21	0,33	83,08	1,41	83,45

1) banana in natura; 2) após descongelamento; 3) após diluição; 4) após aquecimento; 5) antes da enzima; 6) 1 hora após a enzima; 7) torta de filtro; ATT) acidez total titulável; FT) fenólicos totais.

Analisando-se a Tabela 6, observa-se que a polpa de banana apresenta os principais nutrientes requeridos pela levedura, com destaque para nitrogênio e

potássio, estando próximos aos citados por Nogueira & Torrezam (1999) para a banana 'Nanica'. Na torta de filtro, o nitrogênio e o potássio também se destacam em relação aos demais minerais. Contudo, comparativamente a polpa, na torta de filtro observou-se maior concentração de nitrogênio e menor para o potássio, possivelmente em função do maior grau de solubilidade do potássio em relação ao nitrogênio, constituinte das proteínas. Para os microelementos, com exceção do boro, foram observados maiores concentrações na torta de filtro do que no caldo e na polpa, o que não era esperado pelo fato desses microelementos serem solúveis neste meio, passando facilmente para o filtrado. Possivelmente podem ter ocorrido contaminações advindos do material da prensa.

TABELA 6 Teores de minerais contidos na polpa, caldo de banana e torta de filtro.

Minerais		Polpa de banana	Caldo de banana a 15 ^o Brix	Torta de filtro
Macroelementos (%)	N	0,250	0,220	0,640
	P	0,030	0,027	0,040
	K	0,430	0,388	0,230
	Ca	0,020	0,018	0,002
	Mg	0,020	0,018	0,020
	S	0,020	0,018	0,005
Microelementos (ppm)	B	2,100	1,894	1,590
	Cu	2,310	2,083	8,700
	Mn	1,790	1,614	1,900
	Zn	2,710	2,444	4,380
	Fe	8,900	8,025	15,000

4.1.2 Tratamento enzimático

No presente trabalho, a enzima pectinolítica Pectinex®, na concentração de 0,025% (v · p⁻¹), propiciou um rendimento médio de mosto filtrado de 81,12% (p · p⁻¹), valor superior aos 61,1% obtidos por Cardoso et al. (1999) e aos 71%, em média, obtidos por Mumyanganize & Coppens (1974) por meio de centrifugação, para a extração do suco de banana. Os valores encontrados, contudo, estão próximos aos obtidos via prensagem (Mumyanganize & Coppens, 1974; 1976; Dupaigne, 1974), que situou-se na faixa de 85% a 88%. Resultados semelhantes foram obtidos com o uso da cal viva a 0,5% (Dupaigne, 1974; & Mumyanganize & Coppens, 1976), situando-se na faixa de 82% a 88%.

4.2 Avaliação do processo fermentativo

O mosto de banana foi fermentado por 72 horas em dorna de aço inóx (Tabela 6 A), até que o teor de sólidos solúveis totais atingisse a estabilidade. Com 18 horas de fermentação observou-se uma intensa formação de bolhas, indicando alta taxa de conversão dos açúcares em álcool e CO₂ (Figura 6 B). No entanto, decorrido o período de 60 horas de fermentação, a presença de bolhas resultantes da fermentação alcoólica somente ocorreu esporadicamente (Figura 6 C), podendo ser observadas na superfície do mosto, várias perfurações, devido ao desprendimento de CO₂ ocorrido. Com 72 horas, observou-se total ausência de bolhas.

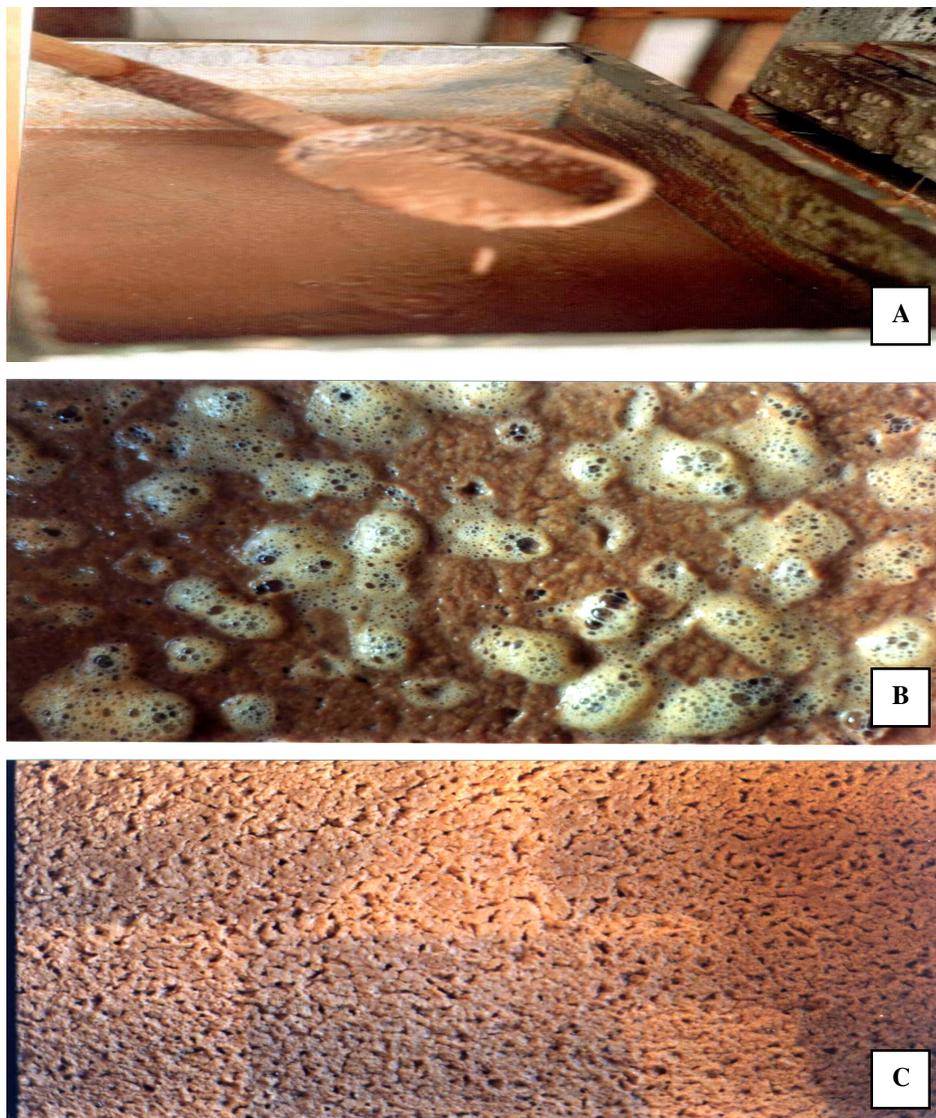


FIGURA 6 Dorna e aspecto da superfície do mosto em fermentação: (6 A) Dorna de fermentação com o mosto durante o processo fermentativo; (6 B) 18 horas de fermentação, com formação intensa de bolhas de CO_2 ; (6 C) 60 horas de fermentação, presença esporádica de bolhas de CO_2 .

Na Figura 7, é possível visualizar as diferentes fases fermentativas no perfil. Durante a fermentação (Figura 7 A), notou-se a formação de uma camada mais compacta na parte superior ou “chapéu”, segundo Almeida (1935), bem como a ocorrência da expansão do volume do mosto. Isto ocorre, principalmente, devido à pressão exercida pelos gases liberados (CO_2) da fermentação, sendo mais acentuado conforme a intensidade fermentativa. Após 60 horas de fermentação (Figura 7 B), esta camada foi se desfazendo, sendo parte decantada e não mais sendo observada. Decorrido este período o volume fermentativo retornou ao volume inicial e com pouco desprendimento de CO_2 , indicando uma baixa intensidade de fermentação alcoólica nesta fase.

