



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Amanda Jordano Aquino

**Análise dos compostos flavorizantes da cana-de-açúcar e
otimização da aplicação de extratos ricos em β -glicosidases para
liberação de aroma na produção de aguardente de cana.**

São José do Rio Preto
2013

Amanda Jordano Aquino

**Análise dos compostos flavorizantes da cana-de-açúcar e
otimização da aplicação de extratos ricos em β -glicosidases para
liberação de aroma na produção de aguardente de cana.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação Química do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Boscolo.
Co-Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva.

**São José do Rio Preto
2013**

Aquino, Amanda Jordano.

Análise dos compostos flavorizantes da cana-de-açúcar e otimização da aplicação de extratos ricos em β -glicosidases para liberação de aroma na produção de aguardente de cana. / Amanda Jordano Aquino. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2013.

74 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Maurício Boscolo

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Enzimas - Aplicações industriais. 2. Bebidas - Sabor e aroma. 3. Aguardente. I. Silva, Roberto da. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 663.15

Amanda Jordano Aquino

**Análise dos compostos flavorizantes da cana-de-açúcar e
otimização da aplicação de extratos ricos em β -glicosidases para
liberação de aroma na produção de aguardente de cana.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação Química do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Boscolo.
Co-Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto da Silva
UNESP – São José do Rio Preto
Co-Orientador

Prof. Dr. Vanildo Del Bianchi
UNESP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Milla Alves Baffi
UFU – Uberlândia

**São José do Rio Preto
2013**

Dedico:

À minha mãe (Joana), Irmãos (Leandro, Vinicius e Juliane), Sogra (Marta), sogro (Jairo), cunhados (César, Lilian e Elaine) pelas palavras de força e carinho em todos os momentos.

Ao meu companheiro Pedro Luiz da Mota e Aquino pela paciência, compreensão e apoio nas horas difíceis.

Deus pela graça de ter me permitido concluir este trabalho.

EPÍGRAFE

“A persistência é o melhor caminho para o êxito”.
(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo, Pedro Luiz da Mota e Aquino, que me incentivou e esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. Dr. Maurício Boscolo, pela orientação e confiança depositada.

Ao Prof. Dr. Roberto da Silva e à Prof^a. Dr^a. Milla Alves Baffi pela confiança e bolsa TT3 concedida sendo fundamental para o meu ingresso no mestrado.

Ao Prof. Dr. Vanildo Del Bianchi pelos conselhos.

Aos amigos Janaína Pires Borges e José Carlos Quiles Junior, pelo companheirismo e auxílio.

A Daniela, técnica de laboratório e amiga, que foi de grande importância para finalização deste projeto.

Aos amigos do laboratório, pelos agradáveis momentos e incentivo: Ana Lucia Ferrarezi, Gisele Martins, Andréia, Fabiana, Gabriel, Carol B., Carol, Diego e todos os outros não menos importantes.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências exatas – IBILCE/UNESP pela atenção e eficiência.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

Aos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A aceitação de bebidas destiladas deriva principalmente de pequenas concentrações de numerosos compostos flavorizantes incluindo alcoóis superiores (óleo fúsel), ésteres, aldeídos, acetais, ácidos, cetonas, lactonas, fenóis voláteis, monoterpenos e norisoprenóides. Dentro deste contexto, para a melhora da qualidade da aguardente de cana-de-açúcar faz-se necessário pesquisas em aplicações tecnológicas e biotecnológicas que visem acentuar o sabor e o aroma, além do desenvolvimento de metodologias de analítica. Assim, neste trabalho foi analisado 21 variedades de cana-de-açúcar, sendo que na variedade SP813250 foi encontrado alta concentração do aldeído 2,6-decadienal, composto de aroma desagradável na produção de bebidas destiladas, e as variedades RB855536, RB987935 e RB975952 produziu grande diversidade e quantidade de voláteis favoráveis ao aroma de bebidas alcólicas o que leva a inferir que estas variedades possam ser melhor indicadas para a produção de aguardente de cana e além disto, foi possível constatar que maior quantidade de voláteis foram obtidos na casca e nos nódulos da planta. Após a etapa de seleção variáveis para catálise enzimática foram indicadas pelo delineamento fatorial fracionado as seguintes condições: (i) o extrato do fungo *Thermoascus aurantiacus*, (ii) aplicação pós-fermentação alcoólica, (iii) Brix 16°, (iv) agitação de 200 rpm. Para a fase de otimização foram variados a concentração de extrato enzimático e tempo de aplicação assim, verificou-se aumento da concentração de terpenóides e norisoprenóides como limoneno, terpineol, isoeugenol, 4-alildimetoxibenzeno, α -ionona e linalol em função do tempo de hidrólise e da concentração de β -glicosidase. Nerolidol, 2,6,10,10-tetrametil-1-oxa-espiro-(4,5)-dec-6-eno e β -damascenona tiveram aumento da concentração proporcionalmente a atividade enzimática levando a inferir que outras enzimas possam estar atuando no processo e compostos como mirtenol e β -ionona foram liberados com aumento do tempo de hidrólise.

Palavras-chave: Aguardente de cana. Aromas. Terpenos. Norisoprenóides. Variedades de cana-de-açúcar. Headspace-SPME-GC-MS. Delineamento fatorial. β -glicosidase.

ABSTRACT

The acceptance of liquor derives primarily numerous small concentrations of flavor compounds including higher alcohols (fuel oil), esters, aldehydes, acetals, acids, ketones, lactones, phenols volatile monoterpenes and norisoprenóides. Within this context, to improve the quality of sugar cane-sugar is necessary technological research and biotechnological applications aimed accentuate the flavor and aroma, and the development of analytical methodologies. Thus, this study was analyzed 21 varieties of cane sugar, and the variety SP813250 found high concentration of aldehyde 2,6-decadienal, unpleasant aroma compound in the production of distilled spirits, and the varieties RB855536, RB987935 and RB975952 produced great diversity and quantity of volatile friendly aroma of alcohol which leads to the inference that these varieties may be better suited for the production of sugar cane and in addition, it was found that greater amounts of volatiles were obtained from the bark and nodules of the plant. After the selection stage variables for enzymatic catalysis are indicated by fractional factorial design with the following conditions: (i) the extract of the fungus *Thermoascus aurantiacus*, (ii) applying post-alcoholic fermentation, (iii) 16° Brix, (iv) stirring 200 rpm. For the optimization phase were varied concentration of enzyme extract and application time thus found to increase the concentration of norisoprenóides as limonene and terpenoid, terpineol, isoeugenol, 4-allyldimethylbenzene, α -ionone and linalool as a function of hydrolysis time and the concentration of β -glucosidase. Nerolidol, 2,6,10,10-tetramethyl-1-oxa-spiro-(4,5)-dec-6-ene and β -damascenone concentration had increased proportionately enzymatic activity leading to infer that other enzymes may be acting in the process and how myrtenol compounds and β -ionone were released with increasing hydrolysis time.

Keywords: sugarcane brandy. Aromas. Terpenes. Norisoprenóides. Varieties of cane sugar. Headspace-SPME-GC-MS. Factorial design. β -glucosidase.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO GLICOSÍDEO TERPÊNICO VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA POR B-GLICOSIDASE.	15
FIGURA 2. VIAS PARA FORMAÇÃO DOS COMPOSTOS DE AROMA E SABOR DURANTE A FERMENTAÇÃO (YOKOYA, 1995).....	16
FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA CONSTITUINTE DAS CADEIAS ORGÂNICAS DOS TERPENOS E TERPINEÓIDES (ISOPRENO E UNIDADE ISOPRÊNICA).	19
FIGURA 4. VIAS DE DEGRADAÇÃO DOS CAROTENOIDES NEOXANTINA (4A) E B-CAROTENO(4B), ADAPTADA. (WINTHERHALTER; ROUSEFF, 2002).....	21
FIGURA 5. SÍTIOS DE ATUAÇÃO DO COMPLEXO CELULOLÍTICO (PALMA-FERNANDEZ, 2002).	22
FIGURA 6. TIPOS DE REVESTIMENTOS DA FIBRA DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA(SPME) E SUAS FÓRMULAS ESTRUTURAIS. (DAMASCENO, 2007).	24
FIGURA 7. HOLDER E FIBRA PARA MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA - SPME (VIEIRA, 2007).	25
FIGURA 8. TIPOS DE APLICAÇÕES PARA FIBRA DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA - SPME (VIEIRA, 2007).	25
FIGURA 9. FIGURA ESQUEMÁTICA DO FRACIONAMENTO DA CANA-DE-AÇÚCAR PARA ANÁLISE DOS VOLÁTEIS EM FUNÇÃO DA ALTURA DIVIDIDA EM 4 SEGMENTOS DA PARTE SUPERIOR ATÉ A RAIZ, FIGURA 9A, E FRACIONAMENTO EM FUNÇÃO DO ENTRE-NÓ E NÓDULO, DIVIDIDA EM 5 SEGMENTOS, FIGURA 9B.	34
FIGURA 10. TRATAMENTO DOS DADOS PARA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS – PCA. .	44
FIGURA 11. ANÁLISE DO NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS(PCs).....	45
FIGURA 12. DIFERENCIAÇÃO DAS VARIEDADES PELAS COMPONENTES PRINCIPAIS PC1 E PC2 – GRÁFICO DE LOADINGS(17A), E SCORES(17B).	46
FIGURA 13. DISTRIBUIÇÃO DOS VOLÁTEIS NAS 21 VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR ESTUDADAS.	47
FIGURA 14. DISTRIBUIÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS NA CASCA E POLPA DA VARIEDADE RB975952.....	48
FIGURA 15. DISTRIBUIÇÃO DOS VOLÁTEIS EM FUNÇÃO DA ALTURA DAS VARIEDADES DE CANA-DE-ACÚCAR RB987935, RB975952 E RB975033.	51

FIGURA 16. DISTRIBUIÇÃO DOS VOLÁTEIS EM FUNÇÃO DA REGIÃO NÓ E ENTRE-NOS DAS VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR RB987935, RB97595 E RB975033.	50
FIGURA 17. pH ÓTIMO DOS EXTRATOS RICOS EM B-GLICOSIDASE DE ATUAÇÃO NO SUBSTRATO PNPBG PRODUZIDOS PELOS FUNGOS <i>T. AURANTIACUS</i> E <i>A. NÍGER</i>	54
FIGURA 18. TEMPERATURA ÓTIMA DOS EXTRATOS RICOS EM B-GLICOSIDASE DE ATUAÇÃO NO SUBSTRATO PNPBG PRODUZIDOS PELOS FUNGOS <i>T. AURANTIACUS</i> E <i>A. NÍGER</i>	55
FIGURA 19. EFEITO DA ADIÇÃO DE ETANOL NA ATIVIDADE AOS EXTRATOS DE B-GLICOSIDASE.	56
FIGURA 20. EFEITO DA ADIÇÃO DE GLICOSE NA ATIVIDADE DOS EXTRATOS RICOS EM B- GLICOSIDASE.	56
FIGURA 21. TERPENÓIDES, TERPENOS E NORISOPRENÓIDES QUE SOFRERAM MODIFICAÇÃO COM AS VARIÁVEIS TEMPO E CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA.	62
FIGURA 22. TERPENÓIDES, TERPENOS E NORISOPRENÓIDES QUE SOFRERAM MODIFICAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO COM A VARIÁVEL CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA.	63
FIGURA 23. TERPENÓIDES, TERPENOS E NORISOPRENÓIDES QUE SOFRERAM MODIFICAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO COM A VARIÁVEL TEMPO DE INCUBAÇÃO.	63
FIGURA 24. TERPENÓIDES, TERPENOS E NORISOPRENÓIDES QUE NÃO SOFRERAM MODIFICAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO.	64
FIGURA 25. GRÁFICOS DE CONTORNO OBTIDOS COM A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MRS) DOS TERPENOS COM A INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO, A, E DO TOTAL PERCENTUAL DOS TERPENOS INDIVIDUAIS, B.	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA VOLÁTIL DE QUALIDADE ESTABELECIDADA PELA INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº13, DE 29 DE JUNHO DE 2005.	18
TABELA 2. PARÂMETROS UTILIZADOS PARA ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS VARIEDADES POR HS-TRAP-GC-MS.	35
TABELA 3. SOLUÇÕES TAMPONANTES UTILIZADAS PARA MEDIÇÃO DO PH ÓTIMO.	39
TABELA 4. DELINEAMENTO COMPLETO PARA OTIMIZAÇÃO DA ANÁLISE DE TERPENOS POR HS- SPME-GC-MS	39
TABELA 5. COMPOSTOS ANALISADOS POR GC-MS PARA OTIMIZAÇÃO DA ANÁLISE POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA, SPME	40
TABELA 6. COMPOSTOS ANALISADOS POR GC-MS PARA OTIMIZAÇÃO DA APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO.	41
TABELA 7. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL FRACIONADO 2 ⁶⁻¹ PARA O SCREENING DE VARIÁVEIS NA APLICAÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO CONCENTRADO RICO EM B- GLICOSIDASE.	42
TABELA 8. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL COMPLETO PARA OTIMIZAÇÃO DA CATÁLISE ENZIMÁTICA REALIZADO APÓS O SCREENING DE VARIÁVEIS.	42
TABELA 9. PORCENTAGEM DE CADA COMPONENTE PRINCIPAL(PCs).	45
TABELA 10. ATIVIDADE ESPECÍFICA DO EXTRATO ENZIMÁTICO DE CADA MICRO-ORGANISMO. .	53
TABELA 11. PARÂMETROS CARACTERÍSTICOS DE B-GLICOSIDASE PRODUZIDA POR A. NIGER	54
TABELA 12. VALORES MÉDIOS DA INTERAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS PARA OTIMIZAÇÃO HS- SPME.	57
TABELA 13. EFEITOS DA APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO OBTIDOS ATRAVÉS DO DELINEAMENTO FRACIONADO 2 ⁶⁻¹	58
TABELA 14. VALORES DE P INDICANDO A SIGNIFICÂNCIA DOS EFEITOS ESTIMADOS DOS VALORES DAS VARIÁVEIS OBTIDOS ATRAVÉS DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL FRACIONADO 2 ⁶⁻¹	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 CLASSES QUÍMICAS DE AROMAS PRESENTES EM AGUARDENTE DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	16
2.2 β -GLICOSIDASES: PRODUÇÃO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E INFLUÊNCIA NO AROMA E SABOR EM BEBIDAS.	22
2.4 DELINEAMENTO FATORIAL E ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS.	29
3. OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL.....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 ANÁLISE DAS VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	33
4.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS.	36
4.3 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS GC-MS.....	39
4.4 OTIMIZAÇÃO DA APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO RICO EM β -GLICOSIDASE NO CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	41
4.5 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.	42
5. RESULTADOS.....	44
5.1 ANÁLISES DE COMPOSTOS FLAVORIZANTES DA CANA-DE-AÇÚCAR, OBTIDOS POR CATÁLISE ÁCIDA, UTILIZANDO HS-TRAP-GC-MS E DIFERENCIAÇÃO DO SEU PERFIL ESTRUTURAL E VARIETAL.....	44
5.2 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO RICO EM β -GLICOSIDASE.....	53
5.3 OTIMIZAÇÃO DA ANÁLISE DE TERPENOS POR HS-SPME.	57
5.4 OTIMIZAÇÃO DA APLICAÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS.	58
6. CONCLUSÕES.....	66
7. REFERÊNCIAS	68

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A cachaça, destilado do mosto fermentado de cana-de-açúcar, é uma bebida tipicamente brasileira e vem movimentando o mercado nacional com mais de 7 bilhões de reais em 2011 e internacional sendo exportada para mais de 60 países gerando US\$ 17,28 milhões de dólares, além de fornecer ao Brasil mais de 600 mil empregos diretos e indiretos (IBRAC, 2012). Atualmente o governo federal tem investido fortemente para elevar de 1 a 10 % do volume produzido à exportação a fim de promover a bebida brasileira em outros países. (VELOSO, 2012)

Assim, pesquisas em toda a cadeia produtiva desde a seleção de cepas de leveduras, aperfeiçoamento do processo de destilação, escolha de madeiras para o envelhecimento do produto e desenvolvimento metodologias de análise que o caracterizem quanto as suas possíveis adulterações, aplicações tecnológicas que visem melhorar o sabor e aroma e etc., faz-se necessário para a melhora da qualidade aguardente de cana e conquista do mercado internacional.

Durante a fermentação alcoólica, além do álcool etílico, são produzidos congêneres secundários como os aldeídos, metanol, alcoóis superiores, ésteres, lactonas, furanos, pirazinas, ácidos orgânicos, terpenos, norisoprenóides e outros que somados representam cerca de 1% da composição dos destilados alcoólicos. Um bom balanço entre os compostos voláteis é essencial para a obtenção de bebidas de alta qualidade sensorial, o que certamente refletirá na sua melhor aceitação e maior valor agregado ao produto.

A qualidade sensorial das bebidas destiladas em geral é melhorada durante o processo de envelhecimento em tonéis de madeira no qual além de extrair substratos típicos da madeira empregada, ocorrem também reações de oxidação e de esterificação. A presença de diferentes ésteres na bebida contribui para a composição de um buquê frutado (RODRIGUES et al., 2008). Outros atributos sensoriais muito desejados em vinhos e em destilados como tequila e mezcal é o floral provenientes da presença de compostos terpênicos (LEE et al., 2000; PINO, 2007).

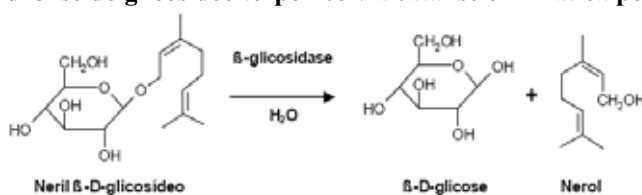
Terpenos bem como outros compostos voláteis, tais como alcoóis de cadeia linear e norisoprenóides benzênicos, contribuem para melhorar o aroma do vinho. Estes compostos odoríferos podem ocorrer livres em uvas ou ligados à molécula de açúcar para formar complexos inodoros (FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ; DI STEFANO; BRIONES, 2003). A liberação destes compostos contribui para o aroma de bebidas e alimentos sendo influenciada

pela temperatura, pH do meio e enzimas como celulases, especificamente as β -glicosidases (WILSON; STRAUSS; WILLIAMS, 1984; RAPP, 1998).

Alguns micro-organismos taxonomicamente distantes do gênero *Saccharomyces* apresentam-se como boas alternativas de fonte de β -glicosidases exógenas e estáveis em processos fermentativos, contribuindo significativamente para o atributo sensorial floral de vinhos. Deste modo, a presença de espécies não-*saccharomyces* na fermentação alcoólica leva a um potencial aumento da liberação de agliconas terpênicas. Na Figura 1 é exemplificada a reação de hidrólise do glicosídeo terpênico via catálise enzimática.

Tobal (2011) demonstrou que a aplicação de extratos enzimáticos produzidos pelos micro-organismos *Aureobasidium pullulans* e *Thermoascus aurantiacus* podem promover a liberação de terpenos no caldo de cana e uma melhora significativa na qualidade sensorial da cachaça.

Figura 1. Reação de hidrólise do glicosídeo terpênico via catálise enzimática por β -glicosidase.



Dentro deste contexto faz-se necessário o estudo da distribuição destes compostos na planta de cana-de-açúcar, bem como formas de promover a liberação dos terpenos através do processo de hidrólise enzimática realizada por extratos de diferentes micro-organismos, além do estudo sistemático da aplicação em diferentes etapas da produção de aguardente de cana.

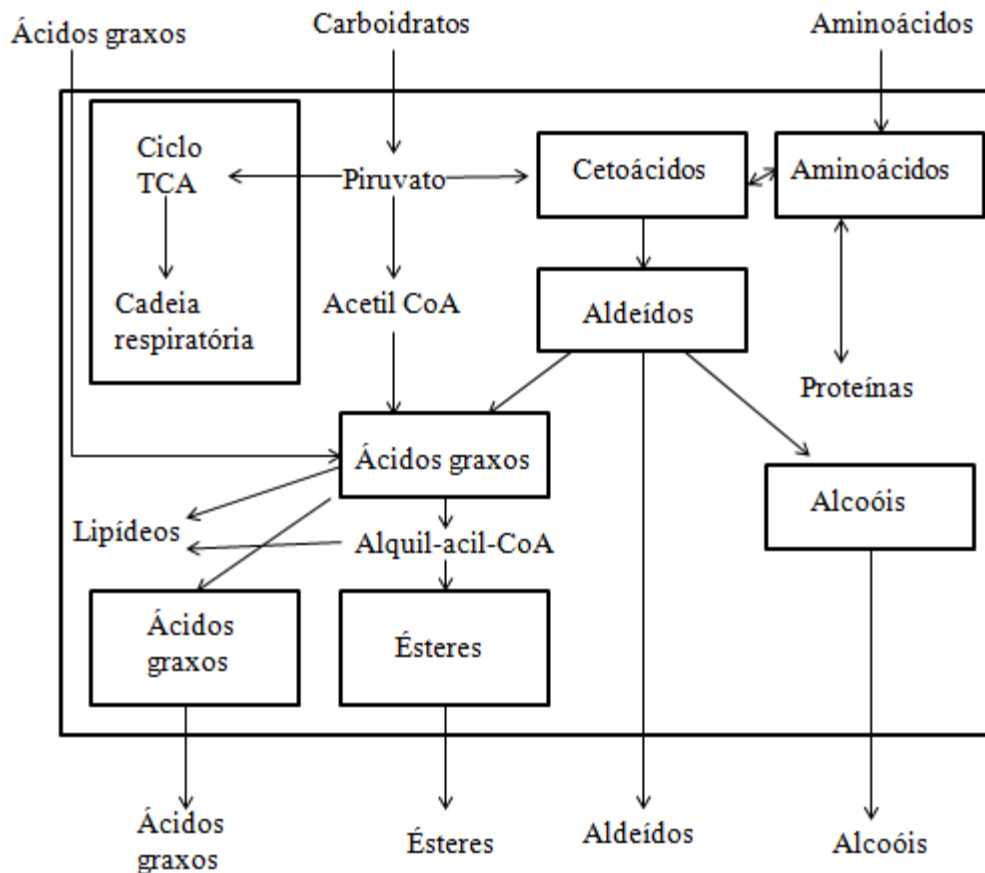
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CLASSES QUÍMICAS DE AROMAS PRESENTES EM AGUARDENTE DE CANA-DE-AÇÚCAR.

