

**Universidade de Brasília - UnB  
Instituto de Ciências Biológicas - IB  
Departamento de Biologia Celular  
Pós-Graduação em Biologia Molecular**

**Avaliação de parâmetros operacionais e  
remoção de congêneres secundários tóxicos  
para melhoria da qualidade da cachaça de  
alambique<sup>®</sup>**

**Brener Magnabosco Marra**

**Orientador: Prof. Dr. Cezar Martins de Sá**

**Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fatima Grossi de Sá**

**Tese apresentada à Universidade de Brasília,  
como parte das exigências do programa de pós-  
graduação em Biologia Celular, para obtenção  
do título de Doutor em Biologia Molecular.**

**Agosto 2008  
Brasília - DF**

**Banca Examinadora:**

**Dr. Rogelio Lopes Brandão**

NUPEB - UFOP

**Dr. Juan José Verdesio**

FAV - UnB

**Dr. Jurandir Rodrigues de Souza**

Instituto de Química - UnB

**Dr<sup>a</sup>. Lídia Maria Pepe de Moraes**

Depto de Biologia Celular - UnB

**Dr. Cezar Martins de Sá**

Depto de Biologia Celular – UnB

**Agosto 2008  
Brasília - DF**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO – UnB

Marra, Brener Magnabosco. Avaliação de parâmetros operacionais e remoção de congêneres secundários tóxicos para melhoria da qualidade da cachaça de alambique <sup>®</sup> / Brener Magnabosco Marra. – Brasília, 2008. 89 p.

Tese (doutorado) – Universidade de Brasília, 2008. Bibliografia.

1. Introdução, 2. Otimização da temperatura do mosto e do tempo de alimentação das dornas de fermentação aumenta a produção de cachaça em alambique de três corpos, 3. Processo de remoção de congêneres secundários tóxicos de destilados (cachaça) utilizando o abrandador quitosana, 4. Discussão e considerações finais, 5. Referências bibliográficas, 6. Anexos.

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade de Brasília, pela oportunidade de realização do curso, especialmente aos meus orientadores Cezar Martins de Sá e Maria Fátima Grossi de Sá.

A toda minha família pelo apoio, incentivo, carinho, confiança e paciência, especialmente minha mãe.

Aos amigos Djair Souza e Gustavo Oliveira pela colaboração e parceria.

Aos Srs. Carlos Átila Álvares da Silva e José Ribeiro, pelo apoio a pesquisa.

E a todas as pessoas que, de alguma maneira contribuíram para o êxito deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), por ter financiado meus estudos durante 30 meses.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, especialmente ao Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga.

## **BIOGRAFIA**

Brener Magnabosco Marra, filho de Paulo Humberto Marra e Marlene Magnabosco Marra, nasceu em 26 de Abril de 1978, na cidade de Uberaba, Estado de Minas Gerais. Atualmente, é casado e possui um filho.

Graduou-se no curso de Bacharelado em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Viçosa em fevereiro de 2002.

Em fevereiro de 2004, concluiu o Curso de Mestrado em Fitopatologia, pelo departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília.

Ingressou no Curso de Doutorado em Biologia Molecular nesta mesma instituição em março de 2004, submetendo-se à defesa de tese em 29 de agosto de 2008.

Durante o curso de doutorado prestou consultoria agrônômica em usinas e destilarias de cachaça, álcool e açúcar no centro-oeste.

## ÍNDICE REMISSIVO

<i>CONTEÚDO</i>	<i>Página</i>
APRESENTAÇÃO	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	02
2. PARTE I	11
2.1. Introdução	17
2.2. Materiais e Métodos	19
2.3. Resultados e Discussão	22
2.4. Conclusões	29
2.5. Tabelas e Figuras	28
2.6. Referências Bibliográficas	35
3. PARTE II	37
3.1. Patente Requerida	40
3.2. Resumo	41
3.3. Reinvidiações da Patente Requerida	42
3.4. Relatório Final da Patente Requerida	44
3.5. Introdução	62
3.6. Materiais e Métodos	64
3.7. Resultados e Discussão	66
3.9. Tabelas e Figuras	69
3.10. Referências Bibliográficas	72
4. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
6. ANEXOS	85

## APRESENTAÇÃO

O presente trabalho é parte das exigências do programa de pós-graduação em Biologia Celular, para obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular, e trata de aspectos biotecnológicos envolvidos na fermentação, destilação da cachaça e remoção de congêneres tóxicos de destilados em geral, especialmente a cachaça.

Este trabalho foi dividido em duas partes para diferenciar os experimentos: o primeiro sobre a sistematização e otimização da fermentação e destilação em alambique de cobre de três corpos para produção de cachaça durante safras seguidas e o segundo sobre a remoção dos congêneres secundários tóxicos de destilados, especialmente a cachaça. A introdução enfatiza os principais conceitos, o panorama econômico, o processo produtivo, os parâmetros físico-químicos estudados na produção de aguardente e as estratégias de remoção destes congêneres.

A primeira parte foi escrita na forma de artigo científico (em português), submetido na revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB). Esta escolha foi feita baseada na importância regional e nacional do tema. Para atingir os produtores e consumidores, uma revista brasileira e em língua portuguesa teria maior impacto, pois trata-se de processos produtivos práticos realizados na maioria das instalações produtoras do País. A segunda parte refere-se a uma patente requerida e publicada junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) sobre o processo de remoção de congêneres tóxicos, portanto, foi escrito na forma de patente de acordo com as exigências do órgão. Além disso, foi redigido um artigo científico sobre este processo de remoção de congêneres secundários da cachaça e que foi submetido na revista *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. Entretanto, não houve preocupação com a redundância das referências bibliográficas citadas no corpo da tese.

Posteriormente, foi feita uma discussão, tentando correlacionar os dois trabalhos e o impacto destas inovações tecnológicas para o setor produtivo. Finalmente, no curso deste

projeto de tese, foram realizados outros trabalhos em colaboração e encontram-se em anexo. Porém, não fazem parte da discussão desta tese. Esperamos, desta forma, facilitar a leitura e compreensão dos resultados alcançados.



## RESUMO

Marra, Brenner Magnabosco, Universidade de Brasília, Agosto de 2008. **Análise sistemática da fermentação e destilação em alambique e remoção de congêneres secundários tóxicos dos destilados**®. Orientador: Cezar Martins de Sá.