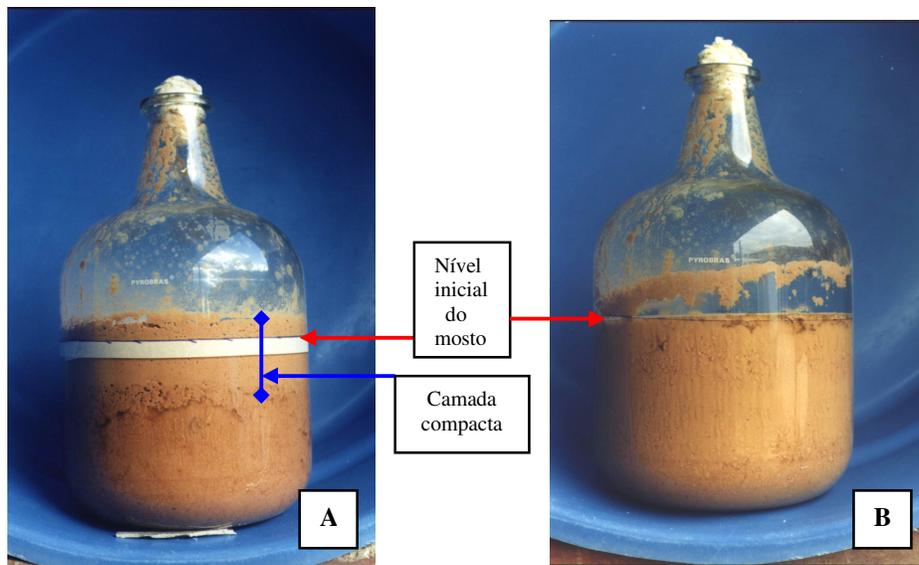


FIGURA 7 Aspectos da fermentação no perfil: (A) formação da camada compacta e expansão do volume do mosto durante a fabricação da aguardente de banana; (B) 60 horas de fermentação, mostrando o desaparecimento da camada compacta e o retorno ao volume inicial do mosto.

4.2.1 Acompanhamento microbiológico e parâmetros fermentativos

A população de levedura foi acompanhada por meio da contagem de células viáveis (unidade formadora de colônia – UFC) em placa com meio de cultura WL e por microscopia (células · mL⁻¹). Observando-se a Figura 8, pode-se verificar que não ocorreram contaminações microbianas por bactérias ou por outras leveduras que apresentassem morfologia de colônia diferente da *Saccharomyces cerevisiae* CA-1174 inoculada.

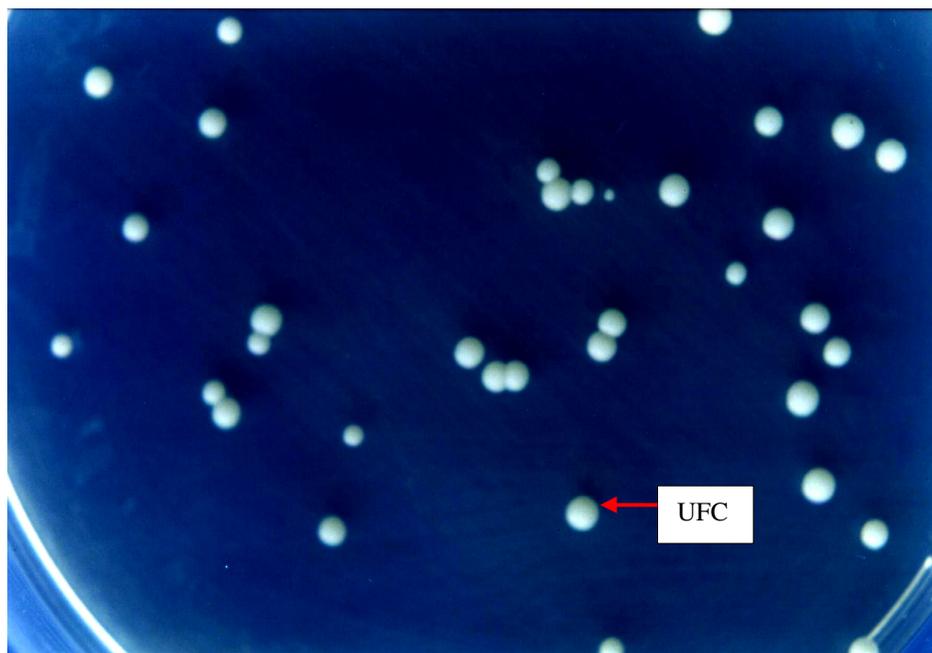


FIGURA 8 Contagem de células viáveis (unidade formadora de colônia – UFC) de *Saccharomyces cerevisiae* CA-1174, em meio de cultura WL (DIFCO), durante o processo fermentativo de mosto de banana.

Pelo exposto na Tabela 7, pode ser observado que as leituras de contagem de leveduras (leveduras · mL⁻¹) efetuadas em microscópio e em meio de cultura (UFC · mL⁻¹), mostraram-se semelhantes ao final da fermentação, com a viabilidade média das leveduras de 87,32%, indicando que o mosto de banana ofereceu boas condições de desenvolvimento. Em função da multiplicação de células ocorridas, percebe-se que ao final da terceira fermentação consecutiva, a manutenção da população de levedura foi possibilitada, apesar da redução da viabilidade no decorrer das mesmas.

TABELA 7 Contagem da população inicial e final do inóculo realizado em microscópio (células · mL⁻¹) e por meio de plaqueamento em meio de cultura WL (UFC), durante as três fermentações sucessivas

Inóculo e viabilidade	População nas respectivas fermentações			Média
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	
Inóculo inicial*	1,00 x 10 ⁸ (1,08 x 10 ⁷)	1,36 x 10 ⁸ (2,99 x 10 ⁷)	7,11 x 10 ⁷ (5,35 x 10 ⁷)	1,03 x 10 ⁸ (3,11 x 10 ⁷)
Inóculo final	2,05 x 10 ⁸	9,80 x 10 ⁷	1,41 x 10 ⁸	1,49 x 10 ⁸
Inóculo final viável*	1,95 x 10 ⁸ (1,10 x 10 ⁸)	8,60 x 10 ⁷ (1,09 x 10 ⁸)	1,10 x 10 ⁸ (1,37 x 10 ⁸)	1,30 x 10 ⁸ (1,16 x 10 ⁸)
Viabilidade (%)	95,20	87,75	79,00	87,32

*valores entre parênteses foram obtidos em meio de cultura WL (UFC · mL⁻¹), e sem o parênteses ao microscópio em câmara de Neubauer (células células · mL⁻¹).

Pelos dados da Tabela 8, observa-se que em média, a população de leveduras nas três fermentações em bateladas sucessivas foi de $1,08 \times 10^8$ UFC \cdot mL⁻¹. As temperaturas do mosto variaram entre 35^o e 23^oC, e o pH iniciou com 4,05 chegando ao final a 3,62, o que era esperado, devido à produção de ácidos pelas leveduras. A concentração de sólidos solúveis totais iniciou com valores de 15^oBrix e, a partir de 60 horas, manteve-se constante, com leitura igual a 5,30^oBrix. No entanto, pela quantificação dos açúcares totais, redutores e não redutores não foram constatados teores significativos de açúcares a partir deste período, sendo atribuída aos diversos componentes do mosto a manutenção das leituras maiores que zero pelo refratômetro.

TABELA 8 Média da evolução da população de leveduras em meio de cultura WL (UFC \cdot mL⁻¹) e outros parâmetros físico-químicos observados durante as três fermentações sucessivas.