O sabor é um atributo importante para a aceitação de bebidas destiladas e deriva principalmente de pequenas concentrações de numerosos compostos flavorizantes incluindo alcoóis superiores (óleos fusel), ésteres, aldeídos, acetais, ácidos, cetonas, lactonas, monoterpenos, norisoprenóides e fenóis voláteis (JANZANTTI, 2004).

Os compostos voláteis que influenciam o aroma característico podem ser oriundos da matéria-prima usada na fabricação e que permanecem inalterados durante o processo da fermentação, destilação e envelhecimento (FARIA et al., 2003), também podem ser formados no processo de fermentação pela levedura, como demonstrado na Figura 2, (YOKOYA, 1995).

Figura 2. Vias para formação dos compostos de aroma e sabor durante a fermentação (YOKOYA, 1995).



O metanol é controlado em bebidas alcoólicas devido a efeitos nocivos aos seres humanos como dores de cabeça, cegueira ou mesmo morte, seu ponto de ebulição é de 64,7°C, inferior ao do etanol 78,4°C, justificando sua concentração mais elevada nos primeiros 10%, fração denominada cabeça, do destilado.

O etanol é o produto da fermentação em maior concentração e é também um excelente solvente para compostos odoríferos além de reduzir a acidez aparente, aumentar a doçura e ter um efeito global de suavizar gostos característicos (CARDOSO, 2006).

Os alcoóis superiores são aqueles que possuem mais que dois átomos de carbono sendo formados durante o processo oxidativo e em grande parte, das transformações dos aminoácidos durante o processo de fermentação (YOKOYA, 1995). Depois do etanol os alcoóis superiores constituem, quantitativamente, o maior grupo de substâncias voláteis nas bebidas destiladas, conferem textura ao destilado e esterificam-se durante o envelhecimento tornando a bebida mais agradável sendo também importante por sua atividade solvente de outras frações orgânicas, o que aumenta o impacto sensorial (AMERINE; BERG; CRUESS, 1972).

Os principais alcoóis superiores encontrados nas bebidas alcoólicas são: alcoóis isoamílicos (3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol), n-propílico (1-propanol), isobutílico (2-metil-1-propanol) e n-butílico (1-butanol). O álcool isoamílico é o predominante nas bebidas alcoólicas, seu conteúdo é aproximadamente metade do total da fração de alcoóis superiores (NYKÄNEN, 1986, NYKÄNEN, L.; NYKÄNEN, I., 1991).

Tanto a quantidade quanto a proporção dos ésteres influencia significativamente a percepção de aromas na aguardente. O éster em maior quantidade na cachaça é o acetato de etila, que incorpora aroma agradável de fruta, representando aproximadamente 80% de todos os ésteres da cachaça (BORZANI; LIMA; AQUARONE, 1975). Em destilados envelhecidos em tonéis de madeira são encontrados outros ésteres tais como etílicos, isobutílicos e 3-metilbutílicos (MONTEIRO, 2010)

Os ácidos orgânicos voláteis também contribuem para o sabor da cachaça, devido ao seu aroma característico, são fixadores de vários compostos flavorizantes e conferem textura às bebidas destiladas (LÉAUTÉ, 1990), entretanto se a acidez for elevada a aguardente de cana será sensorialmente desagradável (LIMA, 1964). Os ácidos orgânicos voláteis são os mais comuns em destilados sendo eles o ácido acético, láctico, fórmico, butírico, propiônico e outros em quantidades pequenas (AMERINE; BERG; CRUESS, 1972, NYKÄNEN, L.; NYKÄNEN, I. 1991) e os ácidos fixos são tartárico, cítrico e málico (NOVAES et al., 1974).

Os aldeídos são formados no processo de fermentação alcoólica e por possuir ponto de ebulição inferior ao do etanol, são separados do vinho por destilação na fração “cabeça”. Acetaldeído e aldeídos fórmicos, butírico, isobutírico, valérico e capríco possuem odor pungente e picante das bebidas, sendo que quanto menor a concentração dos mesmos maior será sua qualidade (CARDOSO, 2006), além de que a intoxicação por aldeídos pode levar a sérios problemas relacionados com sistema nervoso central e ao câncer no esôfago (IARC, 1999). Assim para os compostos mencionados a legislação brasileira estabelece limites que estão na Tabela 1.

Tabela 1. Composição química volátil de qualidade estabelecida pela Instrução Normativa nº13, de 29 de junho de 2005.

Componente	Limite	
	Mínimo (mg/100 mL álcool anidro)	Máximo (mg/100 mL álcool anidro)
Acidez volátil, em ácido acético	-	150
Ésteres, em acetato de etila	-	200
Aldeídos, em aldeído acético	-	30
Alcoóis superiores*	-	360
Coefficiente de congêneres**	200	650
Álcool metílico	-	20

*Alcoóis superiores = soma dos alcoóis isobutílico (2-metil-propanol), isoamílicos (2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol) e n-propílico (1-propanol).

** Coeficiente de congêneres = soma da acidez volátil, aldeídos, ésteres totais, furfural e hidroximetilfurfural e alcoóis superiores.

As dicetonas vicinais, principalmente 2,3-butanodiona (diacetil) e 2,3-pentanodiona, estão presentes em bebidas como cervejas, vinhos, uísque rum além da cachaça contribuindo para o aroma, porém podendo causar sabor desagradável quando em excesso (BERRY, 1995). O limiar, de percepção do odor é da ordem de 3 ppm em bebidas alcoólicas. A 2,3-butanodiona origina-se do metabolismo das leveduras pela descarboxilação oxidativa de hidroxiácidos ou contaminação por certas bactérias como *pediococcus* e *lactobacillus* que produzem também a pentanodiona (NYKÄNEN, 1986).

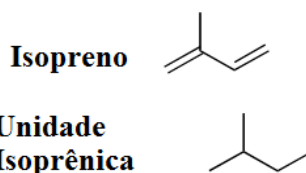
Compostos sulfurados apresentam odores desagradáveis e limites de percepção muito baixos, apresentando efeito negativo sobre o aroma das bebidas. A maioria dos compostos sulfurados presentes em bebidas alcoólicas é proveniente da matéria-prima, porém alguns podem ser produzidos pelo metabolismo das leveduras do mosto (SOUMALAINEN; LEHTONEN, 1979). Os principais compostos sulfurados presentes em cachaças e aguardentes são o sulfeto de hidrogênio e o dimetil sulfeto (BERRY, 1995). O sulfeto de hidrogênio pode ser produzido durante a degradação da metionina e cisteína, durante a autólise do fermento, no “reciclo” de proteínas ou a partir do enxofre inorgânico do meio

fermentativo sendo eliminado junto com o CO₂ formado. Em fermentações lentas e longas pode haver autólise do fermento provocando o aparecimento de odores sensorialmente negativos para a bebida. A levedura pode formar também o dimetil sulfeto (DMS) a partir de alguns precursores específicos presentes no caldo de cana como S-metil-metionina e D-dimetilsulfóxido (TOLEDO; FARIA, 2004).

Terpenos e terpenóides são duas classes de compostos de ocorrência natural que são derivados de moléculas de isopreno (Figura 3) sendo que a diferença entre terpenos e terpenóides é que o primeiro é hidrocarboneto, enquanto o segundo contém oxigênio em sua estrutura.

C13-norisoprenóides são terpenóides comumente encontrados em flores, frutos e folhas de várias plantas (WINTERHALTER; ROUSEFF, 2002) e em geral são constituintes secundários dos vegetais e são sintetizados pela Acetil CoA tendo unidades isoprênicas como intermediários (WITHERS; KEASLING, 2007) e dentre suas funções está a proteção dos vegetais contra ataques de insetos (DEGENHARDT et al., 2003).

Figura 3. Estrutura química constituinte das cadeias orgânicas dos terpenos e terpenóides (isopreno e unidade isoprênica).



Norisoprenóides com 13 carbonos como β-damascenona, β-ionona, 1,1,6-trimetil-1,2-di-hidronaftaleno (NDT) e vitispirano foram identificados em vinhos (SILVA; GUEDES, 2004) e contribuíram para aroma floral tendo um importante impacto sensorial por possuir baixos limiares olfativos de percepção, $4,5 \cdot 10^{-3}$ mg/L, (ETIÉVANT, 1991). Estes norisoprenóides podem ser formados por degradação térmica, química e/ou enzimática de compostos mais complexos carotenóides (Figura 4) presentes nas plantas.

Devido ao impacto sensorial dos terpenos, terpenóides e norisoprenóides em bebidas há estudos que diferenciam variedades de uvas (DIÉGUEZ et al., 2003) e agaves (PEÑA-ALVAREZ et al., 2004), a fim de conhecer quais são as que apresentam maior quantidade destes voláteis.

Assim como outros vegetais, a cana-de-açúcar também apresenta terpenos e terpenóides livres em sua composição como α-felandreno, α-terpineno, *p*-cimeno, limoneno, *cis-p*-2-mentenol, *trans-p*-2-mentenol, mentol, isomentol, *p*-1,3,8-mentatrieno, *trans*-β-farneseno, os quais foram detectados por SPME-GC-MS extraídos diretamente do caule da

planta, mas em concentrações muito baixas (ROCHAT et al., 2000).

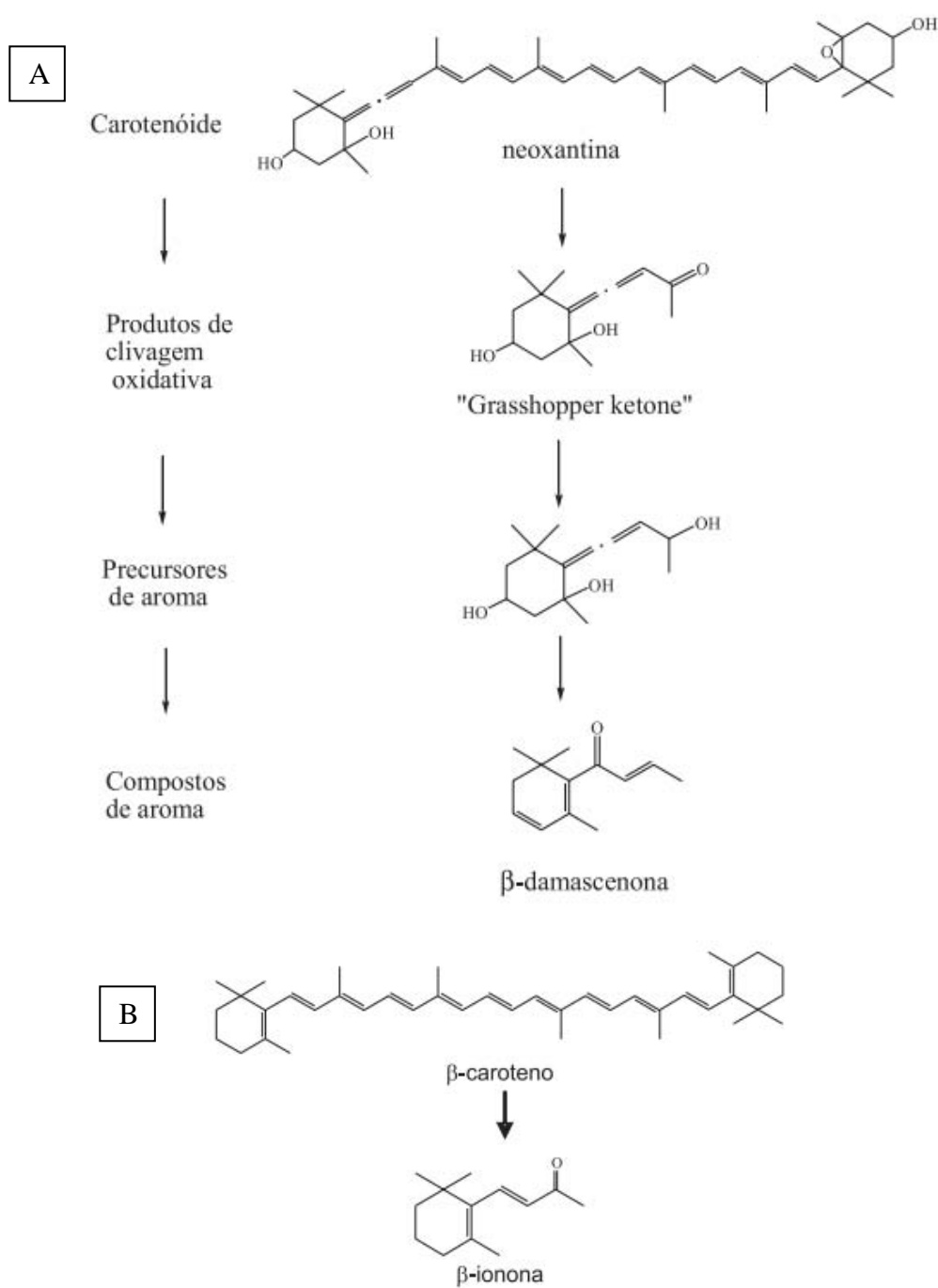
A presença de compostos terpênicos já foi relatada por diferentes autores na cachaça. Janzantti (2004) identificou e quantificou terpenos em 13 cachaças, sendo eles com os respectivas faixas de concentração dadas em $\mu\text{g/L}$: linalol ($< 2,5-47$); α -Terpineol ($< 2,1-8,8$); metionol (50-156); β -citronelol (8,6-32); α -ionona ($< 0,4-0,5$); eugenol (1,7-66); isoeugenol (2,9-12) e farnesol (8,4-313). Boscolo et al., (2000) quantificaram geraniol em 25 amostras de aguardentes por GC-FID. Souza et al., (2006) detectaram a presença de eugenol em amostras de cachaça e rum. Nonato et al., (2001) identificaram os seguintes terpenos: β -farneseno, β -citronelol, nerolidol, α -bisabolol, *cis*-farnesol por SPME-GC-MS. No rum foram identificados 16 terpenos sendo alguns deles α -pineno, mirceno, γ -terpineno, terpinoleno, *p*-cimeneno, mentona, *neo*-mentol, cadaleno, acetato de farnesila e acetato de mentila (PINO, 2007).

Os terpenos e C13 norisoprenoides estão presentes nas formas glicosilada, livre ou mesmo podem ser fruto de degradação de outros compostos complexos como os carotenóides. Glicosídeos monoterpênicos intactos são inodoros e pouco contribuem para as propriedades sensoriais dos alimentos e bebidas (CORDONNIER et al., 1989), assim devem estar livres para se tornarem voláteis e perceptíveis sensorialmente. A liberação destes compostos é influenciada pela temperatura, pH do meio e enzimas como dioxigenases e celulases, principalmente as β -glicosidases (WILSON; STRAUSS; WILLIAMS, 1984; RAPP, 1998).

Aromas oriundos de carotenóides podem ser produzidos via enzimática ou não enzimática, a clivagem não enzimática inclui foto-oxidação, auto-oxidação e degradação térmica. A biodegradação é catalisada por sistemas de dioxigenases e em geral três passos são necessários para produzir compostos voláteis a partir de carotenoide. O primeiro passo é a clivagem inicial por dioxigenases, o segundo é a transformação enzimática dos produtos iniciais de clivagem gerando intermediários polares e por fim a conversão catalisada por ácidos dos precursores não voláteis na forma ativa dos compostos de aroma (UENOJO et al., 2007).

Um exemplo desta reação é a formação de β -damascenona a partir de neoxantina (Figura 4a) em que a primeira clivagem oxidativa do precursor produz uma cetona que é reduzida enzimaticamente e convertida ao produto de interesse, por outro lado, o β -caroteno é convertido a β -ionona por meio de apenas uma clivagem (Figura 4b) (WINTHERHALTER; ROUSEFF, 2002).

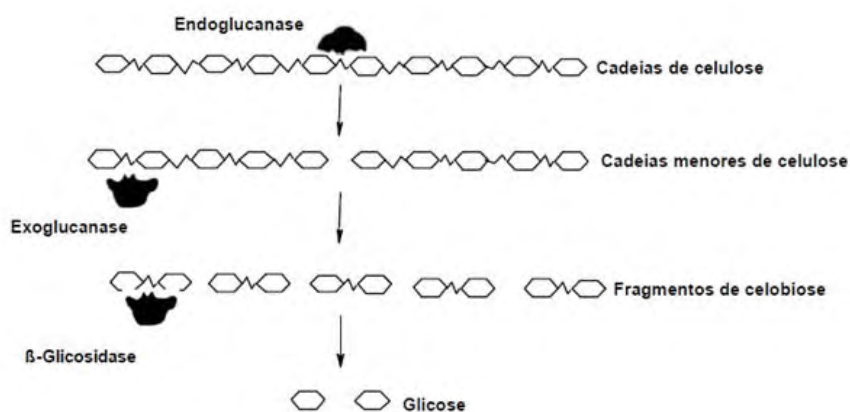
Figura 4. Vias de degradação dos carotenoides neoxantina (4a) e β -caroteno(4b), adaptada. (WINTHERHALTER; ROUSEFF, 2002).



2.2 β -GLICOSIDASES: PRODUÇÃO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E INFLUÊNCIA NO AROMA E SABOR EM BEBIDAS.

Grupos terpênicos ligados a dissacarídeos ou mesmo a oligossacarídeos derivados da estrutura celulósica do bagaço da cana de açúcar necessitam grupos de enzimas com ações específicas. A hidrólise enzimática de material celulósico até glicose envolve a ação sinérgica de no mínimo três diferentes grupos de enzimas, como exemplificado na Figura 5, endoglucanases, exoglucanases e as β -glicosidases (DA-SILVA; GOMES; FRANCO, 1997; PALMA-FERNANDEZ, 2002).

Figura 5. Sítios de atuação do complexo celulolítico (PALMA-FERNANDEZ, 2002).



Na indústria de aroma e sabor, β -glicosidases são enzimas chave na liberação de compostos flavorizantes a partir de precursores glicosídicos, os quais constituem uma importante fonte de aroma em sucos e vinhos (GÜNATA et al., 1988). β -glicosidases utilizadas em vinhos podem ser provenientes da própria uva e/ou de micro-organismos exógenos (CORDONNIER et al., 1989) sendo estas últimas as ideais para processo fermentativo pois, são estáveis em meio ácido e concentrações elevadas de glicose e etanol (10 - 15 %).

Micro-organismos como *Aspergillus niger* e *Thermoascus aurantiacus* são relatados como bons produtores de β -glicosidase (JÄGER et al., 2001; PALMA-FERNANDEZ; GOMES; DA-SILVA, 2002) produzindo enzimas com alta termoestabilidade necessárias em bioprocessos (ILLANES, 1999) além da produção de β -glicosidases por fermentação em estado sólido ser eficiente para estes micro-organismos (LEITE; GOMES; DA-SILVA, 2007, FADEL, 2000, JÄGER et al., 2001).

A fermentação no estado sólido (FES) pode ser definida como o processo que se

refere à cultura de microrganismos dentro ou sobre as partículas do substrato sólido (ou material inerte), em que o conteúdo do meio umidificante ligado a matriz sólida está com atividade de água que assegure o crescimento e metabolismo das células e não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (DEL BIANCHI et al., 2001).

A inclinação para a produção de enzimas microbianas utilizando a FES está relacionada ao cultivo de fungos filamentosos, pois as condições de crescimento da FES são semelhantes ao habitat dos mesmos, resultando em melhor adaptação às condições do meio e conseqüentemente maior produção de enzimas, reduzindo significativamente os riscos de contaminação por bactérias, além de permitir a fácil aeração, pela presença de espaços entre as partículas do substrato, e os produtos com elevada concentração da enzima de interesse (MARTINS, 2003).

A aplicação de extratos enzimáticos produzida por fermentação em estado sólido na cachaça foi recentemente estudada por Tobal (2011) em que o emprego de extratos ricos em β -glicosidases produzidas por *T. aurantiacus* no processo de fermentação contribuiu para o aumento do teor de terpenos na cachaça apresentando aroma e sabor floral mais intenso e preferido pelos provadores obtendo notas maiores em todos os atributos avaliados (aroma, sabor e impressão global). Neste mesmo trabalho não foi possível observar glicosídeos terpênicos no caldo de cana e três das quatro variedades apresentaram teores similares de terpenos livres, além disso, pode-se verificar que o uso de β -glicosidases no processo de produção da cachaça aumentou o teor de terpenos livres sem alterar os padrões de qualidade exigidos pela legislação.