Cachaça é o destilado genuinamente brasileiro produzido a partir da fermentação e destilação do caldo de cana-de-açúcar, cuja importância econômica vem crescendo aceleradamente. Dessa forma; o manejo, controle e sistematização das operações unitárias da fermentação e destilação são fatores fundamentais no desenvolvimento de estratégias de melhoria físico-química, sensorial e rendimento industrial da cachaça comercial de qualidade. Neste trabalho, avaliamos e sistematizamos os principais parâmetros físico-químicos envolvidos no processo de fermentação e destilação durante safras seguidas (2005, 2006 e 2007), sob condições operacionais práticas conduzidas na maioria das unidades produtoras do País. O controle do tempo e temperatura da alimentação da dorna de fermentação, teor alcoólico, velocidade e fracionamento da destilação, entre outros, demonstraram-se fundamentais para a produção e produtividade da cachaça de qualidade. Adicionalmente, foi desenvolvido um processo tecnológico de remoção de congêneres secundários tóxicos (aldeídos, furfural, hidroximetilfurfural, cobre, etc) e redução de valor calórico de destilados, especialmente a cachaça, através da utilização do abrandador quitosana.

**Palavras-chaves:** cachaça, fermentação, destilação, congêneres secundários e quitosana.

## ABSTRACT

Marra, Brener Magnabosco, Universidade de Brasília, August, 2008. **Systematic evaluation of the physical-chemical parameters implicated on the fermentation and distillation process of cachaça and remove secundaries toxics compounds of spirits** ®. Adviser: Cezar Martins de Sá.

Cachaça is genuinely a Brazilian spirit produced from fermentation and distillation of sugar cane, whose economic importance has been growing apace. Thus, the management, control and systematization of fermentation and distillation operations are fundamental factors to develop strategies for improvement of physico chemical and sensorial characteristics as well as performance industrial cachaça of commercial quality. In the present study we have performed a long term systematic evaluation of the physico-chemical parameters implicated in the fermentation and distillation processes during three seasons (2005, 2006, 2007). We have shown that controlling the time and temperature of fermentation vat feeding, alcohol level, distillation speed, distillation division, among others, are crucial for higher production and productivity of cachaça. In addition, we developed a technological process for removal of related toxic compounds and reducing the calorific value of total spirits using chitosan.

**Keywords: cachaça; fermentation, distillation; secundaries compounds and chitosan.**



## 1. INTRODUÇÃO

*No princípio era a cana, o açúcar, o melado, a rapadura e o melaço. E no alambique, destilou-se o mosto fermentado. Nasceu o vinho de mel de cana, aguardente da terra, vinho da terra, jeribita da terra. A excelência foi chamada de paraty – um destilado superior e mais caro, feito na cidade do mesmo nome. Finalmente a cachaça, do espanhol cachaza, bagaceira popular. Depois pinga, cana, caninha. Bebida dos mestiços, negros e índios, dos brancos e dos primeiros brasileiros. “Alimento”, oferenda, estimulante, moeda, mercadoria, meio de escambo, produto de exportação. A cachaça, nos seus engenhos explora o território, coloniza, finca a cruz, marca fronteiras, funda vilas, sustenta ciclos econômicos, umedece nossa história. Perseguida, proibida e contrabandeada, discriminada e indiscriminada – a cachaça resistiu a tudo e a todos. Foram 124 anos de proibição legal da produção, comércio e consumo da cachaça: 1635 a 1759. Paulista, inventada em São Vicente, ela está completando 474 anos de vida. A sua alma é a mesma do povo brasileiro: feita de suor, sonho, alegria, mística, sensualidade e beleza. Assim, a cachaça reina como nome típico e exclusivo da bebida nacional, única, feita no Brasil. (trecho extraído do livro Cachaça – Prazer Brasileiro, de Marcelo Câmara, 2003).*

Atualmente, cachaça é um destilado alcoólico simples do caldo de cana-de-açúcar obtido a partir do mosto fermentado e com graduação alcoólica de 38% a 48%, vol. a 20° C (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, 2006). Segundo a Associação Brasileira de Bebidas (2005), a produção brasileira de cachaça é de aproximadamente 1,8 bilhões de litros por ano (400 milhões de litros de cachaça artesanal, destilada em alambiques e o restante em destilarias automatizadas, a cachaça industrial, produzida em destiladores contínuos, com controle e intervenção dos

parâmetros físico-químicos) e que já movimentava aproximadamente U\$ 2,5 bilhões anualmente em 125 mil hectares de cana-de-açúcar dedicados apenas ao destilado. A importância econômica da cachaça vem crescendo aceleradamente devido à recente denominação de origem que a classificou como sendo um produto genuinamente brasileiro pelo Decreto nº 4062 (MAPA, 2001), e que alavancou ainda mais sua aceitação no mercado nacional e internacional. A cadeia produtiva da cachaça vem desempenhando também um importante papel na estruturação de milhares de pequenas propriedades rurais no Brasil, emprega até 1 milhão de trabalhadores em toda a cadeia e possui raízes culturais e históricas. Esse novo cenário demanda do setor produtivo uma sistematização dos parâmetros e variantes do processo produtivo, sobretudo nas fases de fermentação e destilação e sua influência e melhoria na composição físico-química, tanto inorgânica (metais e outros), como orgânica (componentes secundários) desse tipo de bebida (Lima *et al.*, 2006, Aresta *et al.*, 2001).

O processo de produção da cachaça consiste em obter o caldo de cana-de-açúcar, peneirá-lo, decantá-lo, diluí-lo até 14-16° Brix, abaixar o pH e aquecê-lo até 28-30° C, ou seja, preparar o mosto de caldo de cana. Em seguida, o mosto é adicionado na dorna de fermentação lentamente, onde se concentram as leveduras, capazes de realizar a fermentação alcoólica, e nutrientes necessários (pé-de-cuba). A fermentação é completa e tem a duração entre 24-48 h. Os produtos da fermentação seguem dois caminhos: sedimentação ou centrifugação. Em ambas as operações obtêm-se fermento (sedimentado e recuperado, respectivamente) que retorna para fermentação. A etapa seguinte é a destilação do vinho (mosto fermentado), que consiste em separar e selecionar os produtos de acordo com as temperaturas de ebulição ou de mudança de fases do componente (Sales, 2001). O vinho possui composição complexa, apresentando componentes sólidos (açúcares não fermentados,