Tempo (horas)	Leveduras UFC \cdot mL ⁻¹	Temperatura (°C)	Sólidos solúveis totais (°Brix)	pH	Açúcares redutores (%)	Açúcares não redutores (%)	Açúcares totais (%)
0	$3,11 \times 10^7$	35	15,00	4,05	10,44	3,81	14,25
6	$1,02 \times 10^7$	29	14,00	3,98	8,85	3,72	12,57
12	$7,40 \times 10^7$	27	11,30	3,97	7,39	0,82	8,21
18	$1,56 \times 10^8$	28	9,60	3,79	4,72	0,60	5,32
24	$1,37 \times 10^8$	29	7,70	3,76	3,36	0,18	3,54
30	$1,39 \times 10^8$	26	6,60	3,76	1,42	0,19	1,61
36	$1,43 \times 10^8$	25	6,30	3,76	0,68	0,14	0,82
42	$1,37 \times 10^8$	24	6,10	3,76	0,35	0,37	0,72
48	$1,08 \times 10^8$	25	5,50	3,74	0,35	0,22	0,57
54	$1,09 \times 10^8$	24	5,50	3,72	0,22	0,21	0,43
60	$1,37 \times 10^8$	23	5,30	3,69	0,21	0,11	0,32
66	$1,20 \times 10^8$	24	5,30	3,62	0,18	0,10	0,28
72	$1,09 \times 10^8$	24	5,30	3,62	0,16	0,10	0,26

4.1.2 Metabólitos analisados durante as fermentações

Por meio da cromatografia gasosa (Figura 9), pode-se observar a concentração média de cinco metabólitos secundário produzidos durante as três fermentações (acetaldeído, metanol, n-propanol, isobutanol e álcool isoamílico). Em média, ao final de 72 horas de fermentação, os valores encontrados para os compostos secundários mencionados, foram, respectivamente: 7,45; 16,25; 26,96; 8,28 e 27,62 mg · 100mL de mosto⁻¹, sendo estes valores superiores aos reportados na literatura em outras fermentações. Campos (2003), analisando os mesmos compostos secundários, com três cepas diferentes de *Saccharomyces cerevisiae* (RL-11, CA-116 e FC-9) na fermentação da cachaça, observou, em média, 3,86; 0,73; 3,93; 5,35 e 16,77 mg · 100mL de mosto⁻¹. Isto demonstra ter ocorrido influência da matéria-prima a ser fermentada e/ou leveduras na produção dos produtos secundários, bem como o tempo de fermentação adotado de 72 horas, superior ao da cachaça, que normalmente se realiza em 24 horas.

Na fermentação do mosto de banana, a grande proporção de produção da maioria dos compostos avaliados ocorreu nas primeiras 24 horas. Para os compostos acetaldeído e metanol foram observados tendências decrescentes na concentração ao longo do processo fermentativo, ressaltando-se que, para o acetaldeído, esta observação surgiu após às 18 horas de fermentação.

O acetaldeído é considerado intermediário na formação dos álcoois superiores (Chaves & Póvoa, 1992), e este aumento até às 18 horas de fermentação é coincidente com a produção crescente desses álcoois. Segundo Valsechi (1990), o acetaldeído é originado da ação de enzimas oxidantes oriundas da própria levedura ou pela oxidação do álcool por influência do oxigênio do ar. Os altos valores iniciais do acetaldeído apresentados, possivelmente, podem estar relacionados à ação direta de algumas enzimas oxidantes oriundas da própria levedura.

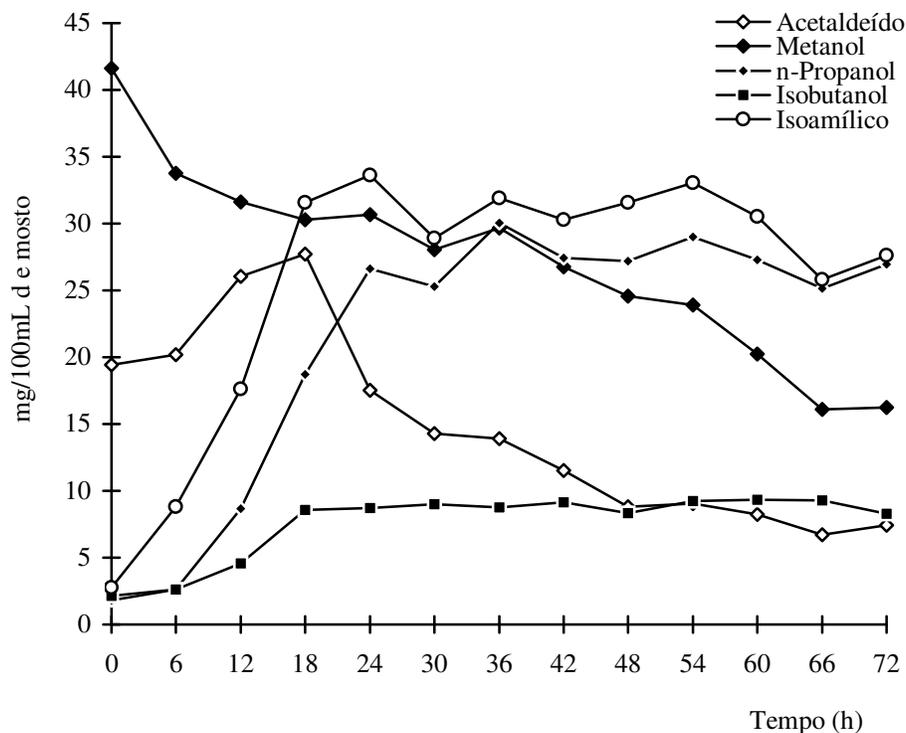


FIGURA 9 Concentração média ($\text{mg} \cdot 100\text{mL de mosto}^{-1}$) de cinco metabólitos secundários produzidos durante 72 horas de fermentação do mosto de banana, em três bateladas sucessivas, obtidos por meio da cromatografia gasosa.

A maior concentração de metanol ocorreu no início do processo fermentativo, possivelmente devido à atuação da enzima pectinolítica, liberando metanol por meio da quebra promovida na molécula de pectina presente na polpa da banana. Cleto (2000), em estudos sobre o efeito da lecitina em mosto de cana-de-açúcar, laranja e uva, nas análises das aguardentes produzidas, constatou total ausência de metanol, o que atribuiu ao processo tecnológico empregado, qual seja: filtração, clarificação, centrifugação, pasteurização e

concentração, não permitindo a passagem de materiais que contivessem pectina, para a fermentação.

Dupaigne (1974), estudando a fabricação da cerveja de banana, utilizou a cal viva (0,5%) em substituição à enzima. Segundo o autor, a pectina é facilmente eliminada antes da fermentação, por meio da filtração, devido à formação do pectato de cálcio.

Foi observada grande produção de álcoois superiores. Estes álcoois são formados, em parte, pela degradação de aminoácidos, mas também pelo metabolismo da levedura a partir de açúcares (Rose, 1977). Entretanto, de acordo com Crowell et al. (1961) e Ingraham & Guymon (1960), citados por Cleto (2000), 75% da mistura de álcoois homólogos superior, na fermentação por leveduras, provêm do metabolismo de açúcar do meio, e apenas 25% de aminoácidos exógenos.