2.3 ANÁLISE DE COMPOSTOS FLAVORIZANTES EM DESTILADOS.

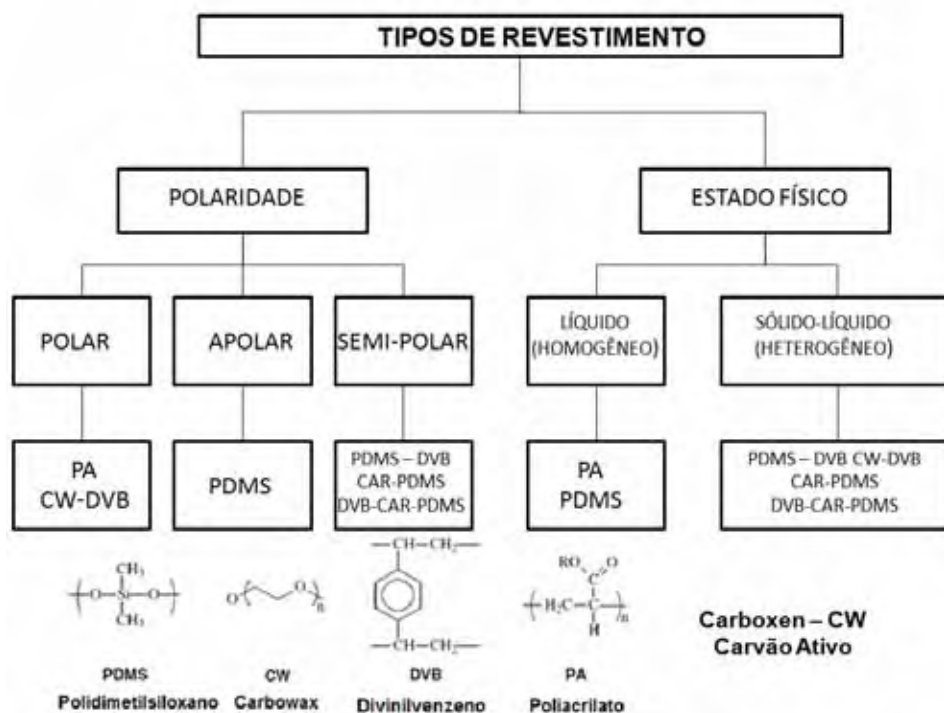
2.3.1 Técnicas de preparo de amostras - extração dos voláteis.

A extração de analitos em diferentes matrizes baseia-se nas suas propriedades químicas e físicas sendo que estas incluem carga, solubilidade, polaridade e volatilidade. As amostras líquidas podem ser tratadas diretamente por métodos de extração de líquido-líquido, ou métodos de sorção.

Segundo Damasceno (2007), a técnica analítica mais utilizada atualmente para a detecção de voláteis responsáveis pelo aroma é a microextração em fase sólida (SPME- Solid Phase Microextraction). Este método baseia-se na técnica de sorção (absorção e/ou adsorção) usado para extração, concentração e principalmente para análise de traços de substâncias, tanto na pré-concentração quanto na separação de analitos de uma matriz. Esta metodologia depende de alguns parâmetros que garantem a eficácia na extração dos componentes, dentre

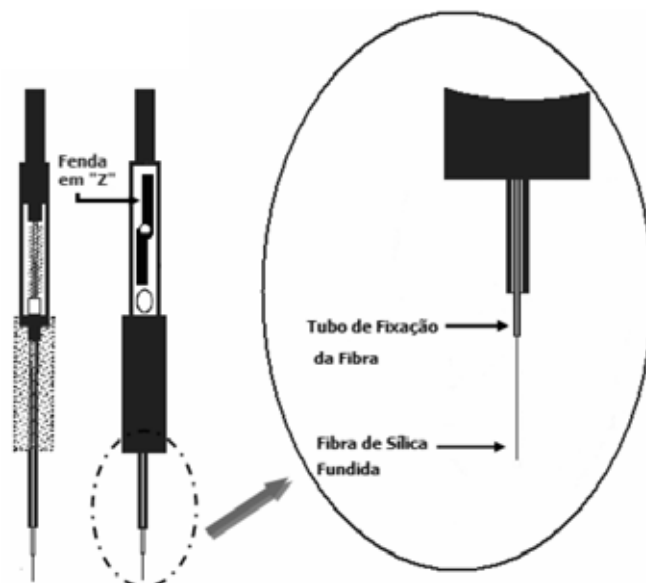
os quais estão: o volume da amostra e do headspace (espaço vazio do frasco de armazenamento da amostra), espessura e tipo da fase extratora (Figura 6), interações intermoleculares que pode ser minimizada pela adição de sal ou diluição da amostra, pH da solução, temperatura de extração, agitação e o tempo de adsorção e dessorção.

Figura 6. Tipos de revestimentos da fibra de microextração em fase sólida (SPME) e suas fórmulas estruturais. (DAMASCENO, 2007).



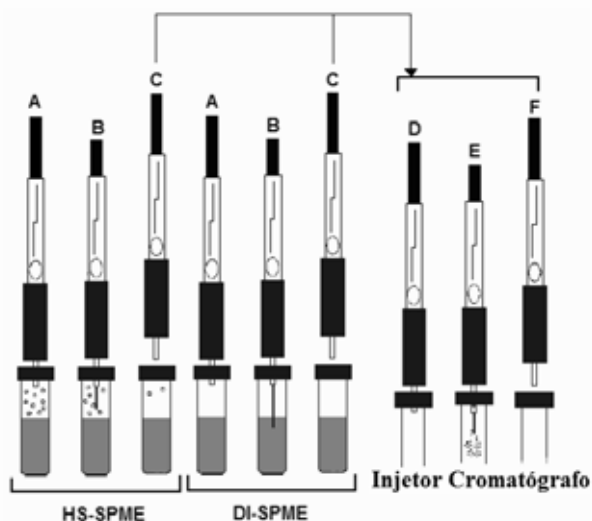
O dispositivo básico manual para SPME (Figura 7) consiste de um suporte (*holder*) construído de tal forma que permite que um capilar fique armazenado dentro de uma parte metálica, este capilar é de sílica fundida, com 10 mm de comprimento recoberto com um filme fino do polímero ou de um sólido adsorvente com 7 a 100 μm de espessura e volumes de 0,03 a 0,70 μL , respectivamente. (DAMASCENO, 2007).

Figura 7. Holder e fibra para microextração em fase sólida - SPME (VIEIRA, 2007).



A extração dos analitos com a fibra de SPME pode ser utilizada por submersão em uma fase líquida (extração por imersão direta), ou por exposição a uma fase gasosa (headspace) em equilíbrio com a amostra (Figura 8) em determinada temperatura (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990) e então os compostos adsorvidos podem ser dessorvidos termicamente por exposição da fibra no injetor do cromatógrafo.

Figura 8. Tipos de aplicações para fibra de Microextração em fase sólida - SPME (VIEIRA, 2007).



- A- Perfuração do septo; B- Adsorção dos voláteis; C- Retirada da fibra e remoção do holder;
 D- Injeção no cromatógrafo; E- Dessorção dos voláteis; F-Retirada da fibra e remoção do holder.

Os métodos de extração também são influenciados pelos efeitos de matriz sendo que em solução hidroalcoólica, como as bebidas destiladas com graduação alcoólica de 20 a 40%,

os compostos orgânicos que estão em baixa concentração como os terpenos e terpenóides, ficam retidos na fase líquida devido à solubilidade no etanol, assim faz-se necessário o preparo da amostra com a diluição e/ou adição de sal (efeito salting-out) para que favoreça a volatilização destes compostos.

A diluição minimiza a formação da emulsão e a interferência no processo cromatográfico, porém diluições menores que 10% de etanol resultam na perda de sensibilidade para a maioria dos voláteis (DE LA CALLE GARCIA et al., 1996).

Ao adicionar sal na amostra ocorre o aumento da força iônica facilitando o desprendimento dos compostos orgânicos semivoláteis para a fase vapor o que melhora a eficiência da extração, além disto, pode ocorrer a atenuação do limite de fase, tensão superficial, promovendo a volatilização dos analitos dissolvidos da fase líquida.

Yang e Peppard (1994) mostram que o efeito da adição de sal sobre a adsorção dos voláteis na fibra de SPME depende da natureza dos compostos analisados. Para a maioria dos compostos quantificados (acetato butirato, cis-3-hexenol, benzaldeído, linalol, neral, g-hexalactona, 1-carvona, 2-feniletanol, aldeído cinâmico, g-decalactona, citrato heliotropinandrietil) foi observada uma correlação positiva entre a concentração de sal e a quantidade de voláteis adsorvidas na fibra. Resultados similares também foram observados pelos mesmos autores para uma série de terpenos (geraniol, nerol, citronelol, nerol, óxido de linalol e α -Terpineol) amostrados diretamente a partir da fase líquida quando a matriz foi saturada com sal, porém ocorreu decréscimo na resposta para limoneno, anetol e β -ionona. Assim, que para melhor compreensão do efeito da matriz faz-se necessário estudá-la de acordo com os compostos flavorizantes individualmente.

Cardeal et al., (2009) analisaram compostos orgânicos voláteis presentes em amostras de cachaça concentrando estes analitos por meio de um microextração em fase sólida e encontraram 200 compostos nas amostras estudadas, tornando possível reconhecer as diferenças e semelhanças entre elas. Martín et al., (2010) usaram SPME para analisar 22 compostos voláteis incluindo alcoóis, ésteres, aldeídos e terpenos em amostras de diferentes orujo, destilado de uva produzido na Espanha, a fim de caracterizar os compostos de acordo com a sua origem geográfica. Peña-Alvarez et al., (2006) analisaram 18 amostras de tequila envelhecida de diferentes marcas comerciais utilizando a fibra de PDMS / DVB, NaCl 100%, 25°C, 30 minutos e agitação a 1200 rpm e o método desenvolvido mostrou que procedimento analítico utilizado foi seletivo, robusto (mais de 100 análises com a mesma fibra), rápido e de baixo custo.

Outra forma de extração destes voláteis pode ser por headspace dinâmico no qual a amostra é volatilizada e depois do tempo de equilíbrio é purgada, concentrada na armadilha (*trap*), desorvidos os voláteis pelo aquecimento balístico e analisados por cromatografia gasosa. A maior vantagem do headspace dinâmico é a altíssima sensibilidade, uma vez que o equilíbrio termodinâmico entre a amostra e o analito não é obrigatoriamente necessário e a sensibilidade do método é aumentada pela adsorção dos compostos no trap, no entanto a extração completa nem sempre é alcançada.

Outro aspecto a ser considerado no headspace dinâmico refere-se ao emprego de temperaturas elevadas para extração de compostos semivoláteis, nesta situação pode ocorrer degradação química do material polimérico adsorvente, portanto, compostos de degradação gerados pelo método analítico devem ser diferenciados dos componentes originais da amostra. Além disso, a vazão do gás, tempo de purga e a natureza do material adsorvente devem ser otimizadas de acordo com os compostos de interesse.

Os cartuchos ou discos usados para a captura dos compostos voláteis podem ser feitos de diferentes materiais adsorventes, sendo caracterizados pela sua afinidade a compostos orgânicos. Para extração de compostos voláteis destacam-se o carbono ativado e polímeros constituídos de poliestireno, ésteres poliacrílicos ou resinas fenólicas. Em análise de terpenos em diferentes matrizes, incluindo bebidas destiladas, são utilizados principalmente polímeros com estrutura composta de 2,6-difenileno, comercialmente conhecidos por Tenax®(JANZANTTI, 2004; NÓBREGA, 2003; LOCKWOOD, 2001) bem como seus derivados e polímeros com estrutura composta de etilvinilbenzeno/divinilbenzeno, comercialmente conhecidos por Porapak®.

2.3.2 Determinação de compostos voláteis em bebidas alcoólicas por cromatografia gasosa GC-MS e GC-FID.

Para analisar voláteis em destilados podem ser utilizados vários detectores, uma estratégia é classificar os compostos voláteis para determinar qual tipo de detector que melhor se adéqua à análise. Assim como foi feito para vinhos (LÓPEZ et al., 2002) podemos classificar os componentes voláteis de destilados em diferentes categorias de acordo com seus respectivos métodos de análise.

A primeira categoria inclui todos os compostos presentes em concentração relativamente alta (concentração maior que 0,1 mg/L) que podem ser analisados por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID). São exemplos típicos os

acetaldeídos, alcoóis superiores e de alguns de seus acetatos, ácidos graxos e seus ésteres etílicos.

A segunda categoria são voláteis que possuem concentrações inferiores a 0,1 mg/L e superiores a 0,1 µg/L, a análise destes compostos é possível após um passo de pré-concentração, extração (SPME, Headspace estático ou dinâmico, dentre outros) e o uso da cromatografia gasosa acoplada com detector de espectrometria de massas (GC-MS). Os compostos deste grupo são os fenóis voláteis, lactonas, alguns ésteres, terpenos e norisoprenóides tais como, β -ionona e β -damascenona.

A terceira categoria é um grupo heterogêneo constituído por compostos cuja análise é dificultada pela baixa estabilidade química e concentrações extremamente baixas. São exemplos conhecidos compostos voláteis de enxofre, alguns aldeídos, alquil metoxipirazinas, e alguns tióis aromáticos. Em geral, a análise destes compostos requer o desenvolvimento de métodos específicos de isolamento, de detecção e frequentemente a utilização de derivados químicos.

Trabalhos desenvolvidos na área de bebidas têm utilizado a técnica de cromatografia gasosa para análise de voláteis com ambos os detectores (FID e MS). Nonato et al., (2001) extraíram compostos voláteis por headspace-SPME da cachaça com fibra de PA e analisou por GC-MS sendo capaz identificar 38 compostos onde 11 eram ésteres. Castro et al., (2004) analisaram os compostos do vinho, por SPME-GC-FID, encontrando 36 compostos, destes 13 eram ésteres. Demyttenaere et al., (2003) determinaram 21 compostos voláteis em uísque, utilizando a mesma técnica GC-MS. O número de trabalhos vem aumentando, pois existe um grande interesse na identificação e também na quantificação destes compostos para que seja possível uma padronização e assim evitar adulterações, além de que o conhecimento dos voláteis presentes em bebidas e alimentos pode auxiliar na identificação daqueles que favorecem ou prejudicam a sua qualidade.

2.4 DELINEAMENTO FATORIAL E ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS.

A catálise enzimática, como todas reações biquímicas, é um processo complexo influenciado por um grande número de variáveis, que nem sempre mostra um comportamento definido diante de uma variação, sendo necessário o estudo das mesmas. Uma maneira de estudar como as variáveis influenciam e se relacionam é pelo do delineamento fatorial completo I^n (em que I são os níveis e n são as variáveis), no entanto para experimentos em que o número de fatores é maior que 4 faz-se necessário experimentos fatoriais exploratórios (*screening*) como delineamento fracionado ou plackett burman, em que um grande número de variáveis com menor número de experimentos podem ser avaliadas de modo que aquelas que apresentem efeito significativo sobre o processo seja evidenciada e posteriormente realizados delineamentos completos, composto central rotacionável (DCCR) ou metodologia de superfície de resposta(MRS), a fim de otimizar o processo com a um menor número de experimentos. (MONTGOMERY, 2004)

O planejamento fatorial fracionado é possível estatisticamente, pois permitem avaliar efeitos principais, sacrificando efeitos de terceira ordem ou superior que são irrelevantes na maioria das situações. As frações podem ser $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ e etc., do fatorial completo, contudo estas devem respeitar a ortogonalidade, ou seja, que os efeitos sejam avaliados de forma independente entre si. (NIST/SEMATECH, 2012)

Modelos fracionários são expressos usando a notação 2^{k-p} , onde 2 é o número de níveis de cada um dos fatores investigados, k é o número de fatores investigados, e p descreve o tamanho da fração do fatorial completo usado. Formalmente, o símbolo p representa o número de geradores em que os efeitos ou interações são confundidos, ou seja, não pode ser estimado de forma independente um do outro. Um projeto com geradores de p é uma fração $1/(2^p)$ do planejamento fatorial completo, por exemplo, o delineamento 2^{5-2} é $\frac{1}{4}$ fração, ou seja, ao invés dos 32 ensaios que seriam realizados experimento fatorial completo serão necessários apenas 8 experimentos.

Uma propriedade importante do delineamento fracionário é a resolução, que está relacionada com a ortogonalidade, que é a forma de planejar os experimentos de maneira que seja possível separar os efeitos principais das interações de ordem superiores. Assim as principais resoluções possíveis estão listadas a seguir:

- Planejamento de resolução III – exemplo 2^{3-1} com relação L=ABC: São planejamentos nos quais nenhum efeito principal está associado com outro efeito principal, mas os

efeitos principais estão associados com interações de segunda ordem e interações de segunda ordem podem estar associadas entre si.

- Planejamento de resolução IV – exemplo 2^{4-1} com L=ABCD: São planejamentos nos quais nenhum efeito principal está associado com qualquer outro efeito principal ou qualquer interação de segunda ordem, mas interações de segunda ordem estão associadas entre si.
- Planejamento de resolução V – exemplo 2^{5-1} com L=ABCDE: São planejamentos nos quais nenhum efeito principal ou interação de segunda ordem está associado com qualquer outro efeito principal ou interação de segunda ordem, mas interações de segunda ordem estão associadas com interações de terceira ordem.
- Planejamento de resolução VI – exemplo 2^{6-1} com L=ABCDEF: São planejamentos nos quais os efeitos principais estão relacionados com os efeitos de quarta ordem, efeitos secundários com o de terceira ordem e os de terceira ordem entre eles.

Além da ortogonalidade outro fator a ser considerado para delineamento fracionado é o nível de significância em que devem ser usado 90% de confiança, assim são considerados significativos variáveis que possui p-valores menores que 10% ($p < 0,1$) na análise estatística que permite incluir possíveis fatores relevantes que ficariam excluídos com um nível de significância de 5%. (RODRIGUES, M. I; IEMMA, A. F., 2009)

Além do planejamento experimental é utilizado em tratamento de dados analíticos a estatística multivariada, PCA (*Principal Component Analysis*) e HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*), aplicada à química que permitem explorar os vários resultados relacionados com muitas variáveis pela representação gráfica de todo o conjunto de dados facilitando a interpretação dos resultados obtidos, com o objetivo de verificar a existência de similaridades entre as amostras que, por sua vez, correspondem às semelhanças na composição química.

A PCA visa diminuir a dimensionalidade do conjunto de dados originais, preservando a maior quantidade de informação (variância) possível obtida por meio do estabelecimento de novas variáveis ortogonais entre si, denominadas componentes principais (PCs – *Principal Component*), que são combinações lineares das variáveis originais organizadas em ordem decrescente de importância e são representadas por gráficos obtidos pelas amostras em um sistema cartesiano, em que os eixos são as PCs que permitem a interpretação multivariada de conjuntos de dados grandes e complexos por meio de gráficos bi ou tridimensionais. Estes gráficos apresentam informações que expressam as inter-relações que podem existir entre as variáveis, facilitando a interpretação multivariada do comportamento das amostras. (CORREIA P.R. M. ; FERREIRA M. M. C, 2007)

Além disso, é possível verificar quais dos parâmetros analisados (variáveis) são os principais responsáveis pela formação dos grupos de amostras, assim avaliação das PCs pode auxiliar no estabelecimento de uma assinatura química particular para cada grupo de amostras segregado após a PCA, esse é o objetivo principal dos estudos de reconhecimento de padrões, que busca encontrar uma maneira de relacionar a identidade de uma amostra com suas características químicas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os compostos voláteis da cana-de-açúcar, sua distribuição estrutural e varietal, além de otimizar a aplicação de extratos enzimáticos ricos em β -glicosidase produzidos pelos fungos *Aspergillus niger* NRRL3122 e *Thermoascus aurantiacus* CBMAI756, visando o aumento de terpenóides livres na aguardente de cana.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar e diferenciar o perfil varietal e estrutural de distribuição dos compostos flavorizantes em diferentes canas-de-açúcar;
- Verificar as diferenças químicas por análise multivariada de componentes principais (PCA), entre as variedades de cana de açúcar;
- Otimizar a análise de terpenos por HS-SPME-GC-MS;
- Otimizar a aplicação de extratos enzimáticos ricos em β -glicosidase no caldo de cana objetivando conhecer os efeitos das variáveis e o ponto ótimo da aplicação ou seja, aquele que possui maior quantidade de terpenos e norisoprenóides livres.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANÁLISE DAS VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR

4.1.1 Diferenciação das variedades de cana-de-açúcar pelos compostos voláteis.

Foram empregadas 21 variedades de cana cedidas pela Fazenda Experimental da UFSCar, em Valparaíso (latitude 21°16'14" sul, longitude 50°48'43" oeste e altitude de 431 metros) – SP (RB93509, SP791011, RB975201, RB92579, RB867515, RB975952, RB988082, RB 965917, RB975932, RB987935, SP813250, RB925211, RB855536, RB937570, RB928064, RB966928, RB855156, RB975033, RB935744, RB835054, RB96590). Com estas amostras foram realizados estudos sobre a variabilidade da composição química entre diferentes cultivares, bem como ao longo da estrutura da planta.

4.1.2 Preparo do caldo das variedades de cana para liberação dos voláteis

As 21 variedades de cana-de-açúcar foram submetidas à higienização, em seguida a extração do caldo de cana foi processada em prensa hidráulica e no caldo obtido foi adicionado ácido sulfúrico (0,5 %, v/v) e octanol, como padrão interno, (50 ppb) para posteriormente serem realizadas as análises da composição volátil por Headspace-Trap-GC-MS.