sais minerais, substâncias nitrogenadas, pectinas, células de leveduras e bactérias, bagacilhos e argila), líquidos (água e etanol, representando 99% do total) e gasosos (principalmente dióxido de carbono). Com a destilação do vinho obtém-se o flegma (frações de cabeça, coração e cauda) e o vinhoto (Yokoya, 1995). Através da destilação, o vinho proveniente da fermentação alcoólica com 5 a 8% em volume de álcool etílico, deverá produzir 15 a 17% do volume do vinho destilado em aguardente, contendo de 38 a 54% de volume em etanol. O flegma (aguardente) é armazenado em tanques (aço carbono, aço inoxidável ou madeira) (Sales, 2001). A vinhaça ou vinhoto é utilizado como fertilizante, sendo aplicado na própria cana que lhe deu origem, em função da proximidade da cultura com a indústria e por possuir alto teor de potássio e nitrogênio inorgânicos (Evangelista, 2001). Os componentes da cachaça classificados como primários são respectivamente a água e o etanol e os secundários constituem um grupo de produtos minoritários oriundos do processo de fermentação e separados durante a destilação, principalmente os álcoois superiores, álcool metílico, ésteres, aldeídos, cobre, entre outros. Tais substâncias podem contribuir desde o aroma e sabor até os aspectos toxicologicamente nocivos dos destilados em geral (Schwan *et al.*, 2001, Aresta *et. al.*, 2001, Aquarone *et al.*, 1983, Valsechi, 1960).

A história da fermentação alcoólica ao redor do mundo é antiga e atingiu as sociedades de todos os níveis de complexidade. Cada sociedade descobriu como realizar a fermentação alcóolica em seu habitat (McGovern, 2003). O fenômeno universal da fermentação, inicialmente estava relacionado com os analgésicos, desinfetantes e elixir da vida (Vallee, 1998). Além disso, como efeito farmacológico, nutricional e sensorial, contribuindo para o desenvolvimento da cultura humana e tecnologia, na intensificação da agricultura, horticultura e para técnicas de processamento de alimentos (McGovern, 2003; Underhill, 2002). A fermentação

também participou e marcou os principais eventos da vida, tais como nascimento e morte, celebrações seculares ou cerimônias religiosas ao longo de todas as sociedades (Dietler, 2001). De acordo com documentos arqueológicos, históricos e etnográficos, um dos primeiros centros da civilização humana, que produziu, consumiu, celebrou e possuiu rituais a partir da fermentação alcoólica foi a China (Underhill, 2003; Huang, 2000; Zhang, 2004). Análises químicas de jarros a partir do período pré-histórico na China demonstram o uso da fermentação alcoólica (McGovern et al., 2004). A principal levedura utilizada nos modernos processos fermentativos é a *Saccharomyces cerevisiae* e seus resíduos de DNA ribossomal foram encontrados em jarros de vinho de 3150 A.C. no Egito, sugerindo, dessa forma, sua utilização espontânea na fabricação de pães e cervejas (Cavalieri et al., 2003).

No Brasil, a fermentação espontânea em dornas de fermentação abertas sempre foram as técnicas mais utilizadas na fabricação de cachaça, e é caracterizada por uma mistura de culturas com sucessões contínuas de espécies de leveduras. Existem alguns trabalhos de isolamento e utilização de *S. cerevisiae* na produção de cachaça, tentando caracterizar cepas com habilidades de se adaptar as condições de estresse durante a fermentação, tais como: alta concentração de sacarose, alto teor de etanol e temperatura, boa capacidade de floculação e alta fermentação (Vicente et al., 2006). Além disso, as cepas devem possuir alta capacidade de produção de compostos organolépticos, que participam intensamente do sabor e aroma do produto final, especialmente os ésteres e álcoois superiores (Vicente et al., 2006).

Os ésteres são formados a partir de ácidos orgânicos e álcoois durante a fermentação, e estes compostos secundários são fundamentalmente os responsáveis pelo típico “bouquet” dos destilados (Kaosowski & Czuprynski, 2006). Dentre os compostos organolépticos mais importantes do saquê, o acetato isoamílico é o que

mais contribui de forma cítrica, frutada e doce no aroma (Yoshikawa, 1999). Provavelmente, trata-se também de um dos principais ésteres responsáveis no aroma da cachaça, e é sintetizado a partir de álcool isoamílico e acetil-coenzima A pela ação da enzima álcool-acetiltransferase e hidrolisado por esterases (Yoshikawa, 1999; Mason & Dufour, 2000; Kaosowski & Czuprynski, 2006). O álcool isoamílico também pode ser produzido a partir da via de biossíntese de leucina, coordenada pela enzima  $\alpha$ -isopropil malato-sintase (Casalone et al., 1997). Neste caso, quando se aumenta a síntese de leucina, produz-se mais álcool isoamílico, fundamental na produção de ésteres na cachaça (Casalone et al., 1997). A mutação do gene LEU 4 provoca uma hiperprodução de álcool isoamílico (Oba et al., 2005). Outro importante composto aromático produzido pelas leveduras é o etil-caproato (Yoshikawa, 1999). Sua síntese e acúmulo na célula da levedura são dependentes da presença de precursores (etanol e ácido capróico), que controlam a enzima álcool acil-transferase e esterases (Verstrepen et al., 2003). A biossíntese de ácidos graxos é catalizada pela ácido-sintetase e é inibido pela cerulenina, que pode aumentar significativamente a produção de álcoois superiores, interessantes também no aroma dos destilados (Ichikawa et al., 1991).

Outros avanços têm sido obtidos na análise e interpretação de ésteres em vinho, brandy e uísque (Campo et al., 2006). As evidências sugerem que estes compostos são formados pela esterificação de álcool e ácidos formados por diferentes microorganismos. Os níveis destes compostos variam proporcionalmente com a idade do vinho e dos destilados, mas são particularmente altos em alguns vinhos, uísques e brandies que foram obtidos a partir de frutas com alto teor de açúcar (Campos et al., 2006). Estes dados podem sugerir que os altos índices de ésteres encontrados em



cachaças de qualidade, também são oriundos dos elevados teores de açúcares redutores (% Brix) da cana-de-açúcar.

Portanto, a estratégia de usar cepas que podem aumentar a produtividade e os teores de congêneres secundários importantes nos aromas da cachaça é fundamental para o desenvolvimento e padronização industrial deste produto (Vicente et al., 2006). Entretanto, o processo fermentativo espontâneo de 24-36 h da cachaça artesanal demonstra uma alta variabilidade genética de cepas de *S. cerevisiae*, dentre outros gêneros conforme demonstrado por Guerra et al. (2001).