A produção de álcoois superiores no processo fermentativo da banana foi crescente até o período de 24 horas de fermentação e com tendência similar entre estes álcoois, contudo, em concentrações diferenciadas. Após este período, as concentrações destes álcoois mantiveram-se constantes até o final do processo de fermentação. Produções crescentes de álcoois superiores até 20 horas foram constatadas por Ribeiro & Horri (1999) em estudos com três linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação de caldo de cana-de-açúcar, sendo duas floculantes, das quais uma não produtora de sulfeto de hidrogênio. A linhagem não produtora de sulfeto de hidrogênio produziu maior quantidade de álcoois superiores, o que já era esperado segundo o autor, por ser uma característica típica desta linhagem.

A presença de acetato de etila, álcool amílico e 1-hexanol constatada durante as 72 horas de fermentação foram, em média de 2,97, 2,42 e 1,10 mg · 100 mL de mosto⁻¹, respectivamente. Não foi possível a confecção de curvas para cada tempo amostrado, devido à ausência de valores em algumas amostras,

favorecida pela baixa concentração apresentada destas substâncias durante a fermentação.

Pela Figura 10, pode-se observar a conversão do açúcar a etanol durante a fermentação. Com 72 horas de fermentação, praticamente todo o açúcar já havia sido transformado e a maior concentração de etanol apresentada. Nestas circunstâncias, sugere-se terminar a fermentação, evitando possíveis contaminações. É interessante ressaltar que cerca de 94% do açúcar foram consumidos até 30 horas de fermentação.

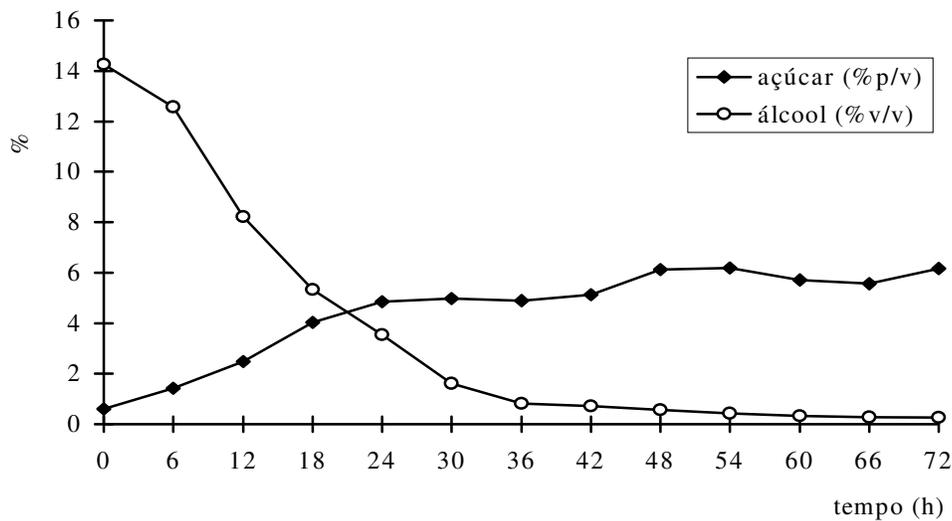


FIGURA 10 Média das concentrações de açúcar e álcool em 72 horas de fermentação, durante as três fermentações sucessivas.

4.2.3 Rendimento e análise da bebida

O rendimento médio da aguardente obtido foi de 66,52% do rendimento teórico, sendo desprezadas para efeito de cálculo em ambos, as frações de

“cabeça” e “cauda”, normalmente retiradas na obtenção da aguardente e que representam proporcionalmente ao grau alcoólico, 20% da aguardente produzida. É opcional o retorno em destilações posteriores, por possuir, ainda quantidades significativas de etanol.

O rendimento teórico, está relacionado à produção de etanol originada da metabolização do açúcar pela via glicolítica (EMP). Cada grama de açúcar redutor e não redutor resulta na produção de 0,511 e 0,538 g de etanol, respectivamente. A polpa de banana utilizada apresentou-se com um teor de açúcares totais de 20,85% p · p⁻¹, sendo 8,64% p · p⁻¹ de açúcares redutores e 12,21% p · p⁻¹ de açúcares não redutores. Considerando a densidade do etanol a 20^oC (densidade = 0,79074), a produção de aguardente propriamente dita (fração “coração”), obtida com um teor alcoólico real de 43% (v · v⁻¹ a 20^oC), foi de 0,167 L · kg de polpa⁻¹ ou 0,106 L · kg de polpa⁻¹, a partir do fruto inteiro (rendimento de polpa = 63,28% p · p⁻¹). Em função do exposto, a quantidade teórica de aguardente seria de 0,252 L · kg de polpa⁻¹ ou 0,159 L · kg de polpa⁻¹ a partir do fruto inteiro.

No cálculo do rendimento teórico, não é considerado o açúcar desviado para a biossíntese de material de reposição e manutenção celular das leveduras, bem como os desviados para as reações paralelas para a produção dos produtos secundários ou utilizados pelos contaminantes. Em função disso, é considerado como rendimento teórico, ou 100%, não sendo possível alcançar esta cifra na prática que, segundo Yokoya (1985) não ultrapassa a 93%.

Com relação à qualidade de bebida, na Tabela 9 encontram-se os resultados da média das análises químicas efetuadas pelo MAAb.

Foi detectada a presença de elevadas concentrações de metanol e álcoois superiores nas bebidas, estando acima do limite máximo permitido pela legislação, que estabelece 400 e 300 mg · 100 mL⁻¹ em álcool anidro, respectivamente.

Segundo Maia et al. (1993), a aeração em fermentação de cana-de-açúcar favorece a formação de álcoois superiores. O mesmo efeito pode advir da presença no mosto de materiais porosos, que funcionam como fonte de oxigênio. Temperaturas altas de fermentação e baixo pH também são causas de aumento nesta produção, chegando a 40% para temperaturas altas e 80% para valores de pH entre 3,0 a 4,2.

TABELA 9 Média das análises químicas das aguardentes de banana realizadas segundo Método Oficial do MAAb (Ministério da Agricultura e do Abastecimento), nas três fermentações sucessivas.

Ítems analisados	Aguardente
Exame organoléptico	Normal
Densidade relativa (20 °C)	0,94
Cobre (mg · L ⁻¹)	3,64
Extrato seco a 100 ^o C (g · L ⁻¹)	0,06
Grau alcoólico real a 20 ^o C (% v · v ¹)	43
Acidez volátil em ácido acético (mg · 100mL álcool anidro ⁻¹)	41,37
Álcool superior (mg · 100mL álcool anidro ⁻¹)	449,80
Aldeídos em aldeído acético (mg · 100mL álcool anidro ⁻¹)	27,66
Ésteres em acetato de etila (mg · 100mL álcool anidro ⁻¹)	32,84
Soma dos componentes secundários (mg · 100mL álcool anidro ⁻¹)	544,55
Álcool metílico (mg · 100mL álcool anidro ⁻¹)	420,67

No mosto de banana, existe a presença de uma camada espessa e porosa na superfície, possibilitando o acesso de oxigênio do ar ao mosto. A necessidade de homogeneizações constantes do mosto para coleta das amostras, possivelmente também contribuiu para este aumento dos álcoois superiores, oxigenando o mosto. Há de ser considerada ainda a via de formação destes álcoois que, em parte, advêm dos aminoácidos contidos nas proteínas. O mosto de banana, proporcionalmente ao mosto de cana-de-açúcar, possui maiores concentrações de nitrogênio, presente nas proteínas.

As altas concentrações de metanol possivelmente são consequência da atuação da enzima pectinase e do metabolismo das leveduras sobre as pectinas (polímeros de ácido galacturônico), onde, dependendo do grau de metoxilação da pectina e do local da ocorrência da quebra da molécula, pode ocorrer maior liberação de moléculas de metanol. Segundo Basié et al. (1998), apesar do metanol ser um componente de presença comum em *brandy* de frutas, tem sido alta a incidência de amostras com concentrações acima dos limites estabelecidos pela legislação, situando-se em torno de 33% das 58 amostras analisadas. Brocks et al. (1983) relataram a ocorrência de envenenamentos devido ao consumo de *brandy* de ameixa.