4.1.3 Preparo das amostras para análise química volátil ao longo da estrutura da cana-de-açúcar.

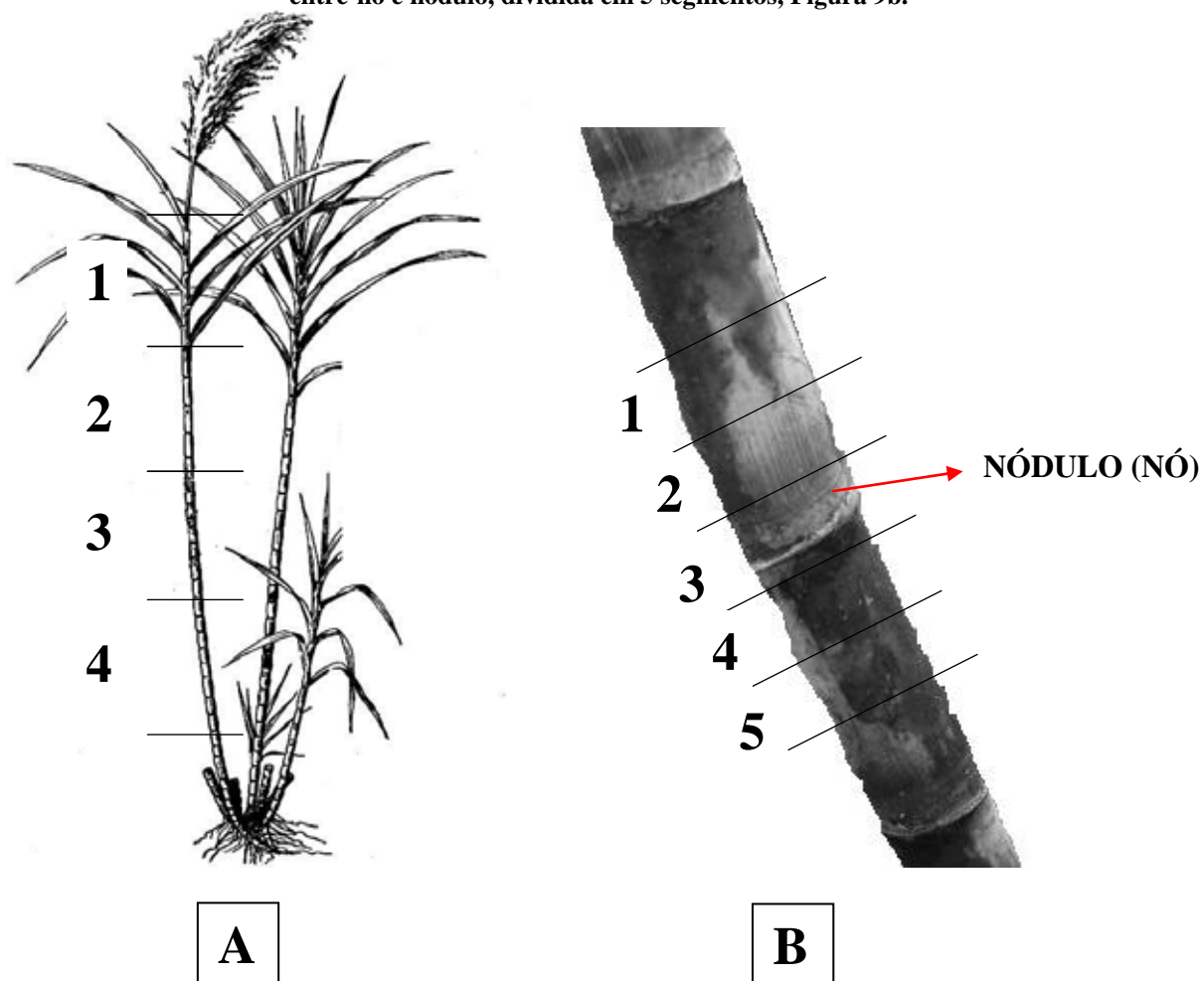
As análises da composição química volátil ao longo da estrutura da cana-de-açúcar foram feitas em três etapas. A primeira foi a diferenciação da altura, figura 9a, a segunda entre-nós e nó, Figura 9b, e a terceira casca e polpa.

Foram selecionadas três variedades R975033, RB987935 e RB975952 previamente higienizadas para análise da altura e entre-nós e nódulo(nó) da planta. Para análise química volátil da altura foram coletadas 4 frações do topo da planta até a sua raiz(Figura 9a), para os entre-nós e nódulo foram coletados colmos localizado na região central de cada planta de cana-de-açúcar e este foi dividido em 5 partes (Figura 9b) sendo analisados separadamente.

Para análise dos compostos voláteis presentes na casca foi utilizada apenas uma variedade RB975952 em que foram separadas a casca da polpa. A casca foi prensada e em seguida centrifugada obtendo o precipitado que foi separado da polpa e posteriormente foi adicionado água no precipitado e em ambos caldos obtidos foram adicionados ácido sulfúrico e octanol de forma que no volume final houvesse, respectivamente, 0,5% e 50 ppb.

Todas as frações foram analisadas separadamente via Headspace-Trap-GC-MS e os reagentes e solventes empregados foram todos de grau analítico.

Figura 9. Figura esquemática do fracionamento da cana-de-açúcar para análise dos voláteis em função da altura dividida em 4 segmentos da parte superior até a raiz, Figura 9a, e fracionamento em função do entre-nó e nódulo, dividida em 5 segmentos, Figura 9b.



4.1.4 Análise dos aromas das variedades e estrutura da cana-de-açúcar por Headspace-Trap-GC-MS.

A determinação dos compostos terpênicos e norisoprenóides nas 21 amostras de cana foi realizada por HS-Trap-GC-MS. O equipamento usado foi o cromatógrafo Perkin Elmer clarus 600 conectado ao amostrador tipo head-space Perkin Elmer TurboMatrix HS-40 com trap de carvão ativo e acoplado ao espectrômetro de massas Perkin Elmer – Clarus 680 MS em que os parâmetros ajustados encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros utilizados para análise da composição química das variedades por HS-Trap-GC-MS.

Parâmetros trap – Perkin Elmer TurboMatrix HS-40 Trap	Valores
Temperatura da agulha	120°C
Linha de transferência	200°C
Temperatura de forno	100°C
Temperatura baixa trap	35°C
Temperatura alta trap	300°C
Ciclos	4
Tempo de manutenção trap	3min
Tempo termostatização do frasco	30 min
Tempo pressurização do frasco	1,5 min
Tempo de decaimento	1,5 min
Pressão coluna	30 psi
Pressão vial	35 psi
Tipo de fibra	Carvão ativo
Parâmetro GC – Perkin Elmer - Clarus 600	
Temperatura Inicial	40°C
Tempo de estabilidade 1	0
Rampa 1	40-100°C
Razão de aquecimento 1	10°C/min
Tempo de estabilidade 2	0
Rampa 2	100-180°C
Razão de aquecimento 2	5°C/min
Tempo de estabilidade 3	0
Rampa 3	180-250°C
Razão de aquecimento	10°C/min
Tempo de estabilidade	1,5 min
Gás de arraste	Hélio 5.0
Fluxo	1 mL/min
Coluna - 30 m x 0.25 mm x 1.4 µm	Elite 5MS
Parâmetro MS – Perkin Elmer – Clarus 680 MS	
Extensão de massa	40-230 m/z
Atraso do solvente	5 min
Tempo de Varredura	0,5 min
Tempo de atraso entre varreduras	0,1 min
Temperatura da linha de transferência	230°C
Temperatura da fonte	210°C
Voltagem da Multiplicadora	368 V
Software de aquisição de dados	TurboMass 5.4.1

4.1.5 Tratamento dos dados para diferenciação da distribuição de compostos voláteis no perfil estrutural e varietal da cana-de-açúcar.

Para verificar a possível correlação entre as variedades de cana-de-açúcar e os compostos voláteis, foi realizada a análise multivariada de componentes principais (PCA – Principal Components Analysis). As áreas dos picos cromatográficos dos compostos foram consideradas como variáveis e foram analisadas com o software livre OCTAVE versão 3.6.1.

4.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS.

Para produção de enzima o método empregado foi desenvolvido por Leite (2007) para o fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* CBMAI756 e para o fungo mesofílico *Aspergillus niger* NRRL 3122 foi o desenvolvido por Casciatori (2012).

4.2.1 Inóculo.

A partir da cultura de manutenção do fungo *Thermoascus aurantiacus* CBMAI756 da coleção do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, campus de São José do Rio Preto, que estava mantida em tubos de ensaio com PDA (Potato Dextrose Agar) inclinado, submerso em óleo mineral, em câmara fria a 5°C, esta foi inoculada em 2 erlenmeyers com 50 mL de Ágar Sabouraud inclinado para a ativação do fungo sendo incubadas a 50°C durante 48 horas.

A cultura do fungo *Aspergillus niger* NRRL3122 fornecidos pelo laboratório de Bioprocessos do departamento de Engenharia de Alimentos do mesmo instituto que encontrava-se em tubos de ensaio com PDA (Potato Dextrose Agar) inclinado, submerso em óleo mineral, foram inoculadas para ativação em 2 erlenmeyers com 50 mL de PDA, Potato Dextrose Ágar, inclinado e incubado a 35°C por 7 dias.

4.2.2 Solução Salina.

Foi utilizada como solução salina para o crescimento em estado sólido dos fungos *Thermoascus aurantiacus* e *Aspergillus niger* a solução 0,35% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3% de KH_2PO_4 , 0,05% de $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,05% de CaCl_2 proposta por Toyama e Ogawa (1978), as soluções foram previamente esterilizadas em autoclave a 121 °C e 1 atm durante 30 minutos.

4.2.3 Fermentadores.

Os fermentadores utilizados foram feitos com sacos de polipropileno de 15 x 30 cm, acoplados com bocal de PVC de 3,5 cm de comprimento e 1,5” de diâmetro, fechados com tampão de algodão envolto por gaze, para garantir a troca de gases e assegurar que não houvesse contaminação por outros microrganismos.

Bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo foram lavados com água e secos em estufa com circulação de ar quente a 50 °C, o bagaço de cana foi separado em peneira para remoção da fração maior que 5,64 mm, em seguida peneirado em peneira granulométrica e descartada a fração menor que 2 mm, foram utilizados 5,0 g de substrato por fermentador, dos quais para o fungo *T. aurantiacus* foi na proporção de 1:1 e para o *A. níger* foi utilizado 3,5 g de bagaço de cana-de-açúcar e 1,5 g de farelo de trigo.

4.2.4 Contagem de esporos e inoculação.

Após 2 dias de incubação do inóculo de *Thermoascus aurantiacus* e 7 dias para *Aspergillus níger* as células e os esporos, respectivamente, de cada erlenmeyer foram suspensos, por cuidadosa raspagem com alça de platina, em 50 mL da solução salina. A quantidade de esporos foi determinada em câmara de Neubauer, seguida de contagem em microscópio ótico. Os fermentadores contendo os substratos esterilizados foram inoculados com volumes de suspensão padronizados com $5,0 \times 10^7$ células e esporos, e completados com solução salina para um volume final de 20,0 mL resultando em 80% de umidade.

4.2.5 Fermentação em estado sólido (FES).

Os fermentadores contendo o substrato seco foram inoculados e incubados 50°C para o fungo *Thermoascus aurantiacus* durante 5 dias e 35°C para o fungo *Aspergillus níger* durante 7 dias.

As enzimas foram extraídas pela adição de 100 mL de água destilada a temperatura ambiente e homogeneizadas para desaglomeração dos micélios. A suspensão foi então transferida para erlenmeyers de 250 mL, em que permaneceu em agitador orbital a 150 rpm por 1 hora. Após agitação as amostras foram centrifugadas a 10000g durante 20 minutos a 5°C, para remoção de células e outras partículas sólidas em suspensão.

4.2.6 Ultrafiltração.

A fim de obter extrato mais puro, concentrado e ter em menor volume maior concentração de enzima para ajustar o brix posteriormente, o extrato bruto foi concentrado utilizando o sistema QuixStand™ Benchtop da Amershan Bioscience com membrana miliporosa de 10kDa, utilizando unidade de ultrafiltração com pressão de 15psi. O extrato foi concentrado cerca de 10 vezes (v/v), seguido de medida de atividade enzimática.

4.2.7 Caracterização do Extrato Enzimático.

4.2.7.1 Atividade enzimática - β -glicosidase.

As atividades de β -glicosidase dos complexos enzimáticos estudados foram determinadas pela quantificação de *p*-nitrofenol liberado pelas enzimas a partir de 4-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (PNP β G, Sigma) usado como substrato. Foram adicionados 250 μ L de tampão acetato 0,1M, pH 5,0, e 250 μ L de PNPG 4mM a 50 μ L do filtrado enzimático, reagindo por 10 minutos a temperatura de 70°C para o fungo *Thermoascus aurantiacus* e 60°C para o fungo *Aspergillus niger*. A reação enzimática foi paralisada com 2 mL de carbonato de sódio 2M. O *p*-nitrofenol liberado reagiu com a base e produziu o *p*-nitrofenolato (coloração amarela) e este foi quantificado por espectrofotometria em $\lambda=410$ nm. Uma unidade de β -glicosidase corresponde ao total de enzima que libera 1 μ M de *p*-nitrofenol por minuto no meio reacional.

4.2.7.2 Determinação de Proteína Total.

O teor total de proteína foi quantificado através do método de Lowry et al., (1951), utilizando soro albumina bovina como padrão analítico.

4.2.7.3 Características físico-química dos extratos ricos em β -glicosidase produzido pelos fungos *A. niger* e *T. aurantiacus*.

A determinação do efeito do pH sobre a atividade enzimática de β -glicosidase foi realizada incubando-se 0,05 mL das enzimas em 0,25 mL do substrato *p*-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo 4mM (pNPG, Sigma), em diferentes valores de pH e os tampões da Tabela 3 para cada pH específico. A atividade enzimática foi quantificada a 60°C para o fungo *A.niger*,

70°C para o *T. aurantiacus* e paralisada com carbonato de sódio 2M após 10 minutos de reação.

Tabela 3. Soluções tamponantes utilizadas para medição do pH ótimo.

<i>Tampão (0,1M)</i>	<i>pKa</i>	<i>pH</i>
Glicina – HCl	2,4	3
Acetato de Sódio	4,8	4 e 5
Citrato de Sódio	6,4	6
Fosfato de Sódio	7,2	7 e 8
Glicina – NaOH	9,8	9 e 10

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi realizado incubando-se 0,05 mL da β -glicosidase nas mesmas condições descritas para a determinação da atividade, em diferentes temperaturas, variando entre 40 e 90°C. Os ensaios de atividade foram realizados em tampão acetato de sódio 0,1M no pH ótimo das respectivas enzimas.

4.2.7.4 Efeito da glicose e etanol sobre a atividade das enzimas.

Para a determinação do efeito da glicose e etanol sobre a atividade das enzimas, foi utilizado pNPBG (2 mM) como substrato. A atividade enzimática foi quantificada com a adição destes compostos, em diferentes concentrações, na mistura de reação (0–100 mM de glicose e 0–20% de etanol). Os ensaios foram realizados a 60°C em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,5.

4.3 ANALISES CROMATOGRÁFICAS GC-MS

4.3.8 Otimização do processo de extração de terpenos em fase sólida – SPME.

Para otimização do método de extração de terpenos no caldo de cana-de-açúcar foi empregado delineamento fatorial completo utilizando 2 tipos de fibra, 3 concentrações de etanol e 3 temperaturas, Tabela 4. O aquecimento do frasco para volatilização dos compostos foi realizado durante 30 minutos e a adsorção e dessorção dos compostos da fibra por 5 minutos.

Tabela 4. Delineamento completo para otimização da análise de terpenos por HS-SPME-GC-MS .

Fatores	Níveis		
	Baixo	Intermediário	Alto
Fibra (minutos)	PDMS	-	PDMSDVB
Concentração de etanol (%)	10	25	40
Temperatura	40	70	100

As análises foram realizadas com os mesmos parâmetros para o GC-MS que o item 4.1.4 e assim foi obtido o cromatograma de íons totais e posteriormente para aquisição da área

de cada compostos foi extraído o íon mais intenso (Tabela 5) e calculado a área pelo Software TurboMass 5.4.1 e os dados estatísticos foram analisados com o uso do software Minitab 16.1.

Tabela 5. Compostos analisados por GC-MS para otimização da análise por Microextração em fase sólida, SPME .

Composto	Íon extraído (m/z)	Composto	Íon extraído(m/z)
Octanol	56	Mirceno	93
Limoneno	68	Isopulegol	121
Citronelal	69	Isoborneol	95
Citronelol	69	Cânfora	95
Neril-acetato	69	Verbenona	107
Nerolidol	69	<i>p</i> -Mentano	111
Farnesol	69	<i>p</i> -Cimeno	119
β -damascona	177	β -damascenona	121
α -Terpineol	93	α -Ionona	121
4- Alil- 1,2-dimetoxibenzeno	77	Canfeno	136
Mirtenol	79	2,6,10,10-tetrametil-1-oxa-espiro-(4,5)-dec-6-eno	138
Álcool fenchílico	81	Óxido de rosa	139
Pulegona	81	1-alil-2-metoxi-benzeno	148
Carvil acetato	84	Isoeugenol	164
Terpineno	93	Eugenol	164
Linalol	93	β -Ionona	177
Felandreno	93		

4.3.9 Análises dos voláteis nos extratos enzimáticos.

Devido a baixa concentração obtida nos caldos “*in natura*” foi necessário a modificação na metodologia de análise 4.1.4 de *full scan*, varredura completa dos íons na faixa de 40 a 230 m/z, para *SIM(selected ion monitoring)* em que foram monitorados dois fragmentos com m/z característicos a cada composto, sendo o primeiro mais intenso e outro que separasse os picos que co-eluiam em tempos próximos de retenção, sendo estes íons mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Compostos analisados por GC-MS para otimização da aplicação do extrato enzimático.

Terpenos	Íons monitorados (m/z)	Intervalo de tempo (min)*
1,4 - Cineole	55 e 111	12.08-12.68
<i>p</i> -Cimeno	91 e 119	12.36-12.96
Limoneno	91e 93	12.52-13.12
Linalol	71e 93	14.29-14.89
Óxido de rosa	69 e 139	14.69-15.29
Álcool fenchílico	80 e 81	15.20-15.80
Citronelal	69 e 95	15.81-16.41
Isopulegol	69 e 71	16.02-16.62
Cânfora	81e 95	16.12-16.72
Isoborneol	95	16.57-17.17
α -Terpineol	93 e 121	17.29-17.89
Mirtenol	79 e 91	17.39-17.99
Citronelol	81 e 95	17.86-18.46
Nerol	84	17.92-18.52
Pulegona	68 e 69	18.56-19.16
2,6,10,10-tetrametil-1-oxa-espiro-(4,5)-dec-6-eno	82 e 138	20.66-21.16
Carvil-acetato	84 e 119	20.89-21.49
Neril-acetato	69 e 93	21.43-22.03
Isoeugenol	164	21.52-22.12
β -damascenona	69 e 121	22.35-22.95
4-Alil-1,2-dimetoxibenzeno	77 e 164	22.59-23.19
α -Ionona	93 e 121	23.45-24.05
β -Ionona	91 e 177	24.90-25.50
Nerolidol	69 e 71	26.70-27.30

*Intervalo de monitoramento dos dois íons.

4.4 OTIMIZAÇÃO DA APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO RICO EM β -GLICOSIDASE NO CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR.

A otimização da aplicação do extrato enzimático foi realizada em duas etapas a primeira para realização da seleção (*screening*) das variáveis pelo delineamento fatorial fracionado 2^{6-1} (Tabela 6) com 32 ensaios com o nível de significância fixo de $p < 0,1$. E a segunda etapa pelo planejamento fatorial completo feito com as variáveis selecionadas no experimento de *screening*.

As variáveis estudadas na primeira etapa foram Brix (12 e 16), teor de sólidos solúveis, tempo (20 e 80 minutos), concentração (0,5 e 2 U/mL), agitação (0 e 100 rpm), enzimas (extrato de cada fungo individual *A. níger* e *T. Auriantiacus*) e etapas de aplicação (pré e pós fermentação alcoólica). Na otimização foram utilizados o delineamento completo (Tabela 8) e os dados foram analisados por metodologia de superfície de resposta (MRS) com o uso do software Minitab 16.1.

Tabela 7. Delineamento experimental fracionado 26-1 para o screening de variáveis na aplicação de extrato enzimático concentrado rico em β -glicosidase.

Fatores	Código	Níveis	
		Baixo	Alto
Tempo (minutos)	A	20	80
Concentração (U/mL)	B	0,5	2
Brix (%)	C	12	16
Agitação (rpm)	D	0	200
Etapas	E	Pré - fermentação	Pós - fermentação
Enzimas	F	<i>T. aurantiacus</i>	<i>A. niger</i>

Tabela 8. Delineamento experimental completo para otimização da catálise enzimática realizado após o screening de variáveis.

Fatores	Código	Níveis							
Concentração	A2	0	0,5	1	1,5	2	4	6	
Tempo	B2	0	10	20	30	45	60	90	120

4.5 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.

4.5.1 Diluição do Brix – teor de sólidos solúveis.

O teor de sólidos solúveis, Brix, do caldo de cana previamente extraído, foi medido com o refratômetro digital de bancada modelo Q767BD e marca QUIMIS. Para a aplicação pré-fermentação foi adicionado o extrato concentrado rico em β -glicosidase, de acordo com a atividade necessária para cada ensaio e completando com água até o volume calculado de diluição (A) pela equação 1 e posteriormente realizado a reação enzimática.