Apesar da *S. cerevisiae* ser a levedura predominante, outras também participam efetivamente do processo fermentativo, principalmente após 24 h, tais como: *Rhodotorula glutinis* e *Candida maltosa* (Schwan et al., 2001). Outras espécies de leveduras também estão presentes durante o processo: *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia heimii* e *Hanseniaspora uvarum* estão presentes apenas no início, *Pichia subpelliculosa* e *Debaryomyces hansenii* foram detectados no meio para o fim da fermentação, e *Pichia methanolica* apenas no final da fermentação (Schwan et al., 2001). Normalmente, a sacarose é imediatamente hidrolisada em glicose e frutose, e em 12 h é concluída a sua fermentação. Entretanto, a frutose pode persistir até mais de 24 h na dorna de fermentação. Infecção bacteriana no mosto em fermentação pode ser um potencial problema, particularmente quando a taxa de leveduras e bactérias é de 10:1 ou menos. Algumas bactérias produtoras de ácido acético e enterobactérias também são detectadas no final do processo fermentativo (Schwan et al., 2001). Entretanto, muitos avanços ainda deverão ser feitos do ponto de vista bioquímico, microbiológico e fisiológico na produção de cachaça de qualidade.

A evolução da composição microbiológica durante a produção de vinho Vinsanto (Toscana – Itália) demonstra que baixas temperaturas durante a fermentação

umentam a concentração de leveduras diferentes da *Saccharomyces* spp. Quando as temperaturas de fermentação encontram-se entre 16-18° C, as populações de *Saccharomyces* dominam o processo. Temperaturas maiores favorecem as bactérias fermentativas conforme Domizio et al. (2006). Resultados indicam que a inoculação de cepas comerciais e altas temperaturas influenciam negativamente a evolução do vinho Vinsanto (Domizio et al., 2006). A presença quantitativa de diferentes espécies durante a fermentação e sua influência no “bouquet” final é determinada pelas condições de fermentação, inóculo inicial de *S. cerevisiae*, temperatura de fermentação, concentração de oxigênio e composição do suco de uva (Gao & Fleet, 1988; Heard & Fleet, 1988; Hansen et al., 2001; Erten, 2002).

As quantidades mensuradas de compostos secundários variam muito entre as diversas marcas comerciais de cachaça devido a condução da fermentação e destilação, ultrapassando, em alguns casos, os níveis permitidos pela legislação (MAPA, 2005). Torna-se, portanto, necessário o controle físico-químico do processo de fabricação da aguardente (Cerdan *et al.*, 2002, Aquarone *et al.*, 1983; Piggott *et al.* 1989). Além disso, não há um padrão legal definido entre os processos de destilação, ou seja, entre cachaça de coluna, ou destilada em coluna de retificação, e cachaça de alambique, destilada em alambique de cobre e/ou aço inoxidável, pois os compostos secundários (aldeídos, ésteres, outros) estão presentes em ambas, independentemente do processo de destilação.

Portanto, o manejo, controle e sistematização das operações unitárias da fermentação e destilação são fatores fundamentais no desenvolvimento de estratégias de melhoria físico-química, sensorial e rendimento industrial da cachaça comercial de qualidade. E os dados disponíveis são muitas vezes empíricos e/ou raros na literatura científica. Após todos os cuidados na fermentação e destilação, ainda estão presentes

compostos secundários ou congêneres, que muitos são os responsáveis pelos efeitos negativos (toxicológicos) da ingestão da bebida e de sabores desagradáveis. Em função dos altos teores de aldeídos, cobre, álcool metílico e outros congêneres presentes na fração inicial (cabeça) e final (cauda) da destilação em alambiques de cobre e/ou aço inoxidável, estas frações normalmente são descartadas por motivos toxicológicos. A remoção destes congêneres das frações cabeça e cauda poderiam adequar o destilado final para consumo de acordo com a legislação de bebidas brasileiras e o aproveitamento destas frações (cabeça e cauda), comumente descartadas, poderia aumentar o rendimento industrial em até 30%. Dessa forma, torna-se muito importante também o desenvolvimento de estratégias de recuperação destas frações inicialmente descartadas ou ainda a melhoria da cachaça de coração.

Portanto, foi desenvolvido um processo de remoção destes congêneres secundários baseado no uso da quitosana, que normalmente é preparada pela N-desacetilação da quitina. A obtenção de quitosana é feita através de diferentes combinações de tempo e temperatura, usando soluções concentradas de hidróxido de sódio e/ou potássio. A concentração alcalina, o tempo e a temperatura do processo devem ser rigorosamente controlados, porque isto influencia no grau de desacetilação do polímero, no seu peso molecular e na distribuição das unidades desacetiladas ao longo da cadeia de polissacarídeo. E estas propriedades refletem nas aplicações da quitosana, especialmente na indústria farmacêutica e de alimentos.

O potencial de uso biotecnológico da quitosana é imenso. Como fibra alimentar é discutida na literatura científica por vários autores (Furda, 1983; Ishikura, 1993; Furda & Brine, 1990). Além disso, serve como adsorvente e floculante (Wen et al., 2005); removedora de poluentes da aquicultura (Chung et al., 2005), removedora de níquel (Pradhan et al., 2003) e metais (Era & Gibb, 1999) em soluções aquosas. É

citada ainda como biofloculante de ácidos graxos de baixo peso molecular, podendo ser utilizada como estratégia de digestão alimentar (Fujita et al., 2001). Muitos artigos caracterizam a quitosana como polímero natural capaz de reduzir de forma moderada o colesterol (Win et al., 2003), reduzir o peso corporal, gorduras e pressão arterial e aumento da digestibilidade em animais (Han et al., 1999; Kondo et al., 1996; Razdan et al., 1997; Deuchi et al., 1994) e em humanos (Sciutto et al., 1995; Colombo et al., 1996; Giustina et al., 1995). Muitas outras aplicações e processos utilizando a quitosana na indústria de alimentos e farmacêutica são discutidos na segunda parte desta tese.

Embora a quitosana tenha sido bastante explorada em diversos processos biotecnológicos na literatura científica conforme acima, dados sobre seu potencial uso na remoção de substâncias indesejáveis em destilados, especialmente a cachaça, não têm sido discutidos. Dessa forma, nos propoemos a explorar a sua capacidade de remoção destes congêneres considerados tóxicos.