Observou-se, nas bebidas analisadas pela cromatografia, a presença de teores de acetaldeído superior aos $30 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ de álcool anidro permitidos pela legislação, e pela análise efetuada, segundo o MAAb, valores próximos a este limite. Segundo Chaves & Póvoa (1990), os aldeídos são considerados intermediários na formação dos ácidos e álcoois superior e, possivelmente, a concentração um pouco maior aqui encontrada para os aldeídos esteja associada às altas concentrações de álcoois superiores produzidos na fermentação desta bebida.

A concentração de acetato de etila observada não foi alta, o que já era esperado. Segundo Lilly et al. (2000), em *brandy* de frutas dentre muitos

compostos responsáveis pelo aroma, encontram-se os ésteres e, o aroma característico apresentado pelo *brandy* de banana durante a fermentação é primeiramente, devido ao éster acetato de isoamila. Maia et al. (1993) destacam que a maior parte da concentração de ésteres encontrada em fermentações alcoólicas ocorre por meio do metabolismo intracelular, via reação entre o acetato e o etanol e demais álcoois. Uma parte menor acha-se associada à etapa de maturação e envelhecimento da aguardente, geralmente com duração insuficiente para permitir reações de esterificação em níveis apreciáveis.

Pelas análises cromatográficas, o teor de etanol observado foi de 41,86% v · v¹. Na Tabela 10, foram observados valores acima do permitido pela legislação para álcoois superiores por cromatografia gasosa, tal qual, as realizadas pelo Método Oficial do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAAb), contudo, com valores maiores. Segundo Araújo & Ferreira (1975), estas diferenças ocorrem devido a uma baixa correlação entre as análises para álcoois superiores realizadas pelo método espectrofotométrico e cromatográfico. Os autores concluem que quanto maior for a presença do álcool superior 1-propanol, maiores serão estas diferenças, com valores menores para o método espectrofotométrico. O 1-propanol não é eficientemente detectado na análise espectrofotométrica, em virtude da fraca reação com o reagente dimetilaminbenzaldeído (DMAB) utilizado, resultando em menor intensidade de cor, subestimando a concentração real deste álcool na amostra. Este fato confirma o maior valor de álcoois superiores encontrado em cromatografia no presente trabalho, onde se constatou elevado teor do álcool superior 1-propanol. A alta concentração dos álcoois superiores observada, deve-se principalmente ao 1-propanol e ao álcool isoamílicos. O metanol foi detectado em concentração próxima ao limite superior de 400 mg · 100 mL⁻¹ de álcool anidro permitido pela legislação (Nogato et al., 2001).

TABELA 10 Média das concentrações dos compostos químicos ($\text{mg} \cdot 100 \text{mL}$ de álcool anidro⁻¹) analisados por cromatografia gasosa na aguardente de banana, produzida a partir de três fermentações sucessivas.

Metabólitos	Concentrações ($\text{mg} \cdot 100 \text{mL}$ álcool anidro ⁻¹)
Acetaldeído	37,50
Acetato de etila	21,10
Metanol	398,85
1-propanol	409,50
Isobutanol	152,88
Isoamílico	406,67
Amílico	7,82
1-hexanol	1,43

Pelo cromatograma (Figura 11), observam-se os picos referente aos compostos secundários analisados em amostra da aguardente de banana, com o tempo de corrida de 11,47 minutos.

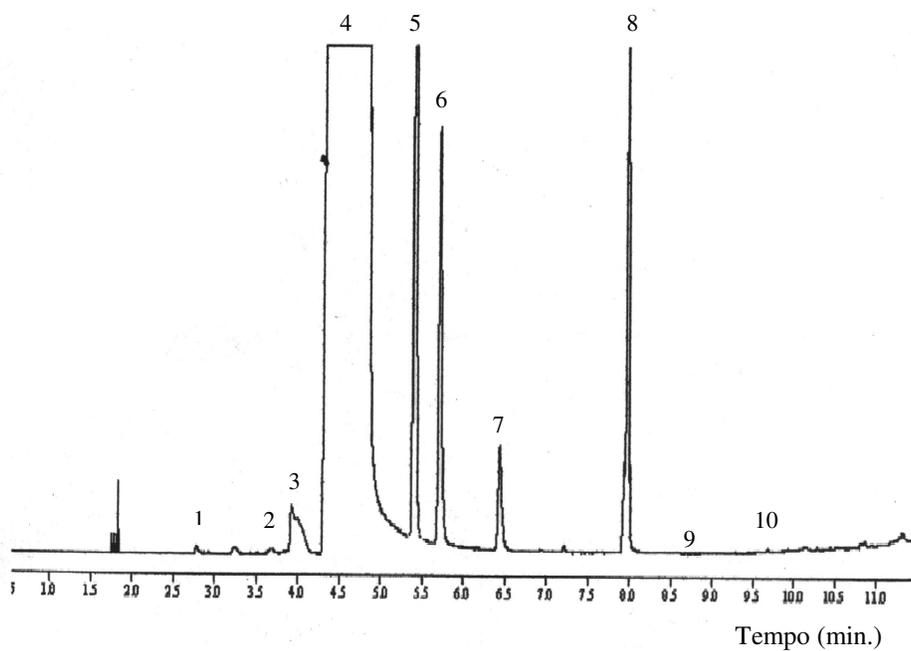


FIGURA 11 Cromatograma CG - Varian 3800 - FID da aguardente de banana pela injeção de amostra. Coluna cromatográfica Cwax 20 M (30m x 0,25 mm D. I. x 0,25 μ de filme da fase estacionária), sendo os números de 1 a 10 indicando os seguintes picos de compostos: (1) acetaldeído, (2) acetato de etila, (3) metanol, (4) solvente, (5) padrão interno – tolueno, (6) 1-propanol, (7) isobutanol, (8) álcool isoamílico, (9) álcool amílico e (10) 1-hexanol.

5 CONCLUSÕES

Nas condições deste trabalho, por meio dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- o uso da enzima Pectinex[®], a 0,025% (v · p^l), facilitou o processo de filtração com prensagem e propiciou um rendimento de 81,12%;
- o uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CA-1174, na fermentação da banana madura ‘Nanicão’ propiciou um rendimento em aguardente de 66,52% em relação ao rendimento teórico, o que representou, 0,167 L · kg de polpa⁻¹;
- o metanol e o acetaldeído encontraram-se em maiores concentrações no início da fermentação, declinando ao longo do processo, enquanto os álcoois superiores ocorreram com aumentos crescentes até 24 horas, mantendo-se relativamente constantes até o final;
- o período de fermentação de 72 horas para o mosto de banana madura ‘Nanicão’ foi adequado, em função da transformação praticamente total do açúcar em etanol e por apresentar as menores concentrações de metanol e álcoois superiores;
- a aguardente de banana produzida neste trabalho encontrou-se fora dos padrões, por apresentar teores de metanol e álcoois superiores acima dos limites permitidos pela legislação, indicando a necessidade de pesquisas futuras sobre a metodologia de produção dessa bebida.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pelas conclusões apresentadas, sugere-se para futuros trabalhos:

- selecionar e testar em fermentação, cepas de leveduras provenientes da banana 'Nanicão' ou outras cepas selecionadas, a exemplo das já existentes para a produção da cachaça artesanal;
- adicionar produtos ao mosto, como o farelo de arroz, que favoreçam a redução das concentrações de álcoois superiores;
- determinar o teor de pectina e grau de esterificação da banana 'Nanicão' em estágio avançado de maturação;
- avaliar a concentração do metanol presente no caldo de banana, anteriormente a introdução da enzima Pectinex[®], bem como, estudar o efeito do tratamento térmico do caldo de banana a 90^oC por uma hora, na inativação das enzimas polimetilesterase e poligalacturonase;
- testar outras enzimas pectinolíticas, ou mesmo utilizar a cal em substituição à enzima, segundo metodologia citada por alguns autores (Dupaigne, 1974; Mumyanganizi & Coppens 1974 e 1976).
- Estudar mais detalhadamente a destilação da aguardente de banana, estabelecendo o melhor ponto de corte das três frações;
- Buscar otimizar o processo produtivo, por meio da padronização e determinação das etapas críticas que possam influenciar no rendimento, a exemplo da temperatura e pH do mosto.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. R. de. Fabricação de álcool e da pinga de banana. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 10, n. 3/5, p. 125-48, mar./maio 1935.
- ALVES, D. M. G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros**. 1994. 251 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.
- ALVES, E. J.; MEDINA, V. M.; OLIVEIRA, M. de A. Colheita e manejo pós-colheita. In: ALVES, E. J. (Ed.). **A cultura da banana: aspectos técnicos, sócio econômicos e agroindustriais**. Brasília: EMBRAPA-SPI; Cruz das Almas: CNPMF, 1999a. cap. 2, p. 35-46.
- ALVES, E. J.; OLIVEIRA, M. de A. L.; DANTAS, J. L. L.; OLIVEIRA, de S. L. Exigências climáticas. In: ALVES, E. J. (Ed.). **A cultura da banana: aspectos técnicos, sócio econômicos e agroindustriais**. Brasília: EMBRAPA-SPI; Cruz das Almas: CNPMF, 1999b. cap. 2, p. 35-46.
- AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. Infecção na fermentação: como evitá-la. **Álcool & Açúcar**, São Paulo, v. 5, n. 21, p. 12-14, mar./abr. 1981.
- ARAÚJO, R.; FERREIRA, T. B. C. Características das bebidas alcoólicas brasileiras. **Informativo do Instituto Nacional de Tecnologia**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 7, p. 8-21, 1975.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15. ed. Washington, 1990. 2 v.
- BADOLATO, D. S. G.; DURAN, M. C. Risco de intoxicação por metanol pela ingestão de bebidas alcoólicas. **Revista de Psiquiatria Clínica**, São Paulo, v. 27, n. 2, 2000.
- BASIÉ, Z.; MAKSIMOVÍÉ, M.; JAKOVIJEVIÉ, L. J.; OBRADOVIÉ, G. Methanol as an index of a fruit brandies toxicity or naturalness. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 95, p. 159, July 1998. Supplement.
- BASSINELLO, P. Z.; FIORAVANTE, A. P.; NASCIMENTO, do J. R. O.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Distribuição da sacarose-fosfato sintase

e sacarose sintase em bananas durante o amadurecimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 1, p. 102-106, jan./abr. 1999.

BASSO, L. C. Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desenvolvimento fermentativo. In: AMORIM, H. V. **Processo de produção de álcool**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1996. p. 50-80.

BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Efeito do arejamento sobre a fermentação. **Relatório Fermentec**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1998. p. 26-46.

BIO-RAD. Pulsed field electrophoresis systems: instructions manual and application guide. United States of America: **Bio-Rad Laboratories**, 1992. (catalog numbers 170 - 3612 through 170-3729).

BLEINROTH, E. W. Matéria-prima. In: SÃO PAULO (Estado). Secretaria da Agricultura - Coordenadoria da Pesquisa Agropecuária. **Banana: da cultura ao processamento e comercialização**. 2. ed. Campinas: ITAL, 1990. p. 133-196. (ITAL. Séries Frutas Tropicais, 3).

BLINDLER, F.; VOGES, E.; LAUGEL, P. The problem of metanol concentration admissible in distilled fruit spirits. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 5, n. 3, p. 343-51, July/Sept. 1988.

BOUDHRIUA, N.; GIAMPAOLI, P.; BONAZZI, C. Changes in aromatic components of banana during ripening and air-drying. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, San Diego, v. 36, n. 6, p. 633-642, 2003.

BOSCOLO, M.; BEZERRA, C. W. B.; CARDOSO, D. R.; LIMA NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Identificação and dosage by HRGC of minor alcohols and esteres in Brazilian sugar-cane spirit. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 11, n. 1, p. 86-90, Jan./Feb. 2000.

BRASIL. Portaria Ministerial n^o 371, 9 de set. de 1981. [Estabelece a complementação dos padrões de identidade e qualidade para os destilados alcoólicos]. Brasília.

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Portaria n^o 76, 27 de nov. de 1986 do Min. Da Agricultura. **Diário Oficial da União**, Brasília, n^o 232, 3 de dez. de 1986. Seção I, p. 18153. [Aprova os métodos analíticos, que passam a constituir padrões oficiais para análise de bebidas e vinagre, na forma estabelecida pelo Decreto n^o 73267, de 06-12-1973].

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Decreto nº 2314 de 4 de set. de 1997. **Diário Oficial da União**. Brasília, nº 171, 5 de set. de 1997. Seção 1, p. 19556. [Regulamenta a Lei nº 8918, de 14-07-94, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e fiscalização de bebidas].

BRASIL. Ministério da Integração Social. **Banana**. Brasília, 2000. 8 p. (FrutiSeries, 6).

BROCKS, K; ERIKSEN, N.; JONSSON, V.; HANSEN, M.; BRAHM, M; HERTZ, J.; JORGENSEN, B. C.; WINTTHERREIK, B. 4 simultaneous cases of methanol poisoning caused by home-made plum brandy. **Ugeskrift for Laeger**, Kjobenhavn, v. 145, n. 4, p. 232-234, Jan. 1983.

CABRINI, K, T.; GALLO, C. R. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do estado de São Paulo, Brasil. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 56, n. 1, p. 207-15, Jan./mar. 1999.

CAMPOS, C. R. **Uso de cepas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* na produção de cachaça**. 2003. 105 p. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CANO, M. P.; ANCOS, B. de; MATAALLANA, M. C.; CAMARA, M.; REGLERO, G.; TABERA, J. Differences among Spanish and Latin-American banana cultivars: morphological, chemical and sensory characteristics. **Food Chemistry**, Oxford, v. 59, n. 3, p. 411-419, July 1997.

CARDELLO, H. M. A. B.; FARIA, J. B. F. Modificações físico-químicas e sensoriais de aguardente de cana durante o envelhecimento em tonel de carvalho (*Quercus alba* L.). **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 15, n. 2, p. 87-100, jul./dez. 1997.

CARDOSO, M. das G. Análise físico-químicas de aguardente. In: CARDOSO, M. das G. (Ed.). **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. Lavras: UFLA, 2001. p. 152-73.

CARDOSO, M. H.; MENEZES, H. C. de; JACKIX, M. de N.; GONÇALVES, E. B. Efeito dos complexos enzimáticos clarificantes Clarex e CEC1-CTAA sobre a qualidade do suco de banana. Brasília. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 5, p. 849-854, maio 1999.

CHAVES, J. B. P.; PÓVOA, M. E. B. A qualidade da aguardente de cana-de-açúcar. In: MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. (Ed.) . **Aguardente de cana: produção e qualidade**. Jaboticabal. FUNEP, 1992. p. 93-132.

CHITARRA, A. B.; CHITARRA, M. I. F. Pós-colheita da banana: qualidade dos frutos-I. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 17, n. 179, p. 41-47, 1994.