Na aplicação pós-fermentação o caldo foi diluído somente com água, fermentado por 24 horas, posteriormente adicionado enzima e realizado a reação enzimática.

$$A = \frac{C \times (G - g)}{g} \quad (1)$$

A = quantidade de água + extrato enzimático concentrado; C = quantidade de caldo integral; G = °Brix do caldo integral; g = °Brix desejado na mistura.

4.5.2 Aplicação pré-fermentação e pós-fermentação alcoólica.

Foi empregado caldo da variedade RB867515, fornecida pela Central Energética Moreno de Monte Aprazível, São Paulo - Brasil, devido a fácil obtenção para realização de todas as etapas de otimização, visto que as demais variedades encontram-se menos disponíveis durante o ano.

Para obtenção do caldo a cana-de-açúcar foi prensada em prensa hidráulica e posteriormente foi adicionado o extrato enzimático de β -glicosidasas antes da fermentação alcoólica (pré-fermentação) no mosto e diluído no brix de cada aplicação, procedimento 5.2.7, foram mantidas à temperatura ótima de cada enzima no tempo e concentração especificados para cada ensaio. Assim, as amostras após a aplicação foram fervidas no forno micro-ondas para desnaturação das enzimas, ajustada a temperatura do caldo de cana para 30°C, adicionado *Saccharomyces cerevisiae*, fermentado por 24 horas em estufa B.O.D à 30°C e refrigeradas (3°C) em câmara fria para as análises seguintes.

As amostras que foram adicionadas o extrato enzimático depois da fermentação alcoólica (pós-fermentação) foram diluídas no brix de cada aplicação e fermentadas por 24 horas. Após este tempo foram adicionados os extratos nas atividades de cada experimento e deixadas nas condições especificadas de tempo e agitação para cada ensaio do delineamento fracionado, posteriormente as amostras foram fervidas no micro-ondas e refrigeradas (3°C) em câmara fria para as análises posteriores. Na fermentação alcoólica não foram empregados aditivos minerais e antibióticos e o pH inicial da fermentação alcoólica foi medido e ajustado com HCl 2M.

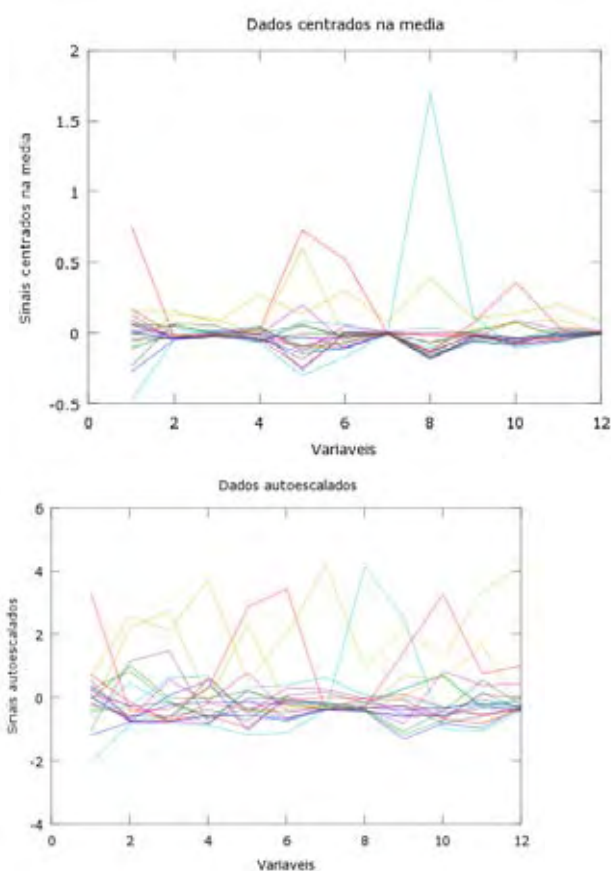
5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISES DE COMPOSTOS FLAVORIZANTES DA CANA-DE-AÇÚCAR, OBTIDOS POR CATÁLISE ÁCIDA, UTILIZANDO HS-TRAP-GC-MS E DIFERENCIAÇÃO DO SEU PERFIL ESTRUTURAL E VARIETAL.

5.1.1 Diferenciação do perfil varietal da cana-de-açúcar.

Para análise de componentes principais foi feito tratamento dos dados, afim de verificar qual melhor procedimento estatístico deveria ser feito na análise multivariada de componentes principais, observou-se que os dados deveriam ser centrados na média para diferenciação das variedades da cana-de-açúcar com relação a distribuição dos compostos visto que a distribuição auto-escalada não forneceu informações suficientes para a diferenciação (Figura 10).

Figura 10. Tratamento dos dados para Análise de Componentes Principais – PCA.



Calculou-se a variância explicada para conhecer o número de componentes principais necessárias para análise, concluindo que era necessário 2 componentes principais com o total da variância de 86,4% (Tabela 9 e Figura 11).

Figura 11. Análise do número de componentes principais(PCs).

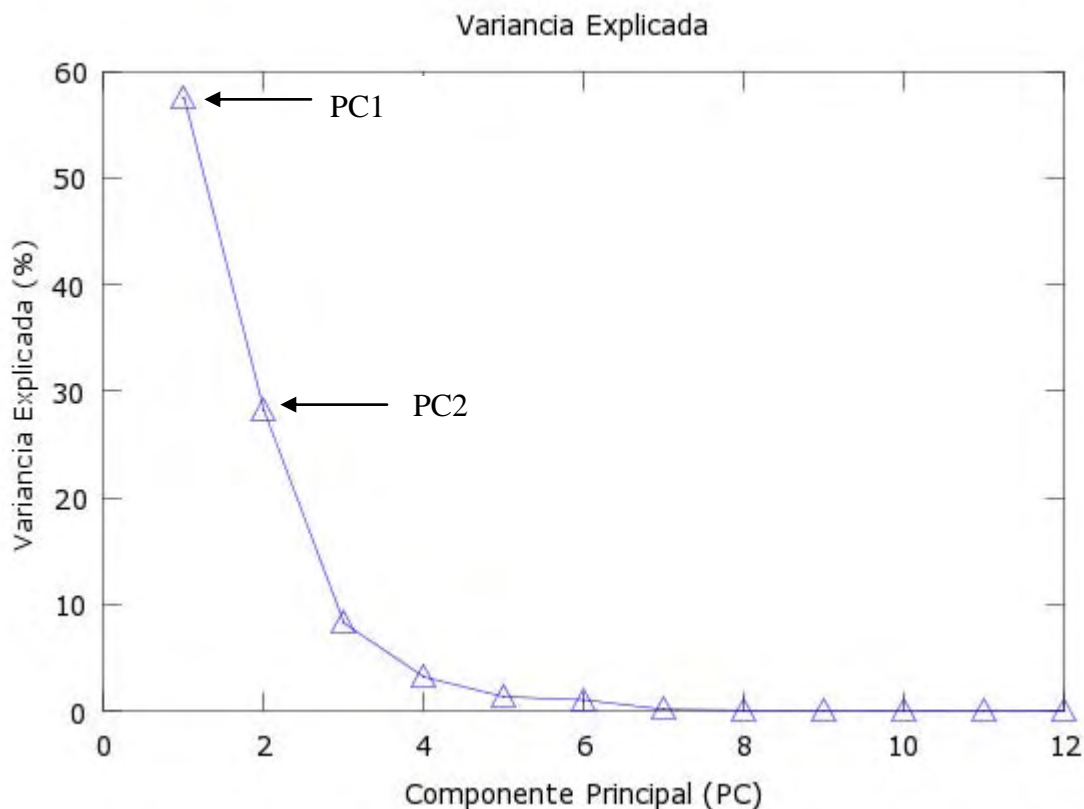


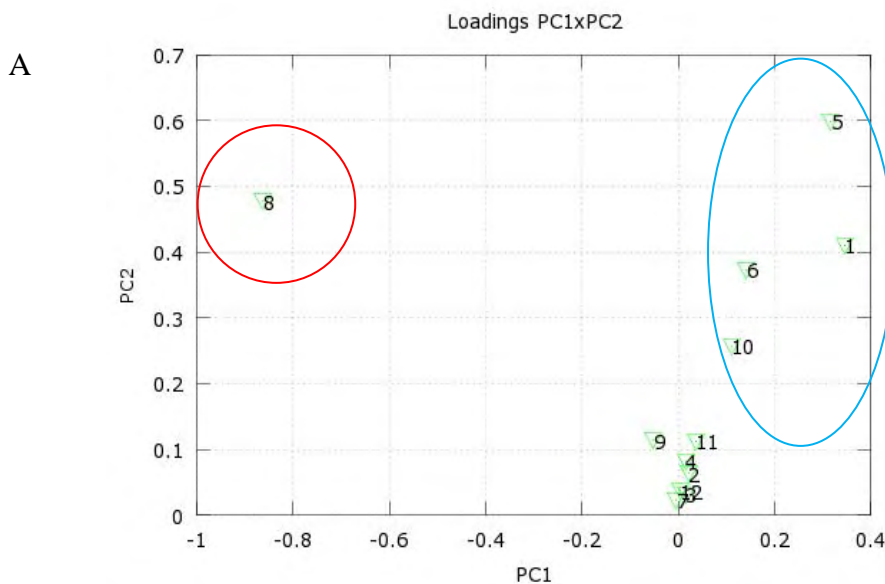
Tabela 9. Porcentagem de cada componente principal(PCs).

<i>Componente Principal</i>	<i>Variância Explicada (%)</i>
PC1	57,6
PC2	28,8
Total	86,4

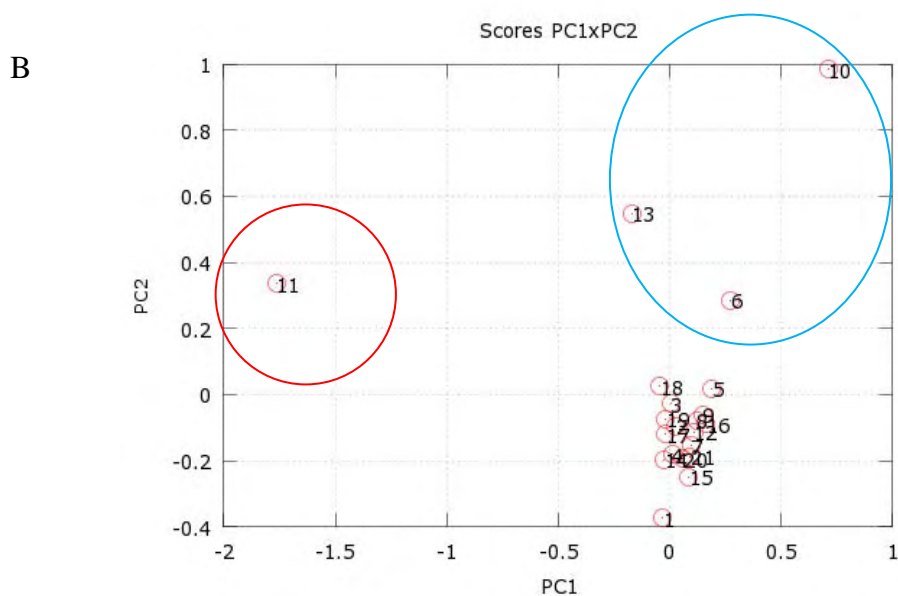
Observando a Figura 12a nota-se que o composto 8 (1,4 -dimetilpent-2-enilbenzeno) possui predominantemente valores baixos da componente principal 1 relacionado com a variedade de cana-de-açúcar 11(SP813250), Figura 12b, que formou/liberou por catálise ácida poucos compostos voláteis predominantemente 2,4-decadienal (Figura 13), que como os demais aldeídos, possui aroma desagradável em bebidas destiladas podendo ser proveniente da casca da cana-de-açúcar (LAMBERTON, 1965) ou produzidos através da auto-oxidação,

foto-oxidação ou oxidação enzimática, por lipoxigenases, do ácido linoléico e linolênico que estão presentes na cana-de-açúcar (LÉDON et al., 2009).

Figura 12. Diferenciação das variedades pelas componentes principais PC1 e PC2 – Gráfico de loadings(17a), e Scores(17b).

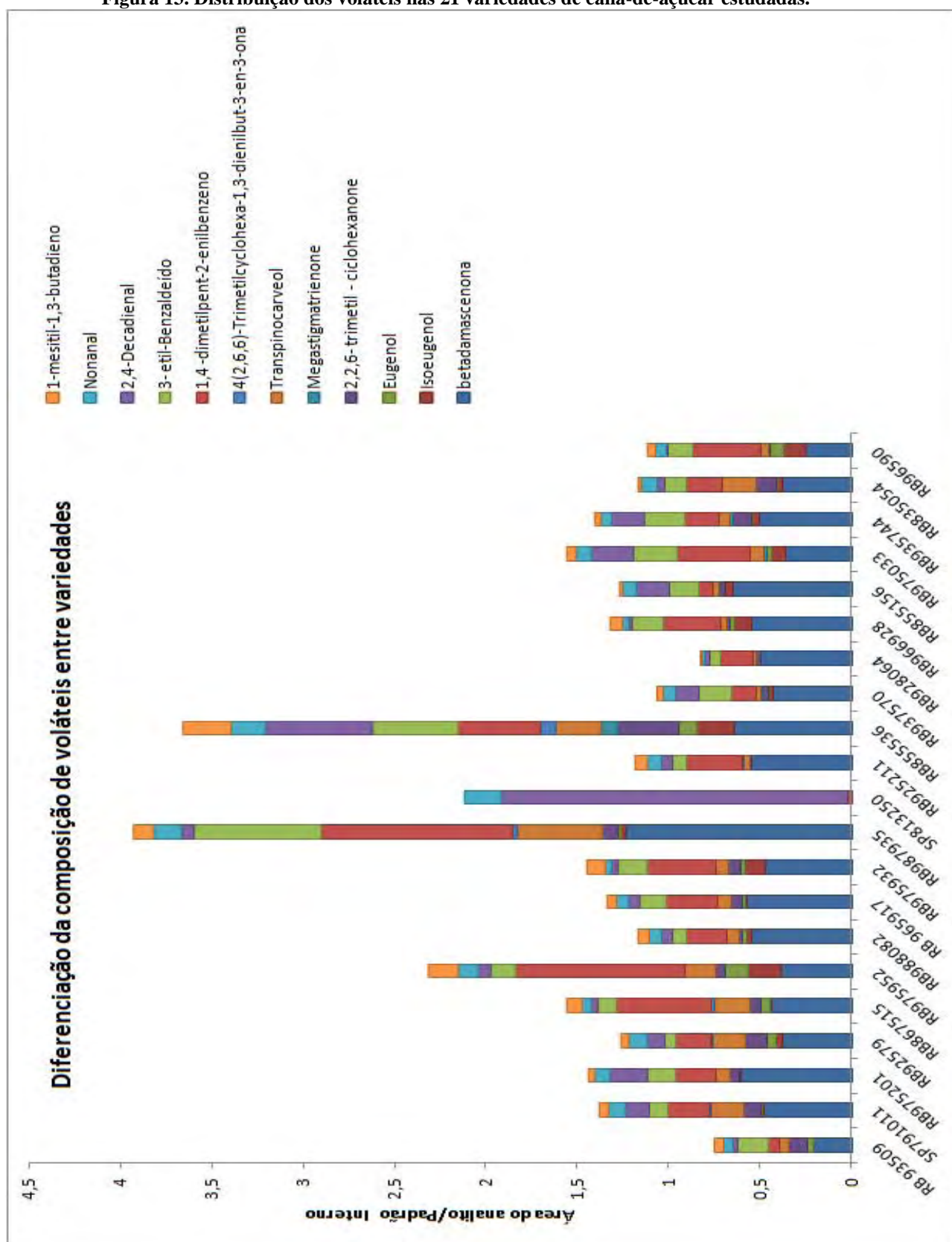


1; β -damascenona, 2; Isoeugenol, 3; Eugenol, 4; 2,2,6- trimetil-ciclohexanona, 5; Megastigmatrienona, 6; *trans*-pinocarveol, 7; 4(2,6,6)-Trimethylcyclohexa-1,3-dienilbut-3-en-3-ona; 8 1,4 -dimetilpent-2-enilbenzeno, 9; 3-etil-Benzaldeído, 10; 2,4-Decadienal, 11; Nonanal, 12; 1-mesitil-1,3-butadieno.



1.RB93509; 2.SP791011; 3.RB975201; 4.RB92579; 5.RB867515; 6.RB975952; 7.RB988082; 8.RB965917; 9.RB975932; 10.RB987935; 11.SP813250; 12.RB925211; 13.RB855536; 14.RB937570; 15.RB928064; 16.RB966928; 17.RB855156; 18.RB975033; 19.RB935744; 20.RB835054; 21.RB96590.

Figura 13. Distribuição dos voláteis nas 21 variedades de cana-de-açúcar estudadas.



As variedades de cana de açúcar 13(RB85536), 10(RB987935) e 6(RB97592) possui valores positivos das PCs 1 e/ou 2 (Figura 12a) sendo influenciadas principalmente

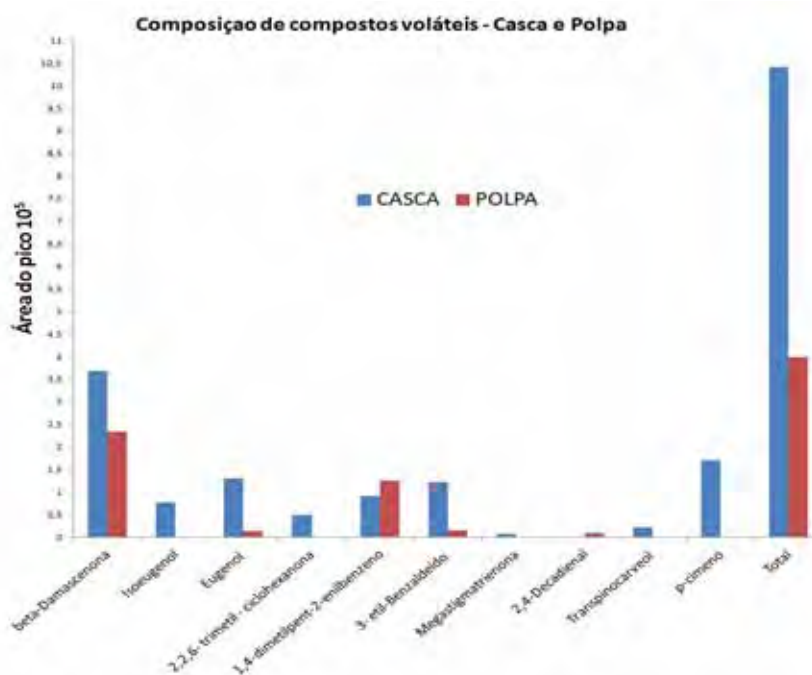
pelos compostos 1(β -damascenona), 5(megastigmatrienona), 6 (trans-pinocarveol), 10 (2,4-decadienal), que são derivados principalmente da degradação de compostos complexos como carotenóides e ácido linolênico, assim como a maioria destes voláteis são favoráveis ao aroma de bebidas alcóolicas é possível que estas variedades, dentro das 21 estudadas, sejam melhores indicadas para a produção de aguardente de cana.

Dezessete de vinte e uma variedades não foram diferenciadas o que pode ser justificado devido ao direcionamento da modificação genética para produção de cana-de-açúcar voltada a produção de açúcar e álcool, sendo assim faz-se necessário estudos genéticos para o desenvolvimento de variedades direcionadas para produção de aguardente de cana.

5.1.2 Análise de compostos voláteis da casca e polpa da cana-de-açúcar.

Os voláteis flavorizantes na casca e polpa da cana-de-açúcar é mostrado na Figura 14, observa-se que a casca possui maior concentração da maioria dos compostos incluindo compostos que auxiliam no sabor e aroma de aguardente de cana como eugenol, isoeugenol, *p*-cimeno, *trans*-Pinocarveal e compostos oriundos da degradação de carotenóides (UENOJO et al., 2007) como β -damascenona, 2,2,6-trimetil-ciclohexanona, 1,4 dimetilpent-2-enilbenzeno e megastigmatrienona que quando presente em vinhos aumenta o aroma floral e além disso possui baixos limites de percepção (FERREIRA et al., 2008).

Figura 14. Distribuição dos compostos voláteis na casca e polpa da variedade RB975952.