Neste trabalho, realizamos a avaliação de alguns parâmetros importantes na fermentação e destilação em alambique de cobre de três corpos para a produção de cachaça de qualidade durante safras seguidas e - no decorrer deste processo - exploramos o potencial da quitosana em remover substâncias indesejáveis da cachaça e outros destilados.

**Objetivos gerais:**

- Avaliar a influência de parâmetros operacionais para melhoria da qualidade da cachaça de alambique e desenvolver estratégia de remoção de congêneres secundários tóxicos em destilados.

**Objetivos específicos:**

- Optimizar parâmetros envolvidos nos processos de fermentação e destilação em alambique de cobre de três corpos durante safras seguidas (2005, 2006 e 2007), e correlacionar com a composição físico-química da cachaça, sob condições operacionais práticas.

- Desenvolver processo de remoção de congêneres secundários tóxicos de destilados (principalmente a cachaça) através da utilização do abrandador quitosana.

## **2. PARTE I**

**Optimização da temperatura do mosto e do tempo de alimentação das  
dornas de fermentação aumenta a produção de cachaça em  
alambique de três corpos.**

## **Resumo**

Na introdução, verificamos a importância do desenvolvimento de estratégias de manejo, controle e sistematização das operações unitárias da fermentação, destilação e tratamento pós-destilação para melhoria físico-química, sensorial e rendimento industrial da cachaça comercial de qualidade devido ao seu grande significado econômico e cultural. Dessa forma, esta tese foi desenvolvida em duas partes (I e II), que se complementam. A primeira parte trata-se de uma avaliação e otimização dos principais parâmetros físico-químicos envolvidos no processo de fermentação e destilação durante safras seguidas e sob condições operacionais práticas. Muitos resultados significativos foram obtidos destes experimentos ao longo das safras, e utilizados na elaboração do artigo científico abaixo. Outros resultados interessantes ainda necessitam reavaliação e não fazem parte do trabalho. Os resultados positivos e significativos foram submetidos a revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB) pela importância nacional da temática. Dessa forma, o manuscrito é resultado de uma cooperação científica entre a UnB e o Cenargen/Embrapa e descreve uma avaliação sistemática - durante três safras - dos parâmetros envolvidos na fermentação e destilação da cachaça e é dirigido aos produtores. Daí, a nossa opção em submeter à publicação em língua portuguesa e numa revista brasileira qualis A.

**Optimização da temperatura do mosto e do tempo de alimentação das dornas de fermentação aumenta a produtividade de cachaça destilada em alambiques.**

Brener Magnabosco Marra<sup>(1,2)</sup>, Djair dos Santos de Lima e Souza<sup>(1,2)</sup>, Gustavo Ramos de Oliveira<sup>(2)</sup>, Maria Fátima Grossi-de-Sá<sup>(2)</sup> e Cezar Martins-de-Sá<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília. 70910-900. Brasília – DF, Brasil. Emails: [brenermarra@hotmail.com](mailto:brenermarra@hotmail.com), [sasa@unb.br](mailto:sasa@unb.br),

<sup>(2)</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica – PqEB – Av. W5 Norte (final), Caixa Postal 02372. 70770-900. Brasília, DF – Brasil. [djairsouza@yahoo.com.br](mailto:djairsouza@yahoo.com.br), [guraol@yahoo.com.br](mailto:guraol@yahoo.com.br), [fatimasa@cenargen.embrapa.br](mailto:fatimasa@cenargen.embrapa.br),

**Correspondência:**

Cezar Martins de Sá

Fax: + 55-61 32754608

Tel: + 55-61 33072598

E-mail: [sasa@unb.br](mailto:sasa@unb.br)



**Optimização da temperatura do mosto e do tempo de alimentação das dornas de fermentação aumenta a produtividade de cachaça destilada em alambiques.**

**Resumo** – Cachaça é o destilado genuinamente brasileiro produzido a partir da destilação do caldo de cana-de-açúcar fermentado. Autoridades brasileiras têm se dedicado à melhoria do controle de qualidade desta bebida, entretanto, os dados disponíveis na literatura sobre a produção e qualidade ainda são escassos. No presente trabalho realizou-se uma avaliação sistemática dos parâmetros físico-químicos e produtivos relacionados com a fermentação e a destilação da cachaça ao longo de três safras seguidas (2005, 2006, 2007). Foi verificado – dentre os parâmetros significativamente positivos – que a otimização da temperatura do mosto e do tempo de alimentação das dornas de fermentação são cruciais para maior produtividade da cachaça destilada em alambiques de cobre de três corpos e para o incremento nos teores de ésteres totais do destilado.

**Termos para indexação:** Fermentação, Destilação, Temperatura, Ésteres, Cachaça.

**Optimisation of the sugar-cane wine temperature and time feeding of fermentation vessel increase the productivity of Cachaca in pot-stills distillery.**

**Abstract** – Cachaca is the denomination for a Brazilian spirit produced from the distillation of freshly fermented sugarcane juice by artisanal methods. Brazilian authorities have recently classified cachaça as a unique typical national product and a great effort has been dedicated to quality control improvement of the beverage. However, available data concerning the production and quality are still scarce. In the present study we have performed a long term systematic evaluation of the physico-chemical parameters implicated on the fermentation and distillation process as during three seasons (2005; 2006; 2007). We have shown that controlling the feeding time and the temperature of the fermentation vat, among others parameters, are crucial for higher productivity of cachaça distilled in pot-stills of three bodies and elevation of overall ester in the distilled.

**Index terms:** Fermentation, Distillation, Temperature, Esters, Cachaca

## Introdução

Cachaça é um destilado alcoólico simples do caldo de cana-de-açúcar obtido a partir do mosto fermentado e com graduação alcoólica de 38% a 48%, volume a 20°C. Segundo a Associação Brasileira de Bebidas (2005), a produção brasileira de cachaça é de aproximadamente 1,8 bilhões de litros/ano. A importância econômica do destilado, entretanto, vem crescendo em virtude da recente denominação de origem, que classificou por meio do Decreto nº 4062 do Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA), a cachaça como sendo um produto genuinamente brasileiro (MAPA, 2002). Por outro lado, a cadeia produtiva da cachaça vem desempenhando também importante papel na estruturação de milhares de pequenas propriedades rurais no Brasil e a bebida conta hoje com grande aceitação no mercado nacional e internacional. Tais fatos justificam, portanto, a caracterização dos parâmetros e variantes do processo produtivo, sobretudo nas fases de fermentação e destilação, e a sua influência na composição físico-química tanto inorgânica (metais e outros), quanto orgânica (componentes secundários) da cachaça (Aresta et al., 2001; Lima et al., 2006).