CLEMENTE, P. R. Análise sensorial. In: CARDOSO, M. das G. (Ed.). **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. Lavras: UFLA, 2001. p. 174-83.

CLETO, F. V. G. **Ação da lecitina no processo fermentativo, rendimento e composição das aguardentes em mosto de cana-de-açúcar, laranja e uva**. 2000. 73 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

CRISPIM, J. E. et al. **Manual da produção de aguardente de qualidade**. Guaíba: Agropecuária. 2000. 333 p.

CROWELL, E. A . et al. Techniques for studying the mechanism of higher alcohol formation by yeast. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 12, p. 111-116, 1961

DIAS, D. R. **Elaboração de bebidas fermentada a partir de frutas tropicais**. 2001. 130 p. Dissertação (Mestrado Microbiologia de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DOAUDT, C. A.; OUGH, C. S. Efeitos da variedade de microrganismos, temperatura SO₂ e variedade de uva sobre a formação de álcoois superiores. **Revista Brasileira de Tecnologia**, Brasília, v. 6, n. 4, p. 301-305, dez. 1975.

DUPAIGNE, P. A propos de l'extraction d'un jus de banane, en vue de la production de la bière de banane. **Fruits**, Paris, v. 29, n. 12, p.185-191, dec. 1974.

EDWARDS, C. G.; POWERS, J. R.; JENSEN, K. A.; WELLER, K. M.; PETERSON, J. C. Lactobacillus spp. from Washington State wines: isolation and characterization. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 2, p. 453-458, Mar./Apr. 1993.

FAO. **Yearbook Production**. Rome, 2001. v. 55.

- FINK, H.; KUHLES, R. Beitrage zur methylenblau farbung der lefezellmembran. **Happe - Seylers Zeitschrift fur Physiologische Chemie**, amsterdam, n. 218, p. 65-66, 1993.
- GOLDSTEIN, J. L.; SWAIN, T. Changes in tannins in ripening fruits. **Phytochemistry**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 371-382, Dec. 1963.
- GASWAMI, B.; BORTHAKUR, A . Chemical and biochemical aspects of developing culinary banana (*Musa ABB*) 'Kachkal'. **Food Chemistry**, Oxford, v. 55, n. 2, p. 169-172, 1996.
- HAMMOND, J. B.; EGG, R.; DIGGINS, D.; COBLE, G. C. Alcohol from bananas. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 56, n. 1, p. 125-30, Apr. 1996.
- HARDISSON, A.; RUBIO, C.; BAEZ, A.; MARTIN, M.; AVAREZ, R.; DIAZ, E. Mineral composition of the banana (*Musa acuminata*) fon the island of Tenerife. **Food Chemistry**, Oxford, v. 73, n. 2, p. 153-161, May 2001.
- HASHIZUME, T. Fundamentos de tecnologia do vinho. In: AQUARONE, D.; LIMA, U. de. A.; BORZANI, W. (Ed.). **Alimentos e bebidas produzidas por fermentação**. São Paulo: Blucher. 1983. v. 5. p. 14-43.
- HENNEMBERG, G. Laudw. Vers. Sta., 6:1864. In: WINTON, A. L.; WINTON, K. B. **Analysis de alimentos**. Buenos Aires, Hispano Americana, 1947. p. 76.
- INGRAHAM, J. L.; GUYMON, J. F. The formation of higher aliphatic alcohols by mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Biochemistry Biophysics**, New York, v. 88. p. 157-156, 1960.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do ITAL: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo, 1990. v. 1. 533 p.
- JORDÁN, M. J.; TANDON, K.; SHAW, P. E.; GOODNER, K. L. Aromatic profile of aqueous banana essence and banana fruit by ga chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography-olfactometry (GC-O). **Journal of Agriculture Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 10, p. 4813-4817, Oct. 2001.
- KAJI, D. A . **Influência da temperatura e infecção láctica na fermentação alcoólica**. 1989. 136 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) -

Universidade de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The Yest: a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier, 1998. 1055 p.

LICHTENBERG, L. A. Colheita e pós-colheita da banana. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 196, p. 73-90, 1999.

LILLY, M.; LAMBRECHTS, M. G.; PRETORIUS, I. S. Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillate. University of Stellenbosch, ZA-7600 Stellenbosch, South Africa. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 2, p. 744-753, Feb. 2000.

LIMA, U. de A. Aguardente. In: AQUARONE, D.; LIMA, U. de A.; BORZANI, W. (Ed.). **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Blucher, 1983. n. 5, p. 79-103.

LIMA, U. A.; GOLDONI, J. S.; CEREDA, M. P.; SOUZA, L. G. Ocorrência de microrganismos em caldo bruto, caldo misto e água de embebição em uma usina de açúcar de cana. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 4, p. 33-43, 1935.

LINDINGER, W.; TAUCHER, J.; JORDAN, A.; HANSEL, A.; VOGEL, W. Endogenous production of methanol after the consumption of fruit. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, Baltimore, v. 21, n. 5, p. 939-943, Aug. 1997.

LIZADA, M. C. C.; PANTASTICO, E. B.; SHUKOR, A. R. A.; SABARI, S. D. Ripening in banana; changes during ripening in banana. In: HASSAN, A.; PANTASTICO, E. B. **Banana fruit development, postharvest physiology, handling and marketing in Asean**. Boston, 1990. p. 65-84.

LY-NGUYEN, B.; VAN LOEY, A. M.; FACHIN, D.; VERLENT, I.; DUVETTER, T.; VU, S. T.; SMOUT, C.; HENDRICKX, M. E. Strawberry pectin methylesterase (PME): purification, characterization, thermal and high-pressure inactivation. **Biotechnology Progress**, Washington, v. 18, n. 6, p. 1447-1450, Dec. 2001.

MACEDO, L. C. H. **Álcool etílico: da cachaça ao cereal**. São Paulo: Ícone. 1993. 157 p.

- MAIA, A. B.; PEREIRA, A. J. G.; SCHWABE, W. K. **Primeiro curso de tecnologia para produção de aguardente de qualidade.** Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG e Fundação Cristiano Ottoni. 1993. 65 p.
- MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 25, n. 1, p. 103-121, 1983.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípio e aplicações.** 2. ed. Piracicaba: POTAFÓS, 1996. 319 p.
- MARTINS, Z. de; TRAVAGLINI, D. A; OKADA, M.; QUAST, D. G.; HASHIZUME, T. Processamento: produtos, características e utilização. In: ITAL (Campinas, SP). **Banana: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos.** 2. ed. rev. Campinas, 1985. p. 197-267. (ITAL. Série Frutas Tropicais, 3).
- MASCARENHAS, G. C. C. Banana: Comercialização e Mercados. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 196, p. 97-108, jan./fev. 1999.
- MEDINA, J. C. Banana. In: INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. **Banana: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos.** 2. ed. rev. Campinas, 1985. p. 1-131. (ITAL. Série Frutas Tropicais, 3).
- MEDINA, V. M.; SILVA, S. de O. e.; CERQUEIRA, R. C. Evaluacion de las características de la maduración po cosecha de genotipos de banano. In: REUNIÓN DE LA ASOCIACIÓN PARA LA COOPERACIÓN EN INVESTIGACIONES DE BANANO EN EL CARIBE, EN EL AMERICA TROPICAL (Acorbat 98), 1998, Guayaquil, Equador. **Memorian...** Guayaquil, Equador, 1998. p. 167-78.
- MELUSSI, O.; KAWAMOTO, O. S. Banana. In: COORDENADORIA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA INTEGRAL. **Manual técnico das culturas.** Campinas, 1986. p. 100-110.
- MORAIS, P. B.; ROSA, C. A.; LINARDI, V. R.; PATARO, C.; MAIA, A. B. R. A . Characterization and succession of yeast population associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian suga-cane aguardente. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, London, v. 13, n. 2, p. 241-243, Mar. 1997.