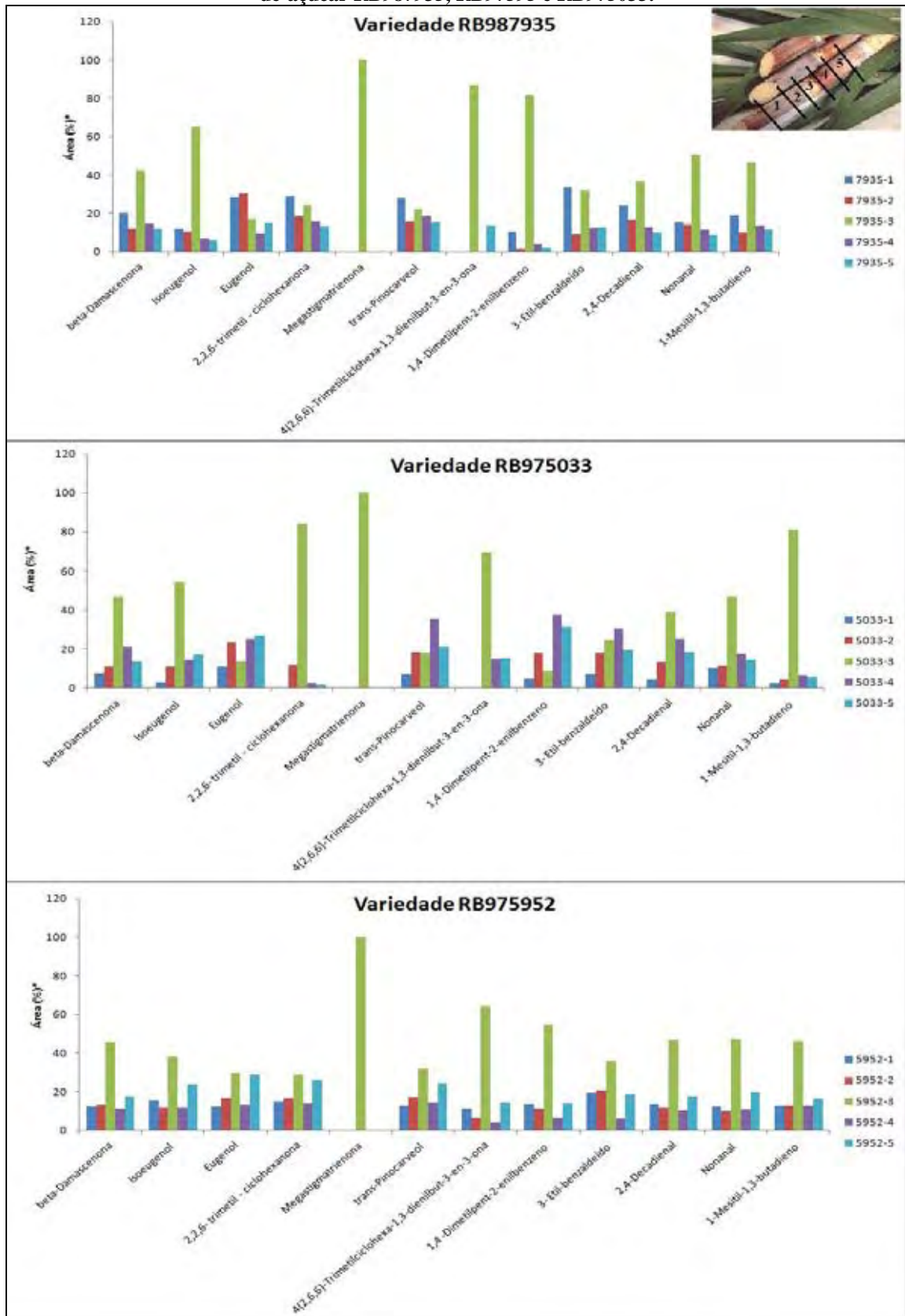


Assim estes resultados são importantes, pois sabe-se que alguns produtores de cachaça raspam a cana-de-açúcar antes da moagem acreditando realizar um processo de limpeza que, por outro lado pode acarretar em perdas de voláteis no produto final.

5.1.3 Análise de compostos voláteis com relação a fração nó e entrenó-nó e altura da cana de açúcar.

Para melhor visualização dos dados foi calculado a área percentual relativa a cada composto, ou seja, a área total de cada volátil para cada variedade representou 100% e a partir dos resultados obtidos a área percentual de cada fração foi calculada e obteve-se distribuição dos percentuais de voláteis individuais presentes nas variedades de cana na região nó e entrenós apresentada na Figura 15.

Figura 15. Distribuição dos voláteis em função da região nó e entre-nos das variedades de cana-de-açúcar RB987935, RB97595 e RB975033.

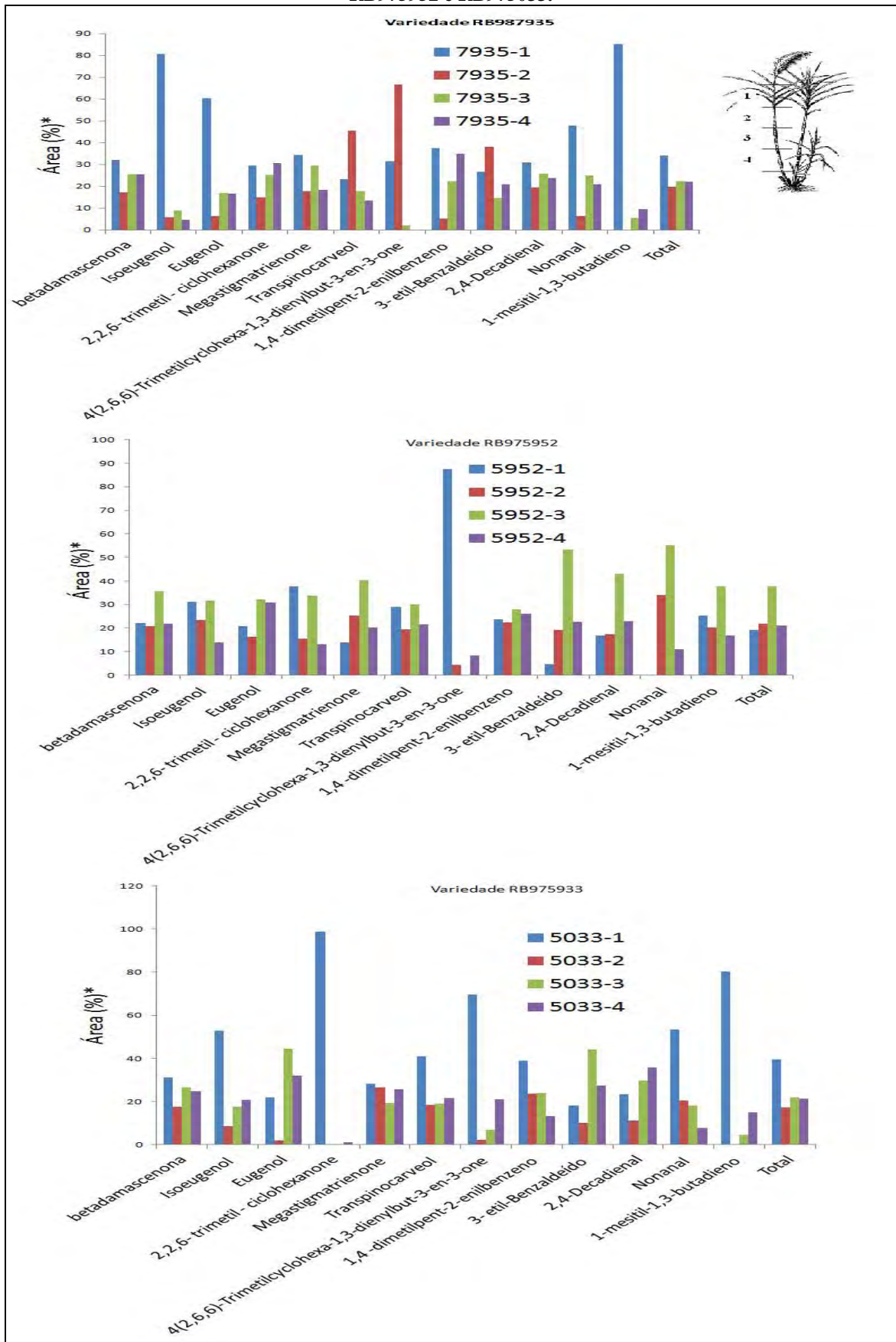


*Área percentual relativa ao total de cada composto em cada variedade.

De maneira geral, todos os terpenos, terpineóides, norisoprenóides e alguns aldeídos foram encontrados, majoritariamente, no nódulo(nó) da planta de cana-de-açúcar, assim é possível que aguardente de cana produzida somente pelo nó da planta possua maior quantidade de aroma e possa ser sensorialmente mais agradável aos consumidores visto que, grande concentrações de terpenos, terpineóides e norisoprenóides podem ser obtidas e estes voláteis são sensorialmente agradáveis em vinhos, tequila e mezcal.

É possível observar que as variedade RB987935 é a variedade que possui maior quantidade, diversidade de voláteis (Figura 13) e também apresenta maior quantidade predominantemente no topo da planta (Figura 15). Já a variedade RB975033, que possui baixa concentração de voláteis também apresentou maior proporção de voláteis no topo da planta e RB975952 possui os voláteis distribuídos na região próxima a raiz da planta.

Figura 16. Distribuição dos voláteis em função da altura das variedades de cana-de-açúcar RB987935, RB975952 e RB975033.



*Área percentual relativa ao total de cada composto em cada variedade.

Portanto, não se pode chegar há alguma conclusão com os resultados obtidos sendo necessário mais experimentos para verificar se há ou não correlação dos aromas no perfil longitudinal da planta.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO RICO EM β -GLICOSIDASE.

5.2.1 Atividade β -Glicosidase e teor de proteínas totais.

A atividade específica obtida pelos fungo *A. níger* foi de 5,0 U/mg, Tabela 10, outros autores relatam produção inferior por fermentação em estado sólido como JAGËR (2001) que obteve $1,68 \pm 0,54$ U/mg, isto deve ser pelo uso como substrato único farelo de trigo e neste trabalho utilizou-se farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar (1,5/3,5 g). Obteve-se atividade específica de 5,7 U/mg produzido pelo fungo *T. aurantiacus* CBMAI756 o que foi superior ao de Leite (2007), 2,20U/mg, que usou como substrato de sabugo de milho moído.

Tabela 10. Atividade específica do extrato enzimático de cada micro-organismo.

Micro-organismo	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteína Total(mg/mL)	Atividade Específica(U/mg)
<i>A. níger</i>	5,23	1,05	5,0
<i>T. Aurantiacus</i>	6,31	1,11	5,7

Assim, as atividades relativas foram altas comparadas com trabalhos anteriores além de que a específica, neste trabalho, foi 15% maior para o extrato produzido pelo fungo *T. aurantiacus* comparada com o produzido por *A. níger*.

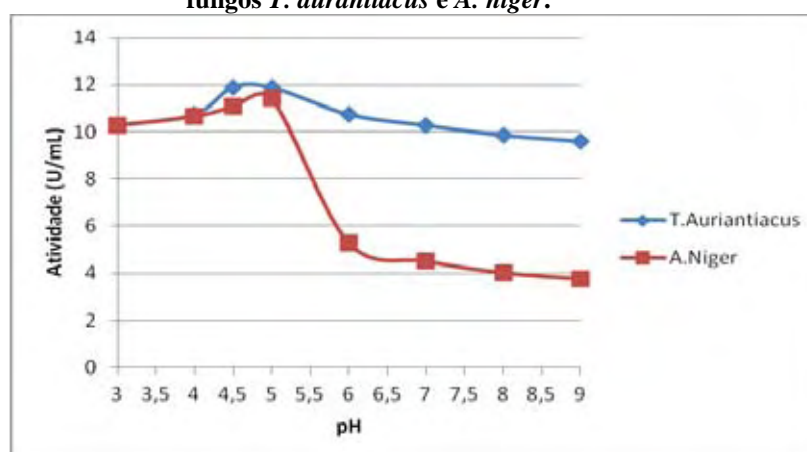
5.2.2 Caracterização da β -glicosidase produzida pelos fungos *A.níger* e *T. aurantiacus* – Temperaturas e pH ótimos de atuação no substrato.

O extrato produzido por *Aspergillus níger* apresentou faixa ótima de pH de atuação da β -glicosidase no substrato por volta de 3,5 a 5,0 (Figura16) ideal para aplicação no caldo de cana-de-açúcar, que geralmente possui pH de 4,5 a 5,0, além de ser o mesmo pH da produção de etanol por *S. cerevisiae*, semelhantes resultados foram obtidos por JAGËR (2001) e outros autores(Tabela 11), porém o aumento do pH diminuiu a atividade enzimática cerca de 65%.

Tabela 11. Parâmetros característicos de β -glicosidase produzida por *A. niger* (JAGËR, 2001)

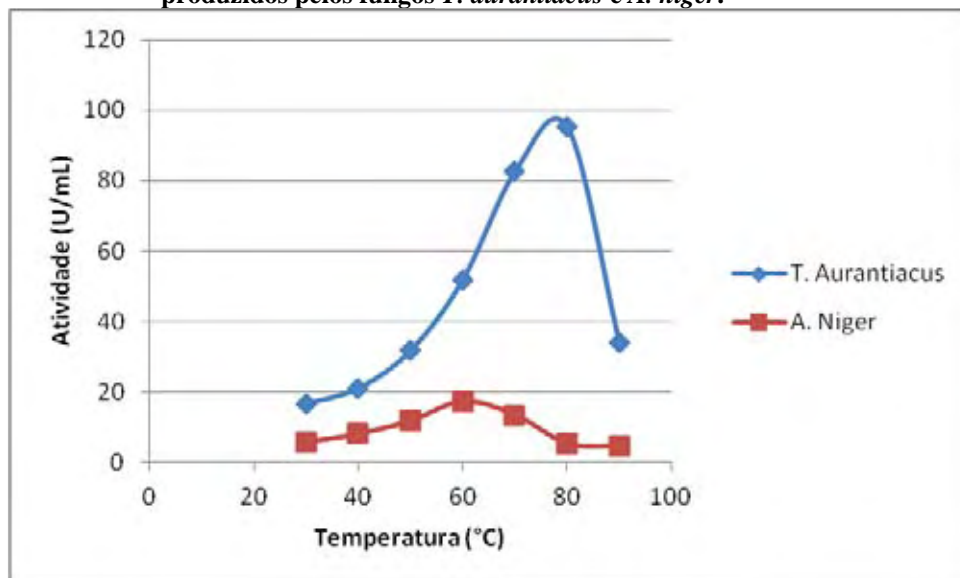
Referências	pH ótimo	pH estabilidade	Temp. ótima (°C)	Temp. de estabilidade (°C)
Watanabe et al., (1992)	4	4-4,5		>55
Unno et al., (1993)	4,5	2,5-9	55	
Galas e Romanowska (1997)	5	4,5-7	65	
Rashid e Siqddiqui (1997)	4,6-5,3	5,0-7,0	70	
JAGËR(2001)	4,5-5	4,0-8,0	60	>50

O extrato produzido pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* apresentou faixa ótima de pH entre 4,5 a 5,0, semelhante a obtida por Leite et al., (2008), e com o aumento de pH a atividade β -glicosidase alterou mais que 20% comparada com a atividade ótima (Figura 17).

Figura 17. pH ótimo dos extratos ricos em β -glicosidase de atuação no substrato PNP β G produzidos pelos fungos *T. aurantiacus* e *A. níger*.

A temperatura ótima de atuação do extrato enzimático (Figura 18) do fungo *T. aurantiacus* foi aproximadamente de 80°C semelhante à obtida por Leite et al., (2008) e para *A. níger* de 60°C, como dentro da faixa que outros autores obtiveram (Tabela 11).

Figura 18. Temperatura ótima dos extratos ricos em β -glicosidase de atuação no substrato PNP β G produzidos pelos fungos *T. aurantiacus* e *A. níger*.

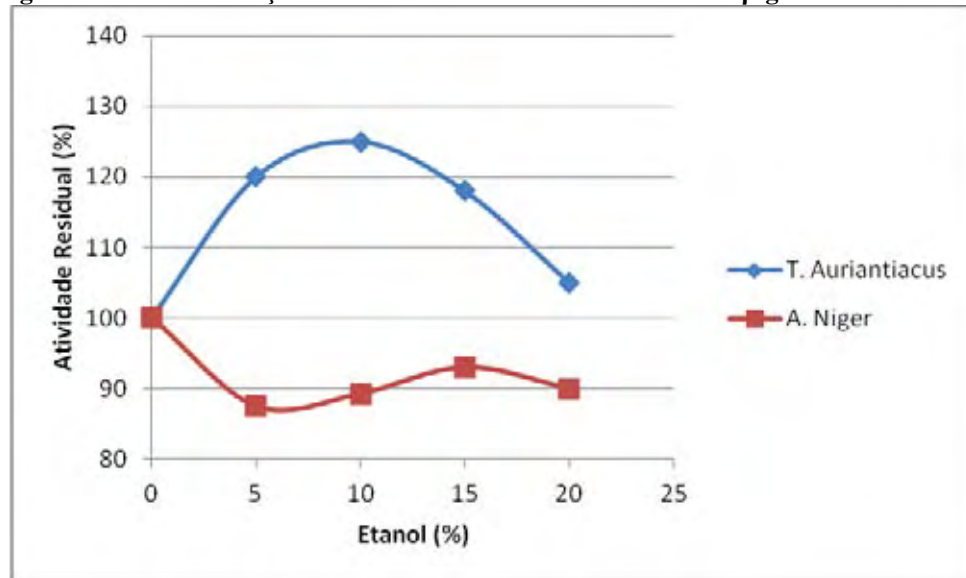


Desta maneira, a aplicação dos extratos enzimáticos foi realizada à temperatura de 60°C para o extrato enzimático do fungo *A. níger* e 70°C para o fungo *T. aurantiacus* e não sendo utilizado 80°C, pois segundo Leite et al, 2008, para o mesma cepa do fungo *Thermoascus aurantiacus* CBMAI756 utilizada neste trabalho, a enzima permaneceu estável a 70°C durante a aplicação de 1 hora do extrato em PNP β G o que não ocorreu acima desta temperatura.

5.2.3 Efeito da adição de etanol e glicose nos extratos enzimáticos.

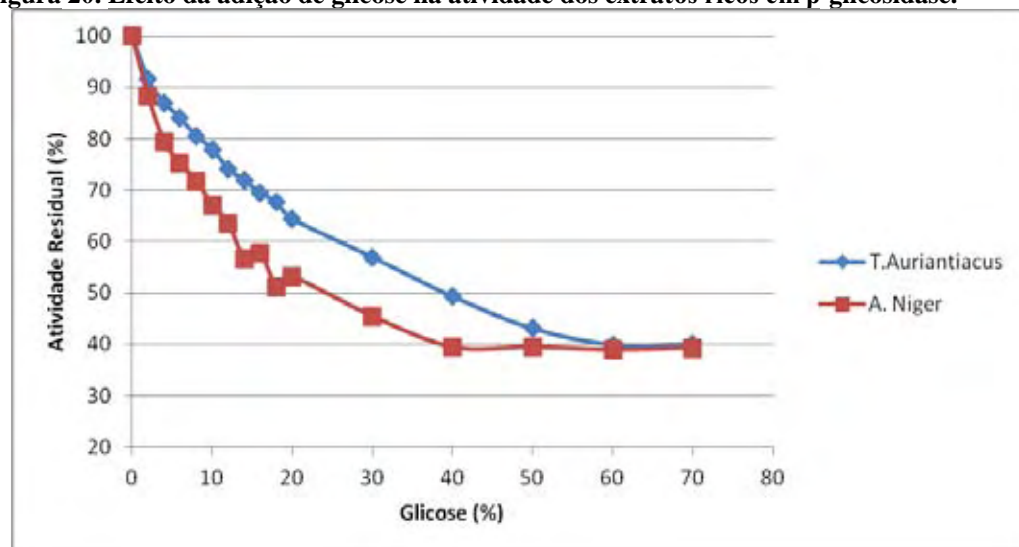
Na Figura 19, a adição de etanol em 10% diminui cerca de 13% a atividade do extrato produzido pelo fungo *A. níger* enquanto que, a atividade do fungo *T. aurantiacus* aumenta cerca de 20%. Este fator é importante, pois depois de fermentado o mosto possuirá cerca de 9% de teor alcoólico e nesta concentração o extrato do fungo *T. aurantiacus* possuirá atividade maior 30%, comparada com o do *A. níger*, podendo obter melhores resultados para o fungo *T. aurantiacus* nestas condições.

Figura 19. Efeito da adição de etanol na atividade aos extratos de β -glicosidase.



Não há muita diferença entre os efeitos de glicose dos extratos enzimáticos (Figura 20) ambos diminuem a atividade enzimática acentuadamente com a adição de açúcar chegando a 40% da atividade com a adição de 50% de açúcar, o que pode não ser favorável para a adição pré-fermentação alcoólica.

Figura 20. Efeito da adição de glicose na atividade dos extratos ricos em β -glicosidase.



5.3 OTIMIZAÇÃO DA ANÁLISE DE TERPENOS POR HS-SPME.

Foi realizado o delineamento fatorial completo para 3 variáveis sendo elas temperatura, tipo de revestimento da fibra e quantidade de etanol e assim realizados 18 ensaios em triplicata com total de 54 análises.

Como a análise foi utilizada para compreender a composição total de terpenos, terpineóides e norizoprenóides em fermentado de cana, os dados foram analisados com a soma do total do percentual relativo a cada volátil, para não ocorrer a influência da área individual que poderia tendenciar os resultados para o analito que tivesse a maior área.

Tabela 12. Valores médios da interação entre as variáveis para otimização HS-SPME.

Total R² ajustado(0,993)				
Fibra	Etanol	Temperatura	Média	P
PDMS	10	40	72,21	0,000
		70	51,7	
		100	39,24	
	25	40	18,56	
		70	9,37	
		100	30,57	
	40	40	0	
		70	0	
		100	0	
PDMSDVB	10	40	57,77	
		70	181,01	
		100	84,81	
	25	40	112,39	
		70	33,71	
		100	5,103	
	40	40	0	
		70	3,56	
		100	0	

É possível observar (Tabela12) que para o revestimento PDMS/DVB obtiveram-se valores mais altos, principalmente quando a análise foi realizada em temperatura de 70°C e concentração de etanol de 10%, possuindo valor médio 1,6 vezes maior que o experimento que obteve a segunda área maior realizado com fibra PDMS/DVB, etanol 25% e temperatura de 40°C, além disto o método analítico obteve ajuste alto ($R^2 = 0,9993$) o que indica uma boa repetibilidade.