Os componentes da cachaça classificados como secundários, tais como alcoóis superiores, álcool metílico, ésteres, aldeídos e cobre constituem um grupo de produtos minoritários oriundos do processo de fermentação e separados durante a destilação. Estas substâncias podem contribuir não só na definição do aroma e sabor, mas na formação de aspectos toxicologicamente nocivos dos destilados em geral (Valsechi, 1960; Aquarone et al., 1983; Schwan et al., 2001; Lima et al., 2006)

Entre as diversas marcas comerciais de cachaça, as quantidades verificadas desses compostos variam muito devido à condução da fermentação e da destilação ultrapassando, em alguns casos, os níveis permitidos pelo Decreto nº 42.644 do

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2002). Tal variação, por conseguinte, faz surgir a necessidade de controle físico-químico do processo de fabricação da aguardente (Cerdán et al., 2002; Aquino et al., 2006; Piggot et al., 2007). Além disso, não há também um padrão definido entre os processos de fabricação, ou seja, entre cachaça de coluna ou destilada em coluna de retificação e cachaça de alambique destilada em alambique de cobre e/ou aço inoxidável, pois os compostos secundários estão presentes em ambas, independentemente do processo de destilação.

Em alambique, ainda são consideradas algumas peculiaridades no processo de destilação da aguardente de cana de qualidade. Segundo Yokoya (1995), os componentes voláteis do vinho (caldo de cana fermentado) possuem diferentes graus de volatilidade, sendo possível a separação fracionada por destilação. Assim, os componentes mais voláteis são recolhidos na primeira fração “cabeça” (aldeídos e álcool metílico) e os menos voláteis na “cauda” (compostos fenólicos e muitos ácidos orgânicos). Germek (1982) denomina cachaça de cabeça os 10% iniciais do processo de destilação e cachaça cauda os 10% finais. O restante é denominado cachaça de coração, prevalecendo nesta fração os menores teores dos congêneres secundários considerados tóxicos e as melhores qualidades organolépticas. Normalmente, as frações de cabeça e cauda são descartadas por apresentarem altos teores de aldeídos (furfural, hidroximetilfurfural etc), álcool metílico, cobre, alcoóis superiores (óleo fúsel) que são considerados tóxicos e reduzem substancialmente o rendimento industrial e o valor sensorial (Aresta et al., 2001; Lima et al., 2006).

Existem na literatura diversos trabalhos sugerindo teores alcoólicos para o fracionamento durante a destilação, porém são escassas as análises quanto ao rendimento, a produção e a qualidade final. Além disso, parâmetros qualitativos e quantitativos para destilação em alambique de cobre de três corpos ainda são raros e

empíricos (Ribeiro et al., 2005) e por conseguinte, a sistematização e controle dessas operações são fatores fundamentais no desenvolvimento de estratégias de melhoria físico-química e sensorial e no rendimento industrial da cachaça comercial de qualidade.

O presente trabalho teve como objetivo sistematizar os processos de fermentação e destilação em alambique de cobre de três corpos durante as safras 2005, 2006 e 2007 e correlacioná-lo com a composição físico-química da cachaça, em condições operacionais práticas conduzidas na maioria das unidades produtoras do País. Mostramos aqui que ao otimizar a temperatura e o tempo de alimentação das dornas de fermentação, obtivemos um aumento em produtividade da cachaça em torno de 44% e um incremento significativo dos teores de ésteres totais no destilado.

## **Material e Métodos**

### **Obtenção do mosto fermentado de cana-de-açúcar**

Os destilados foram obtidos no Alambique DoMinistro sob as seguintes condições: a variedade de cana-de-açúcar RB835486 foi cultivada organicamente durante 18 meses, o corte executado manualmente sem queima e a cana moída até seis horas após o corte. O inóculo inicial (pé-de-cuba) foi preparado anteriormente mediante o desenvolvimento de cepas de *Saccharomyces* spp. em concentração de 2-3 g/L em peso seco suplementado com malte de milho (3,0 g/L) e farelo de arroz (1,0 g/L) como fonte de vitaminas e de sais minerais; e com aeração entre 40 minutos e 1 hora antes de receber o mosto. O caldo de cana-de-açúcar era diluído com água potável até 16° Brix e aquecido ou não até 30°C. Os parâmetros avaliados no processo de fermentação foram: o volume de mosto, teor Brix inicial e final, pH inicial e final do mosto, temperatura do ambiente, do mosto no início e término da fermentação,

tempo de alimentação da dorna de fermentação e teor alcoólico final do mosto fermentado e tempo de fermentação. O processo foi conduzido em fermentadores de aço inoxidável com capacidade para 2.200 L, com controle de pH 3,0-5,0. O pé-de-cuba era lavado ou renovado quando o tempo de fermentação ultrapassava 36 horas. O teor alcoólico desses vinhos variou entre 9,5% e 6,5% v.v<sup>-1</sup>, com teor médio de 8, 0% v.v<sup>-1</sup>. O processo foi repetido 259 vezes, na safra 2005, 263 em 2006, e 160 em 2007. Obteve-se então um volume total 258.600 L de mosto fermentado em 2005, 322.508 L em 2006 e 220.633 L em 2007. As três quantidades foram submetidas à destilação entre os meses de abril e outubro de cada safra.

#### **Obtenção do destilado de cana-de-açúcar**

As destilações do mosto fermentado foram conduzidas em alambique de cobre de três corpos com deflegmador de carga intermitente, com capacidade para 1.200 L. O sistema de aquecimento era indireto, com vapor de água circulando no interior de serpentina submersa na carga de vinho. O abastecimento dos alambiques era feito por meio de canalização própria para condução do vinho da dorna volante para caixa de recalque ou aquecimento e desta para os alambiques, sob adequada assepsia das tubulações e dos equipamentos. A destilação foi conduzida com a temperatura variando entre 84-90°C na torre e 90-96°C na panela, sob o controle da saída do registro, até que o seu teor alcoólico no coletor acusasse o grau alcoólico desejado a 20°C, quando então era iniciado ou encerrado o fracionamento da destilação. Foram obtidas três frações na destilação: cachaça de cabeça (fração inicial do destilado – primeiros 10L), de coração (segunda fração – a partir da cabeça até teor alcoólico de 30°GL ou 20°GL em volume a 20°C na entrada do coletor), de cauda (destilado de 30°GL ou 20°GL até 3 °GL em volume a 20°C na entrada do coletor). Os parâmetros avaliados e controlados durante as destilações foram volume e porcentagem do mosto

fermentado e destilado, volume de cabeça, coração e cauda, grau alcoólico médio da cabeça, coração e cauda, volume total de cachaça por batelada, velocidade de destilação (L/h), média de produção por batelada, tempo de destilação e temperatura de panela e torre do destilador durante as safras 2005, 2006 e 2007.