MOSHA, D.; WANGABO, J.; MHINZI, G. African traditional brews: how safe are they? **Food Chemistry**, Oxford, v. 57, n. 2, p. 205-209, Oct. 1996.

MOTTA, R. B.; MOTTA, S. **A banana e sua riqueza em caroteno**. Rio de Janeiro: SAPS, 1958. 29 p. (SAPS. Coleção Estudo e Pesquisa Alimentar, 44).

MUMYANGANIZI, B.; COPPENS, R. Comparison of 3 methods for extracting banana juice from 2 different varieties. **Industries Alimentaires et Agricoles**. Paris, v. 93, n. 6, p. 707-711, 1976.

MUMYANGANIZI, B.; COPPENS, R. Extraction of banana juice. **Industries Alimentaires et Agricoles**, Paris, v. 91, n. 3, p. 185-191, 1974.

MWESIGYE, P. K.; OKURUT, T. O. A survey of the production and consumption of traditional alcoholic beverages in Uganda. **Process Biochemistry**, Kampala, v. 30, n. 6, p. 497-501, 1995.

NASCIMENTO, A. M. do. **Isolamento e seleção de leveduras produtoras de fator “killer” para aplicação na produção de bebidas alcoólicas**. 1994. 74 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP

NASCIMENTO, R. F.; MARQUES, J. C.; LIMA NETO, B. S.; KEUKELEIRE, D. de; FRANCO, D. W. Qualitative and quantitative high-performance liquid chromatographic analysis of aldehydes in Brazilian sugar cane spirits and other distilled alcoholic beverages. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 782, n. 1, p. 23-23, Oct. 1997.

NELSON, N. A photometric adaptation of Somogy method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemists**, Baltimore, v. 153, n. 1, p. 375-384, July 1994.

NIELSEN, J. C.; RICHELIEU, M. Control of flavor development in wine during and after melolatic fermentation by *Oenococcus oeni*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 2, p. 740-745, Feb. 1999.

NOGATO, L. A. F.; DURAN, M. G.; CARUSO, M. S. F.; BARSOTTI, R. C. F.; BADOLATO, D. S. G. Monitoramento da autenticidade de amostras de bebidas alcoólicas enviadas ao Instituto Adolfo Lutz em São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 39-42, jan./abr. 2001.

NOGUEIRA, R. I.; TORREAZAN, R. Processamento e industrialização. In: ALVES, E. J. (Ed.). **A cultura da banana: Aspectos Técnicos, Socioeconômicos e Agroindustriais**, 2. ed. Brasília: EMBRAPA-SP, 1999. cap. 19, p. 545-581.

OLIVA NETO, P. de. **Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada**. 1990. 207 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 64, n. 1, p. 34-50, Mar. 2000.

OURA, E. Reaction products of yeast fermentation. **Process Biochemistry**, Kampala, v. 12, n. 3, p. 19-21, 1977.

PALMER, J. K. The banana. In: HULME, A. C. **Biochemistry of fruits and their products**. New York: Academic Press, 1971. V.2, cap. 2, p. 65-105.

PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO, V. Interaction of the effects of acetic acid and ethanol on inhibition of fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 11, n. 4, p. 269-274, 1989.

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

PHEENTVEERAT, A.; ANPRUNG, P. Effect of pectinases, cellulases and amylases on production of banana juice. **Food**, v. 23, n. 3, p. 188-196, 1993.

PRABHA, T. N.; BHAGYALAKSHMI, N. Carbohydrate metabolism on ripening banana fruit. **Phytochemistry**, Oxford, v. 48, n. 6, p. 915-919, July 1998.

QI, B.; MOORE, K. G.; ORCHARD, J. Effect of cooking on banana and plantain texture. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 9, p. 4221-4226, Sept. 2000.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos**: fundamentos, matérias primas agrícolas, produtos e processos. Pelotas: UFPel, 1996. v. 1, 327 p.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos**: produção de enzimas e engenharia das fermentações. Pelotas: UFPel, 2000. v. 3, 218 p.

RIAHI, E.; RAMASWAMY, H. S. High-pressure processing of apple juice: kinetics of pectin methyl esterase inactivation. **Biotechnology Progress**, Washington, v. 19, p. 908-914, May/June 2003.

RIBEIRO, C. A. F.; HORII, J. Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 56, n. 2, p. 255-264, abr./jun. 1999.

RODRIGUES FILHO, A.; OLIVEIRA, R. N. de. **Tecnologia de produção de cana-de-açúcar e cachaça de Minas de qualidade**. EMATER-MG. 1999. 75 p.

ROMANO, P.; SUZZI, G. Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 2, p. 309-315, Feb. 1996.

ROSE, A. H. Alcoholic beverages. In: ROSE, A. H. **Economic microbiology**. Londres: Academic Press, 1977. v. 1, 760 p.

SCHWAN, R. F.; MENDONÇA, A. T.; da SILVA, J. J. Jr.; RODRIGUES, V.; WHEALS, A. E. Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. **Antonie Van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, Dordrecht, v. 79, n. 1, p. 89-96, Jan. 2001.

SCHWAN, R. F.; CASTRO, H. A. de. Fermentação. In: CARDOSO, M. das G. (Ed.). **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. Lavras: UFLA, 2001. p. 113-26.

SEBRAE-MG. **Diagnóstico da cachaça de Minas Gerais**. Belo Horizonte, 2001. 259 p.

SILVA, T. G. das; REGINA, M. A. de; ROSIER, J. P.; RIZZON, L. A.; CHALFUN, N. N. J. Diagnóstico vinícola do Sul de Minas Gerais: teores de minerais dos vinhos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 632-637, jul./set. 1999.

SIMPKINS, W. A. Congenes prodiles in the detection of illicit spirits. **Journal of Science and Food Agriculture**, London, v. 36, n. 5, p. 367-376, May 1985.

SOUZA, J. da S.; TORRES FILHO, P. Mercado. In: ALVES, E. J. (Ed.). **A cultura da banana: aspectos técnicos, Socioeconômicos e Agroindustriais**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-SP, 1999. cap. 18, p. 525-544.

TEWARI, H. K.; MARWAHA, S. S.; RUPAL, K. Ethanol from banana peels. **Agricultural Wastes**, Oxford, v. 16, n. 2, p. 135-146, 1986.

TOCCHINI, R. P.; LARA, J. C. C. Industrialização do suco de banana simples e concentrado. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 51, p. 93-112, maio/jun. 1997.

TORIJA, E.; DÍEZ, C. L.; MATELLANA, C.; CAMARA, M.; CAMACHO, E.; MAZARÍO, P. Influence of freezing process on free sugars content of papaya and banana fruits. **Journal of Food Science and Agriculture**, London, v. 76, p. 315-319, 1998.

VALSECHI, O. **Aguardente de cana-de-açúcar**. 5. ed. Piracicaba: Livrocere, 1990. 126 p.

WEEB, A. D.; INGRAHAN, J. L. Fusel oil. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 5, p. 317-353, 1963.

WILLS, R. H. H.; LEE, T. H.; GLASSON, W. B.; GRAHAM, D.; JOYCE, D. **Postharvest: an Introduction to the physiology and handling of fruits, vegetables & ornamentals**. 4. ed. Sidney, Australia: CAB International, 1998. 262 p.

WYLLIE, S. G.; FELLMAN, J. K. Formation of volatile branched chain esters in bananas (*Musa sapientum* L.). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 8, p. 3493-3496, Aug. 2000.

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