Resultados semelhantes foram encontrados por Peña-Alvarez et al., (2006) que ao testar 4 tipos de fibra (PA, PDMS, PDMS/DVB, CW/DVB), duas temperaturas (25 e 65°C) e etanol em 10% para análise de terpenos em tequila concluiu que o melhor método de análise

era com o uso do revestimento de PDMS/DVB e como as temperaturas foram diferentes na extração de diferentes terpenos foi escolhida 25°C para as demais análises o que foi diferente deste trabalho visto as melhores condições para o total de terpenos foi a 70°C. Assim, para as análises posteriores de voláteis a metodologia empregada foi com a fibra PDMS/DVB, temperatura de 70°C e como o fermentado de cana possui graduação alcoólica por volta de 10% as análises foram realizadas sem que fosse necessário a diluição.

5.4 OTIMIZAÇÃO DA APLICAÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS.

5.4.1 Screening das variáveis – Delineamento fracionado 2⁶⁻¹.

Um total de seis variáveis (tempo, concentração, brix – teor de sólidos solúveis, agitação, etapas de aplicação e enzimas – extratos dos fungos *T. auriantiacus* e *A. niger*) foram testados para reação de hidrólise de terpenos usando 32 experimentos fornecidas pelo delineamento fracionado 2⁶⁻¹.

Tabela 13. Efeitos da aplicação do extrato enzimático obtidos através do delineamento fracionado 2⁶⁻¹.

Terpenos	<i>p</i> -cimeno		Limoneno		Linalol		Citronelal	
R-Sq(adj)	80,94%		59,55%		58,97%		71,47%	
Variáveis	Baixo	Alto	Baixo	Alto	Baixo	Alto	Baixo	Alto
Tempo	198,0*	214,9*	225,1*	262,8*	1236*	1408*	8596*	9754*
Concentração	204,0	208,9	239,1	248,7	1278	1366	8998	9351
Brix	206,8	206,1	199,9*	288*	1334	1310	8795*	9554*
Agitação	212,8*	200,1*	258,5*	229,3*	1236*	1408*	8762*	9587*
Etapas	176,1*	236,8*	236,2	251,6	1237*	1407*	7637*	10712*
Enzimas	232,8*	180,1*	274,9*	213*	1461*	1183*	10088*	8261*

*Valores significativos para P<0,1

Tabela 13. Continuação.

Terpenos	α -Terpineol		Citronelol		Pulegona		Neril-acetato	
R-Sq(adj)	65,5		58,85		75,86		69,48	
Variáveis	Baixo	Alto	Baixo	Alto	Baixo	Alto	Baixo	Alto
Tempo	558,3*	629,6*	741,5*	888,4*	3886	3949	5063	5501
Concentração	553,3*	634,6*	824,8	805,1	3887	3949	5128	5435
Brix	620,1*	567,8*	681,4*	948,5*	3511*	4325*	5039	5524
Agitação	593,7	594,2	763,2*	866,7*	3811	4025	5011	5552
Etapas	510,6*	677,4*	827,8	802,1	3340*	4496*	4608*	5955*
Enzimas	667,5*	520,4*	921,2*	708,7*	4401*	3435*	6769*	3794*

*Valores significativos para P<0,1

Tabela 13. Continuação.

Terpenos R-Sq(adj)	Isoeugenol		β -damascenona		4-Alil-1,2- dimetoxibenzenobenzeno	
	53,6		62,16		75,41	
Variáveis	Baixo	Alto	Baixo	Alto	Baixo	Alto
Tempo	2092*	2381*	7718	8355	70,13*	76,37*
Concentração	2233	2240	7889	8183	72,09	74,4
Brix	1995*	2478*	7643	8429	70,72*	75,78*
Agitação	2258	2215	7379*	8694*	74,41	72,08
Etapas	1977*	2496*	6609*	9464*	63,26*	83,23*
Enzimas	2505*	1968*	9369*	6704*	82,71*	63,78*

*Valores significativos para $P < 0,1$ **Tabela 13.** Continuação.

Terpenos R-Sq(adj)	β -Ionona		Nerolidol	
	70,77		71,47	
Variáveis	Baixo	Alto	Baixo	Alto
Tempo	206,8	214,8	6982*	7923*
Concentração	206,3	215,3	7309	7596
Brix	205,5	216,1	7144*	7761*
Agitação	199,3	222,3	7117*	7788*
Etapas	150,1*	271,5*	6204*	8701*
Enzimas	238,2*	183,4*	8194*	6711*

*Valores significativos para $P < 0,1$

Os efeitos estimados através do delineamento fracionado dos terpenos liberados estão indicados na Tabela 13 e os fatores considerados significativos foram aqueles que o valor de P foi inferior a 0,1 (Tabela 14).

De acordo com a Tabela 13 e Tabela 14 não foi possível identificar fatores comuns a todos os terpenos que fossem significativos, porém os resultados indicaram que o nível alto dos fatores tempo, concentração, brix e agitação, em sua maioria, elevou a liberação dos aromas e que a aplicação pós-processo de fermentação alcoólica e o uso do extrato produzido pelo fungo *T. Aurantiacus* também levou a maiores valores de liberação de terpenos.

Tabela 14. Valores de P indicando a significância dos efeitos estimados dos valores das variáveis obtidos através do delineamento experimental fracionado 2⁶⁻¹.

Variáveis	<i>p</i> -cimeno	Limoneno	Linalol	Citronelal	α -Terpineol
Tempo	0,025	0,032	0,007	0,013	0,032
Concentração	0,494	0,569	0,148	0,419	0,016
Brix	0,922	0,000	0,684	0,090	0,108
Agitação	0,085	0,091	0,007	0,067	0,985
Etapas	0,000	0,361	0,008	0,000	0,000
Enzimas	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000

Tabela 14. (Continuação)

Variáveis	Citronelol	Pulegona	Neril-acetato	Isoeugenol	β -damascenona
Tempo	0,012	0,000	0,269	0,057	0,269
Concentração	0,721	0,713	0,436	0,958	0,606
Brix	0,000	0,716	0,222	0,003	0,176
Agitação	0,070	0,000	0,174	0,766	0,028
Etapas	0,641	0,219	0,002	0,001	0,000
Enzimas	0,001	0,000	0,000	0,001	0,000

Tabela 14. (Continuação)

Variáveis	4-Alil-1,2-dimetoxibenzenobenzeno	β -Ionona	Nerolidol
Tempo	0,039	0,603	0,013
Concentração	0,428	0,559	0,419
Brix	0,090	0,488	0,090
Agitação	0,426	0,142	0,067
Etapas	0,000	0,000	0,000
Enzimas	0,000	0,001	0,000

Sendo assim, para etapa de otimização foi utilizado o extrato do fungo *T. aurantiacus*, aplicação foi realizada pós-fermentação e devido a limitações da fermentação alcoólica o Brix máximo indicado para produção de cachaça é 16° então, este foi utilizado para a etapa seguinte e a agitação foi fixada em 200 rpm.

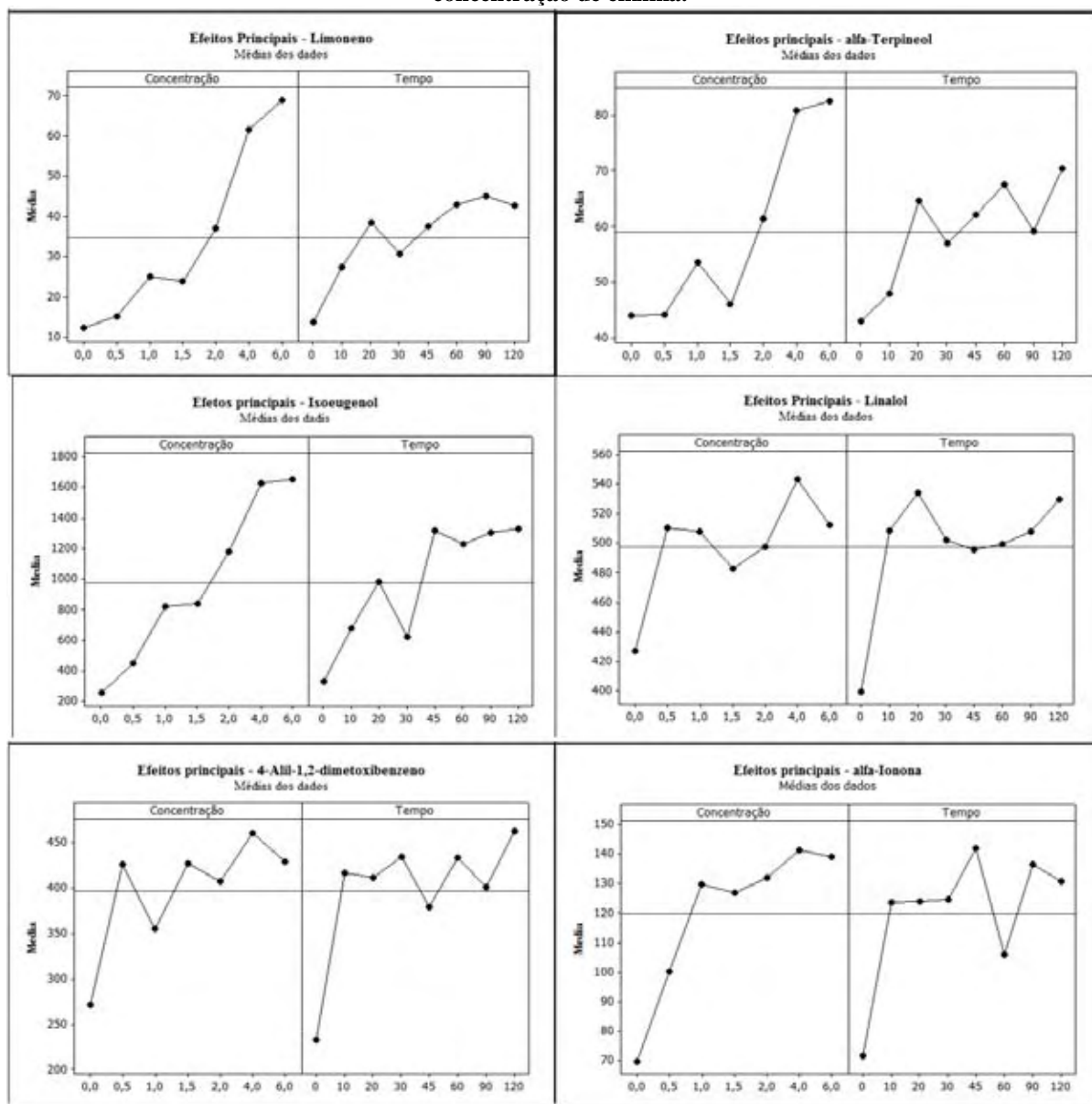
As variáveis tempo, fator que influenciou em 9 dos 13 terpenos, e concentração, fator que não influenciou significativamente a maioria das variáveis mas, por estar envolvida na maior parte das reações químicas e bioquímicas foram empregadas para o planejamento completo de otimização em que foi utilizado maiores números de níveis para verificar a influência do tempo e concentração.

5.4.2 Otimização da catálise enzimática.

Foi realizado o planejamento fatorial completo 7 (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 4 e 6 U/mL) X 8 (0, 10, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos) e a metodologia de superfície de resposta para encontrar o ótimo de tempo e concentração para o aumento da concentração de terpeno (*p*-cimeno), terpenóides (nerolidol, linalol, limoneno, α -terpineol, citronelal, citronelol, isoborneol, nerol, isopulegona, isoeugenol, limoneno, mirtenol, óxido de rosa, 1,4 – cineole, álcool fenchílico, isopulegol, cânfora) e norisoprenóides (β -ionona, α -ionona, 2,6,10,10-tetrametil-1-oxa-espiro-(4,5)-dec-6-eno, 4 – Alildimetoxibenzeno).

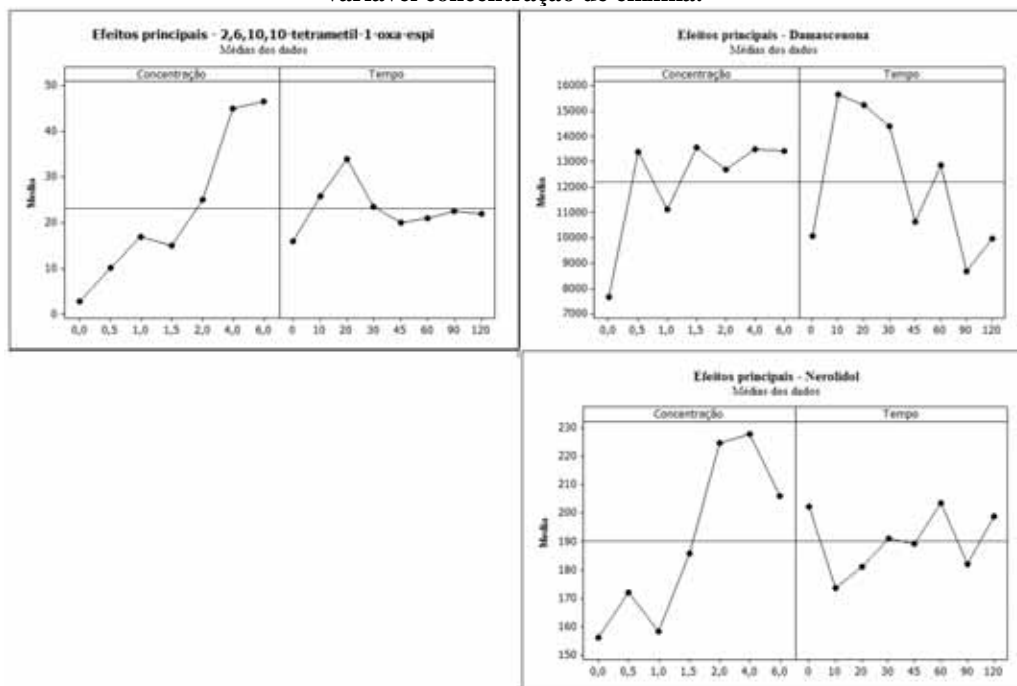
Terpenóides e norisoprenóides como limoneno, terpineol, isoeugenol, 4-alildimetoxibenzeno, α -ionona e linalol tiveram o aumento de área com o aumento de tempo e concentração (Figura 21), isto pode ser justificado devido o efeito da enzima β -glicosidase pela quebra das ligações β liberando estes compostos no fermentado de cana-de-açúcar.

Figura 21. Terpenóides, terpenos e norisoprenóides que sofreram modificação com as variáveis tempo e concentração de enzima.



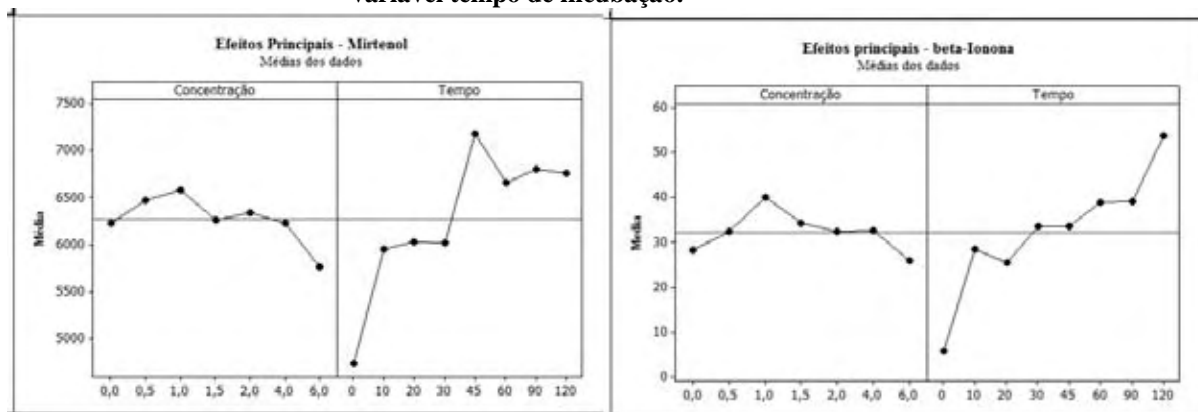
2,6,10,10-tetrametil-1-oxa-espiro-(4,5)-dec-6-eno, β -damascenona, nerolidol tiveram o aumento da área relacionados com o aumento da concentração do extrato enzimático(Figura 22) o que pode ser concluído que pelo extrato não estar puro outras enzimas podem estar degradando compostos mais complexos, como dioxigenases, e estas devem ter faixa ótima de temperatura de atuação diferente das β -glicosidasas e não são influenciadas pelo tempo de aplicação.

Figura 22. Terpenóides, terpenos e norisoprenóides que sofreram modificação na concentração com a variável concentração de enzima.



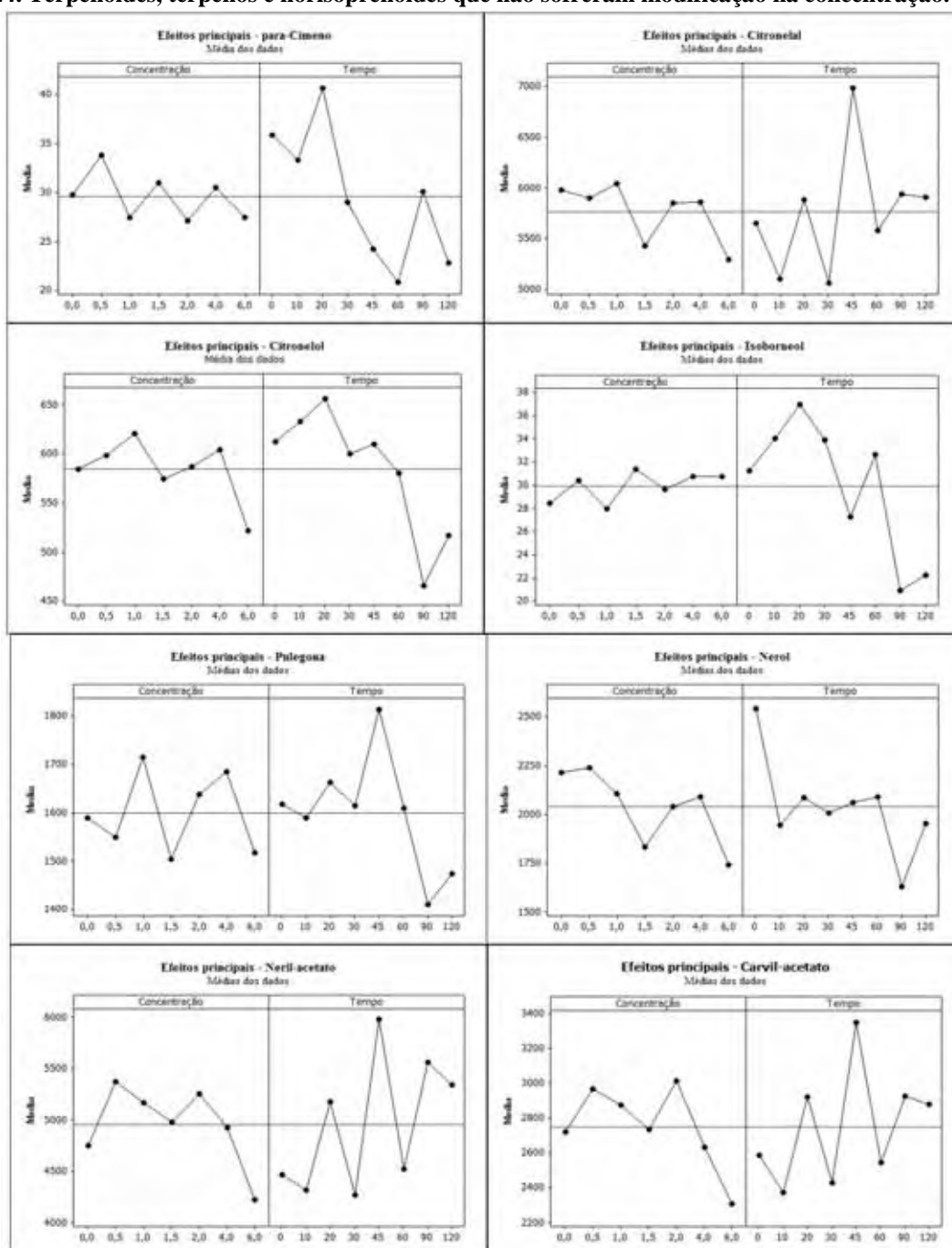
Compostos como mirtenol e β -ionona (Figura 22) foram liberados com o aumento do tempo, isto indica a possível degradação de moléculas mais complexas como carotenóides pelo efeito degradação térmica devido à temperatura, 70°C, aplicada no fermentado.

Figura 23. Terpenóides, terpenos e norisoprenóides que sofreram modificação na concentração com a variável tempo de incubação.



Citronelal, citronelol, isoborneol, pulegona, nerol, neril-acetato, carvil-acetato e *para*-cimeno não sofreram influência das variáveis (Figura 24) o que indica a sua presença no fermentado antes da aplicação do extrato enzimático, porém observa-se que a concentração dos mesmos varia isto pode ser justificado devido a perdas no processo de aplicação do extrato enzimático em alguns casos.

Figura 24. Terpenóides, terpenos e norisoprenóides que não sofreram modificação na concentração.