### **Análises físico-químicas**

Para cada lote de cachaça de coração obtido, foram retiradas seis amostras de 700 ml em diferentes garrafas de vidro esterilizadas, lacradas com tampas metálicas novas e enviadas para laboratório credenciado pelo MAPA. As análises físico-químicas das aguardentes obtidas foram realizadas de acordo com os procedimentos laboratoriais determinados pelo Decreto Federal nº 2314, que regulamenta a Lei nº 8918, de 14 de julho de 1994, sobre os padrões físico-químicos admitidos para a bebida (MAPA, 2000) e que acompanham a Association of Official Analytical Chemists (1995). Os parâmetros analisados foram: teor alcoólico real, aldeídos totais, furfural, hidroximetilfurfural, ésteres totais, cobre, álcool metílico, alcoóis superiores, acidez total, fixa e volátil e extrato seco. Os resultados das análises físico-químicas foram também submetidos à análise estatística e correlacionados com os dados do controle da fermentação e destilação.

### **Análises Estatísticas**

Neste trabalho, todas as variáveis e medidas foram submetidas à análise de regressão linear simples e suas análises de resíduos. Também foi investigada a presença ou não de diferenças significativas entre valores dentro das variáveis, a fim de obter seu ponto ideal e estabelecer os padrões que refletem maior rendimento da fração de interesse (coração), dentro do fracionamento na destilação. A análise estatística foi feita por meio de ANOVA e posteriormente o Teste de Médias Tukey, utilizando-se o software SAS (SAS, 2006).

## Resultados e Discussão

Com o objetivo de otimizar o processo produtivo, inicialmente fixamos – ao longo das três safras – os parâmetros temperatura da torre (84-90°C) e da panela (90-96°C) assim como o teor de Brix a 16%. A temperatura inicial do caldo variou entre 15-20°C, do ambiente durante a fermentação variou entre 20-25°C, a temperatura do mosto em fermentação variou entre 24-41 °C e a do mosto ao final da fermentação entre 25-32°C. Estas variações de temperatura influenciam a dinâmica populacional da microbiota durante safras distintas (Guerra et.al.; 2001). Percebeu-se também que, com velocidades médias de destilação entre 0,7-1,0 L/min, obteve-se a melhor relação de volume de coração para as demais frações. Esses parâmetros foram correlacionados com a produção e as características físico-químicas da cachaça e não apresentaram diferenças significativas (dados não mostrados). Essas análises, assim como dados adicionais e não discutidos neste trabalho podem ainda ser vistos no portal: <http://www.cachacadoministro.com.br>. A figura 1 mostra a média mensal – expressa em volume em litros por batelada – de cachaça (cabeça, cauda e coração) produzida ao longo das três safras (2005, 2006 e 2007). Duas conclusões podem ser obtidas a partir destes resultados. Primeiramente, observa-se que a média do volume da fração coração e a produção aumentaram ao longo dos meses nas três safras. Esta observação também pode ser correlacionada com o ponto máximo de maturação do cultivar de cana-de-açúcar aqui utilizada. O teor de Brix médio da variedade obtido durante a safra foi de 22,1 °Brix em 2005 e 22,8 °Brix em 2006 e 23,0 °Brix em 2007. Os maiores teores, contudo, foram obtidos entre os meses de setembro e outubro. Portanto, a utilização de cultivares de cana-de-açúcar com diferentes pontos de maturação (precoce, média e tardia) manteria a produção mais homogênea na safra, aumentando o rendimento industrial, conforme já demonstrado por diversos autores (Cardoso et. al., 2003;



Bizelli et. al., 2000; Boza & Horii,1998). A segunda observação refere-se à produtividade (litros/batelada) da fração coração durante as três safras. Ao compará-las, nota-se um aumento significativo da produtividade, mesmo nos primeiros meses onde a maturação do cultivar ainda não estava completa (compare 2007 com 2006 e 2005). Estes resultados se devem à sistematização e à otimização dos parâmetros descritos abaixo.

### **Aumento da temperatura do mosto e do tempo de alimentação das dornas aumenta a produtividade da fração coração e os teores de ésteres da cachaça**

A fermentação nas dornas inicia-se pela adição de caldo de cana fresco sobre o pé de cuba. O processo é microbiologicamente complexo e influencia consideravelmente a produção e a qualidade da cachaça. (Schwan et al., 2001). Aqui, avaliamos o efeito do tempo de alimentação das dornas de fermentação sobre a produção da fração coração. A figura 2 mostra a análise de regressão linear entre o volume da fração coração produzida ao longo da safra de 2005, 2006 e 2007 em função do tempo de alimentação das dornas. Uma correlação significativa e positiva pode ser vista sobre a produção desta fração, ou seja, ao longo do intervalo de 1 a 4 horas verificou-se um incremento de até 42 % do volume de coração. É possível que esta tendência continue com tempos maiores de alimentação, porém, não foram avaliados para evitar eventual contaminação da fermentação. É conhecido que altas concentrações de sacarose e de etanol têm efeito inibitório no crescimento e na atividade metabólica de leveduras (Torija et al., 2003). Provavelmente, o tempo de alimentação da dorna está envolvido diretamente com a quantidade de sacarose oferecida à microbiota, não influenciando o estresse osmótico pela sobrecarga de açúcares redutores, ou seja, à medida que a dorna recebe lentamente a sacarose, a diversidade (Guerra et al., 2001) e a dinâmica de sucessão (Schwan et al., 2001) das

populações de microorganismos durante o processo, se adaptam, se multiplicam e realizam a fermentação com maior eficiência, sem haver uma sobrecarga de sacarose e etanol na dorna e conseqüentemente, inibição do processo fermentativo, ou seja, favorecendo a cinética de formação do etanol.