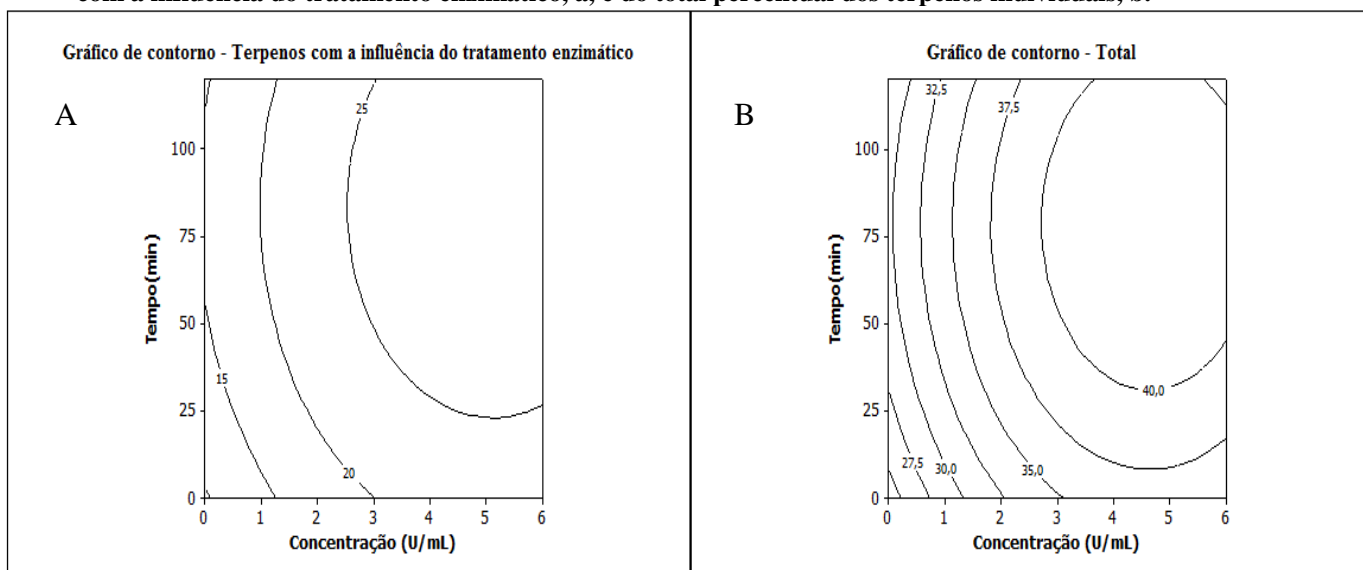


Para o tratamento por metodologia de superfície de resposta foi necessário a homogeneização dos resultados devido à diferença de concentração obtida para todos os compostos (Figura 21, 22, 23 e 24), assim foi calculado a contribuição percentual relativa a cada composto.

Como não é conhecida na literatura a influência individual dos terpenos na qualidade sensorial da aguardente de cana foi realizado duas formas de MSR, sendo uma relacionada com a contribuição percentual dos terpenos que sofreram modificação devido a ação da

concentração e/ou tempo da aplicação de extrato enzimático e a outra total (soma da contribuição percentual de todos os terpenos encontrados). Ambos os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ajustados por regressão do MRS usando a equação polinomial resultante.

Figura 25. Gráficos de contorno obtidos com a metodologia de superfície de resposta (MRS) dos terpenos com a influência do tratamento enzimático, a, e do total percentual dos terpenos individuais, b.



$$T_i = -0,48C^2 - 0,000872 T^2 + 4,89C + 0,146T + 10,29$$

$$R^2 = 0,88$$

$$T_t = -0,58C^2 - 0,000934T^2 + 5,37C + 0,147T + 9,61$$

$$R^2 = 0,63$$

Realizando o tratamento pela metodologia da superfície de resposta (MRS) do total dos terpenos que sofreram modificação devido ao tratamento enzimático, é possível observar (Figura 25a) que a região ótima de atuação do extrato é em concentrações e tempo maiores que 3U/mL e que 25 minutos, respectivamente, o que é semelhante à encontrada para a soma de todos os aromas (Figura 25b).

Contudo, como observado pela equação, Figura 25 a e b, os terpenos que sofreram modificação da concentração e/ou tempo os dados foram mais ajustados aos parâmetros ($R^2 = 0,88$) comparados com o total dos terpenos ($R^2 = 0,63$) que, como discutido anteriormente, está relacionado com fatores como a presença de outras enzimas no extrato enzimático, degradação térmica de outros compostos complexos ou a presença de compostos terpênicos no caldo de cana. Assim, foi possível compreender o efeito do extrato enzimático para o aumento de terpenóides livres e que em concentrações de enzimas superiores a 3U/mL e tempos maiores que 25 minutos são obtidos maiores concentrações destes aromas.

6. CONCLUSÕES

- Quatro entre vinte uma variedades foram diferenciadas, sendo que a SP813250 mostrou ser pobre em quantidade e diversidade de voláteis. As variedades RB855536, RB987935 e RB975952 formaram por catálise ácida uma grande variedade e quantidade de voláteis sendo, predominantemente, compostos terpênicos o que pode levar a produção de aguardente da cana rica em aromas agradáveis e de alta qualidade.
- Dezesete de vinte e uma variedades não foram diferenciadas o que pode ser justificado devido o direcionamento da modificação genética para produção de cana-de-açúcar voltada a produção de açúcar e álcool.
- A diferenciação estrutural das variedades de cana-de-açúcar os voláteis foram liberados /formados predominantemente pela casca e nódulo(nó) da planta o que pode ser interessante no direcionamento da produção de aguardentes de cana de alta qualidade sensorial.
- Os extratos enzimáticos produzido pelos fungos *T. aurantiacus* e *A. niger* tiveram atividades específicas de 5,0U/mg e 5,7U/mg , pHs ótimos de atuação no substrato na faixa de 4 à 5 e temperatura ótima de 80°C e 60°C respectivamente. O efeito da concentração etanol aumentou a atividade β -glicosidase para o extrato produzido pelo fungo *T. aurantiacus* e diminuiu para o *A. niger* e para ambos os extratos em presença de açúcar diminuíram significativamente a atividade da enzima.
- Para análise de terpenos o uso de fibra revestida por PDMS/DVB, 70°C e 10% de etanol mostrou aumentar a sensibilidade de análise cerca de 1,61 vezes comparada com a segunda metodologia que obteve maiores valores de área (PDMSDVB, 40°C e 25% de etanol), assim este método analítico foi empregado para as análises posteriores.
- Pelo delineamento fatorial fracionado 2^{6-1} foi possível selecionar para etapa de otimização as variáveis que levaram a valores altos de área dos terpenos sendo elas o

Brix de 16°, agitação de 200rpm, aplicação após o processo de fermentação alcoólica e o uso do extrato produzido fungo *T. aurantiacus*.

- Os fatores tempo e concentração foram variados pelo delineamento completo, afim de otimizar a aplicação do extrato enzimático no fermentado de cana-de-açúcar, assim foi possível diferenciar terpenos, terpeneóides que tiveram o aumento de área com o aumento de tempo e/ ou concentração e os outros que não sofreram modificação com a variação dos fatores tempo e concentração de β -glicosidase.
- O uso da metodologia da superfície de resposta (MRS) evidenciou que do total dos terpenos que sofreram modificação devido ao tratamento enzimático a região ótima de atuação do extrato foi em concentrações e tempo maiores que 3U/mL e 25 minutos o que é semelhante a encontrada para a soma de todos os aromas (Figura 25b).
- Desta maneira com os resultados obtidos até o momento é indicado para projetos futuros o estudo das variedades de cana com relação aos compostos mais complexos como carotenoides e ácido linolênico, diferenciação sazonal e modificações genéticas da planta voltada para a produção de aguardente de cana, outras enzimas que possam contribuir para o aumento de norizoprenóides na bebida, micro-organismos como leveduras que tenha potencial para produzir enzimas que liberem compostos voláteis da planta no processo de fermentação e a compreensão de quais os aromas terpênicos seriam mais agradáveis para os consumidores de cachaça.

7. REFERÊNCIAS

AMERINE, M.A.; BERG, H. W.; CRUESS, W. V. **The technology of winemaking**. 3. ed, Westpot: The AVI Publi, 1972.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n.19, p. 2145-2148, 1990.

BERRY, D. R. Alcoholic beverage fermentations. **Fermented beverage production**. Academic and Professional. 2 ed. London: Blackie, 1995, p. 25-40.

BORZANI, W; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Tecnologia das Fermentações**. 4. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1975.

BOSCOLO, M. ; BEZERRA, C.W.B ; CARDOSO, D. R. ; LIMA NETO, B. S. ; FRANCO, D W . Identification and dosage by HRGC of minor alcohols and esters in Brazilian sugar-cane spirit. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, v. 11, n. 1, p. 86-90, 2000.

CASCIATORI, F. P. **Biorreatores de leito fixo para fermentação em estado sólido: ampliação de escala para produção de celulases de origem fúngica**. Relatório Parcial do Trabalho de Doutorado. São Paulo: FAPESP, 2012. No prelo.

CARDEAL, Z. L.; MARRIOT, P. J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry analysis and comparison of volatile organic compounds in Brazilian cachaça and selected spirits. **Food Chemistry**, v. 112, n.3, p. 747–755, 2009.

CARDOSO, D. R.; ANDRADE-SOBRINHO, L. G.; LEITE-NETO, A. F.; RECHE, R. V.; ISIQUE, W. D.; FERREIRA, M. M. C.; LIMA-NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Comparison between cachaça and rum using pattern recognition methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3429-3433, 2004.

CORDONNIER R.E.; GÜNATA Y.Z.; BAUMES R.L.; BAYONOVE C.L. Recherched'un materiel enzymatique adapte a l'hydrolyse des precurseurs d'arome de nature glycosidique du raisin. **Connaissance de la Vigne et du Vin** 23. p.7-23, 1989

CORREIA P.R. M. ; FERREIRA M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados : Explorando procedimentos quimiométricos para tratamentos de dados analíticos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p.481-487, 2007.

DAMASCENO, F. C. **Microextração em fase sólida no modo headspace aplicada ao estudo de substâncias voláteis de plantas infestadas por galhas foliares entomógenas**. 143f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

DA-SILVA, R.; GOMES, E.; FRANCO C.M.L. Pectinases, hemicelulases e celulases substrato, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 249-260, 1997.

DE LA CALLE GARCIA D., MAGNAGHI S., REICHENBACHER M., DANZER K., Systematic optimization of the analysis of wine bouquet components by solid-phase microextraction. **Journal of High Resolution Chromatography**, v.19, n.5, p.257-262, 1996

DEGENHARDT J.; GERSHENZOB J.; BALDWIN I. T.; KESSLER A. Attracting friends to feast on foes: engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies. **Current Opinion In Biotechnology**, v. 14, n.2, p. 169-176, 2003.

DEL BIANCHI, V. L.; CAPALBO, D.M.F.; MORAES, I.O. Fermentação em estado sólido. **Biotecnologia Industrial**. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

DEMYTTENAERE, J. C. R., MARTINEZ, J. I. S., VERHE, R., SANDRA, P.; KIMPE, N.D. Analysis of volatile of malt whisky by solid-phase microextraction and stirbar sorptive extraction. **Journal Chromatography A**, v. 985, p. 221-232, 2003.

DIÉGUEZ, S. C.; DE LA PEÑA, M. A. L. G.; GÓMEZ E. F. Approaches to Spirit Aroma: Contribution of Some Aromatic Compounds to the Primary Aroma in Samples of Orujo Spirits. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, p. 7385–7390, 2003.

ETIÉVANT, P. Wine and Volatile Compounds in Food and Beverages. In: Maarse, H.(Ed.). **Volatile compounds in food and beverages**. New York: Marcel Dekker, p. 483-533, 1991

FADEL, M. Production Physiology of Cellulases and β -glucosidase Enzymes of *Aspergillus niger* Grown under State fermentation Conditions. **Online Journal of Biological Sciences**, v.5, p. 401-411, 2000.

FERREIRA, A. C. S; MONTEIRO, J.; OLIVEIRA, C.; PINHO, P. G. Study of major aromatic compounds in port wines from carotenoid degradation. **Food Chemistry**. Porto, p. 83–87, 2008.

FARIA, J. B.; LOYOLA, E.; LÓPEZ, M. G.; DUFOUR, J. P. Cachaça, Pisco and Tequila. In: LEA, A. G. H.; PIGGOTT, J. R. **Fermented Beverage Production**. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, p. 335-363, 2003.

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; DI STEFANO, R.; BRIONES, A.; Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from muscat must by different yeast species. **Food Microbiology**, v. 20, p. 35-41, 2003.

GÜNATA, Y.Z., BITTEUR S., BRILLOUET J.M., BAYONOVE C.L., CORDONNIER R. Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. **Carbohydrate Research**, v. 184, p. 139-149, 1988.

IARC - International Agency for Research on Cancer. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans**, v. 71, 1999.

IBRAC. Instituto Brasileiro de Cachaça. **Tópico: Mercado interno e externo**. Disponível em <http://www.ibrac.net/> acesso em: 12 fev. 2013.

ILLANES, A. Stability of biocatalysis. **Electronic Journal of Biotechnology**. Valparaíso, v. 2, n.1, p. 1-9, 1999.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 13 de 29 de Junho, 2005, que dispõe sobre regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. Diário Oficial da União, Brasília, n. 124, quinta-feira, 30 de junho de 2005. Seção 1(a).

JÄGER, S.; BRUMBAUER A.; FEHÉR, E.; RÉCZEY K.; KISS L. Production and characterization of β -glucosidases from different *Aspergillus* strains. **World Journal of Microbiology**, v. 17, p. 455-461, 2001.

JANZANTTI, N. S. **Compostos Voláteis e Qualidade de Sabor da Cachaça**. Tese de Doutorado. 2004. 179f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

LAMBERTON J. A. The long-chain aldehydes of sugar-cane wax. **Australian Journal of Chemistry**, v.18, p. 911-13, 1965.

LÉAUTÉ, R. Distillation in alambic. **American Journal of Enology and Viticulture**. Califórnia, v.41, n.1, p.90-103, 1990.

LÉDON, N; CASACÓ, A; REMIREZ, D; GONZÁLEZ, A; CRUZ, J; GONZÁLEZ, R; CAPOTE, A; TOLON, Z; ROJAS, E; RODRÍGUEZ.N.M; RODRÍGUEZ,S; ANCHETA, O; CANO, M. C; Effects PF a mixture of fatty acids from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) wax oil in two models of inflammation: Zymosan-induced arthritis and mice tail test of psoriasis. **Phytomedicine**, v.14, p.690–695, 2007.

LEE, K. Y. M.; PATERSON, A.; PIGGOTT, J. R.; RICHARDSON, G. D. Perception of whisky flavour reference compounds by Scottish distillers. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 106, p. 203-208. 2000.

LEITE R. S. R.; GOMES E; DA-SILVA R. Characterization and comparison of thermostability of purified β -glucosidases from a mesophilic *Aureobasidium pullulans* and a thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**. São José do Rio Preto, v. 42, p. 1101–1106. 2007

LEITE, R. S. R. **Purificação, Caracterização Físico-Química e Termodinâmica de β -glucosidases produzidas pelos microorganismos *Aureobasidium pullulans* e *Thermoascus aurantiacus*: Aplicação em isoflavonas e terpenos glicosilados**. 2007. 80f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2007.

LIMA, U. A. **Estudo dos principais fatores que afetam os componentes do coeficiente não álcool das aguardentes de cana**. 1964. 141f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1964.

LOCKWOOD, G.B. Review: Techniques for gas chromatography of volatile terpenoids from a range of matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 936 p. 23–31. 2001.

LÓPEZ R., AZNAR M., CACHO J., FERREIRA, V. Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v.966, p.167–177, 2002.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARRA, L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p. 267-275, 1951.

MARTÍN, S.G; PEÑA, R. M; BARCIELA, J. Solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry (HS-SPME-GC–MS) determination of volatile compounds in orujo spirits Multivariate chemometric characterization. **Food Chemistry**, v.118, p. 456–461, 2010.

MARTINS, E. Produção de enzimas pectinolíticas pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação em estado sólido utilizando resíduos agro-industriais. 2003. 108f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2003.

MONTEIRO, B. M. S. **Composição química de aguardentes de cana-de-açúcar obtidas por fermentação com diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisie***. 2010. 71f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 6 ed. New York: John Wiley and Sons, 2004.

RODRIGUES, M. I; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 2 ed. Campinas: Cárita editora, 2008.

NÓBREGA, I.C.C. Análises de compostos voláteis em aguardente de cana por concentração dinâmica do “headspace” e cromatografia gasosa-espectrometria de massas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.23, n.2, p. 210-216, 2003.

NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods.

Disponível em <<http://www.itl.nist.gov/handbook/>> acesso em: 17 fev. 2013.

NONATO, E. A.; CARAZZA F.; SILVA F.C.; CARVALHO C.R.; de L. CARDEAL, Z. A headspace solid-phase microextraction method for the determination of some secondary compounds of Brazilian sugar cane spirits by gas chromatography. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, p. 3533-3539, 2001

NOVAES, F. V.; STUPIELLO, J. P.; OLIVEIRA, E. R.; VALSECHI, O. I Curso de Extensão em tecnologia de aguardente de cana (apostila). Piracicaba,. 104 p. 1974

NYKÄNEN, L. E NYKÄNEN, I. Distilled beverages. In: MAARSE, H. (Ed.) **Volatile compounds in food and beverages**. New York: Marcel Dekker, 1991.

NYKÄNEN, L. Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 37, n.1, p. 84-96. 1986.

PALMA-FERNANDEZ E. R. D.; GOMES E.; DA-SILVA R. Purification and characterization of two β -Glicosidases from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* Miede. **Folia Microbiologica**, v. 47, p. 685–690, 2002.

PALMA-FERNANDEZ, E.R.P. Produção, purificação e caracterização bioquímica de β -glicosidases do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus*. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2002.

PEÑA-ALVAREZ, A; DÍAZ, L.; MEDINA, A; LABASTIDA, C; CAPELLA, S; VERA, L.E. Characterization of three Agave species by gas chromatography and solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1027, p. 131–136, 2004.

PINO, A. J. Characterization of rum using solid-phase microextraction with gas chromatography–mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 104, p. 421-428. 2007.

RAPP, A. Volatile flavour of wine: correlation between instrumental analysis and sensory perception. **Nahrung**, v.42, p.351-363, 1998.

ROCHAT, D.; MEILLOUR, P. N.; ESTEBAN-DURAN, J. R.; MALOSSE, C.; PERTHUIS, B.; MORIN, J. P.; DESCOINS, C. Identification of pheromone synergists in American Palm Weevil, *Rhynchophorus palmarum*, and attraction of related *Dynamis borassi*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, p. 155-187, 2000.

SUOMALAINEN, H.; LEHTONEN, M. The production of aroma compounds by yeast. **Journal of Instrumentation**, v.85, p. 149-156, 1979.

SOUZA, M. D. A; VÁSQUEZ, P.; MAESTRO, N. L; ACREE, T. E; LAVIN, E. H. Characterization of Cachaça and Rum Aroma. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.54, p. 485–488. 2006.

SILVA F. A. C.; GUEDES P. P. "Nor-isoprenoids profile during port wine ageing - influence of some technological parameters." **Analytica Chimica Acta**, v.513, p. 169-176, 2004.

TOBAL, T. M. Aplicação de β -glicosidades produzidas pelos microrganismos *Aureobasidium pullulans* e *Thermoascus aurantiacus* ao processo fermentativo da aguardente de cana com foco na produção de terpenos. 2011.82f Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2011.

TOLEDO, J. F. A.; FARIA, J. B. Teores de dimetil sulfeto estimados pelo Método níquel-raney e aceitabilidade de Amostras de cachaça. **Alimentos e Nutrição**, v.15, n.1, p.51-54, 2004.

UENOJO, M; JUNIOR. M.R.M; PASTORE, G.M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, v.30 n.3, p. 616-622, 2007.

VELOSO, T. “Com foco nos Estados Unidos, Apex investirá para aumentar a exportação de cachaça.” **Revista Valor Econômico**.

Disponível em <<http://www.valor.com.br/brasil/2897206/com-foco-nos-eua-apex-investira-para-aumentar-exportacao-de-cachaca#ixzz2KhWZ4Nx9>> Acesso em: 12 fev. 2012.

VIEIRA, A. F. C. S. **Aplicação de Métodos Quimiométricos aos Resultados de Técnicas Hifenadas para Caracterização da Aguardente de Cana-de-açúcar de Cabo Verde**. 2007. 83f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Aveiro, 2007.

WILSON, B.; STRAUSS, C. R.; WILLIAMS, P. J. Changes in free and glycosidically bound monoterpenes in developing muscat grapes. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.32, p.919-924, 1984.

WINTHERHALTER, P.; ROUSEFF, R. Carotenoid-Derived Aroma Compounds: An Introduction. **Carotenoid-Derived Aroma Compounds**. 1 ed. Washington D. C:American Chemical Society, 2002, p.1-17.

WITHERS S. T.; KEASLING J. D. Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v.73, n.5, p.980-990, 2007.

YANG, X.; PEPPARD, T. Solid-phase microextraction for flavor analysis. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 42, p. 1925 – 1930, 1994.

YOKOYA, F. **Fabricação da aguardente de cana: série fermentações industriais**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”, 1995.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____/____/____

Assinatura