Em outro experimento, avaliamos o efeito da temperatura do mosto sobre o rendimento da fração coração (figura 3). A regressão linear entre o volume de cachaça de coração versus temperatura inicial do mosto apresentou um ligeiro – porém significativo – aumento do volume da fração coração. Este conjunto de resultados explicita a importância de ajustar o tempo de alimentação da dorna e temperatura do mosto para obter o máximo rendimento em volume de coração.

A fim de verificar se esses parâmetros afetam a composição físico-química da cachaça, para cada batelada produzida foi realizada uma análise físico-química em triplicata. Os valores médios de cada parâmetro mostrado na tabela 1 foram comparados pelo Teste de Médias Tukey. O desvio padrão para os diferentes parâmetros médios analisados variou entre 0,02-50%, demonstrando variação físico-química da cachaça de coração produzida ao longo das safras 2005, 2006 e 2007.

A partir da safra de 2006, as dornas de fermentação passaram a ser alimentadas com 40% do caldo de cana-de-açúcar diluído (temperatura entre 15 -20 °C) e os 60% restantes, com temperatura de aproximadamente 30 °C. Nota-se na tabela 1, que tal prática aumentou os teores de ésteres totais significativamente no destilado final e os resultados assemelham-se aos obtidos com trabalhos realizados com vinho e uísque, em especial o acetato de etila (Domizio et al., 2007; Campo et al., 2006; Eksteen et al., 2003), mostrando ser um procedimento muito aconselhável, uma vez que é desejável o aumento dos teores de ésteres, devido aos aromas e sabores associados a este composto.

Como as análises físico-químicas dos lotes de 2006 mantinham-se dentro dos padrões estabelecidos por lei – apesar do aumento significativo de ésteres totais – o fracionamento da cachaça de coração em 2007 foi estendido a 20 °GL a 20 °C. Houve também aumento de até 21,31% na produção de coração e até 35% dos alcoóis superiores, sem ultrapassar os níveis tolerados na legislação vigente (tabela 1). Os índices de cobre, acidez total e fixa, aldeídos, furfural e extrato seco não apresentaram diferenças significativas ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey. Para verificar se o tempo de alimentação das dornas pode estar também afetando o incremento nos teores de ésteres totais visto na tabela 1, correlacionamos – durante as três safras – as medidas destes compostos com o tempo de alimentação das dornas (figura 4). Como pode ser visto nesta figura, períodos mais longos de alimentação das dornas contribuem para o aumento na concentração de ésteres. Nota-se também nesta figura, um incremento significativo nos teores de ésteres produzidos nas safras de 2006 e 2007 comparados à safra de 2005. Como já descrito acima, a partir da safra de 2006 perenizamos a prática de aquecer os 60% do caldo a 30°C. Estes resultados sugerem um sinergismo entre velocidade de alimentação das dornas e temperatura do mosto, contribuindo com a concentração de ésteres totais na cachaça. Efeito da temperatura sobre a produção de compostos voláteis durante a fermentação do mosto de uva para produção do vinho tem sido documentado na literatura (Torija et al., 2003; Molina et al., 2007). Neste trabalho, estendemos essas observações para a produção da cachaça. Provavelmente, o estresse térmico provocado, ao iniciar a fermentação com 40% do caldo entre 15-20 °C e adição dos 60% a 30°C afeta a composição lipídica conforme em uísque e vinho e a fluidez da membrana plasmática da levedura (Torija et al., 2003) e a dinâmica da microbiota (Schwan et al., 2001), favorecendo o incremento de ésteres totais na cachaça.

Finalmente, a tabela 2 mostra a sistematização de todo processo produtivo ao longo das três safras. Se considerarmos o número de bateladas como sendo a quantidade de trabalho total necessária para a produção da cachaça por safra, entre 2006 e 2007, verificamos um decréscimo na produção de mosto fermentado e na quantidade de bateladas destiladas, entretanto, a produtividade da fração coração por batelada aumentou até 44% devido a esta otimização.

### **Conclusões**

O objetivo de nossa proposta foi otimizar o processo de fermentação e destilação em alambique de cobre de três corpos ao longo de três safras e correlacioná-los com a composição físico-química da cachaça, sob condições operacionais práticas. Sugerimos que os resultados aqui adquiridos podem ser aplicados diretamente nessas unidades produtoras sem nenhuma necessidade de fazer um escalonamento. São eles: - a temperatura e o tempo de alimentação das dornas de fermentação podem influenciar até 42% do volume de produção da fração coração; o fracionamento da cachaça de coração estendido até 20°GL a 20°C aumenta significativamente a produção de coração e de até 35% dos álcoois superiores sem ultrapassar os níveis tolerados na legislação vigente (tabela 1). Além disso, as dornas de fermentação alimentadas com 40% do caldo de cana-de-açúcar diluído a temperatura ambiente e os 60% restantes com temperatura de aproximadamente 30 °C aumentam os teores de ésteres totais em até 120% no destilado final. Não obstante ao incremento na produtividade da cachaça aqui apresentado, os parâmetros microbiológicos da fermentação e as alterações bioquímicas da levedura nas atuais condições de fermentação ainda restam a ser estabelecidos.

### **Agradecimentos**

Ao Sr. Carlos Átila Álvares da Silva, por colocar a nossa disposição o Alambique Do Ministro, de sua propriedade em Alexânia-GO; ao Sr. José Ribeiro pela assistência técnica e ao Dr. Eduardo Leonardex, pela pronta assistência nas análises estatísticas. Ao CNPq pelo fornecimento de bolsa de doutorado a Brenner M. Marra e Djair S.L. Souza.

**Tabela 1.** Média das variáveis físico-químicas, para cachaças de coração obtidas nas safras 2005, 2006 e 2007.

<i>Físico-química</i>	<i>Safra 2005</i>	<i>Safra 2006</i>	<i>Safra 2007</i>	<i>Padrão</i>	<i>Desvio Padrão (%)</i>
<b>Acidez fixa</b>	0,0216	0,065	0,059	g/100mL <sup>1</sup>	0,03
<b>Acidez total</b>	0,0312	0,074	0,063	g/100mL <sup>1</sup>	0,02
<b>Acidez volátil</b>	18,04	22,04	20,5	Até 150 mg/100 mL	2,1
<b>Álcool metílico</b>	0,08 <sup>2</sup>	0,01	0,03	Até 0,25 mg/100 mL	0,04
<b>Álcool superior</b>	210	300	290	Até 440 mg/100 mL	9,3
<b>Aldeídos totais</b>	16,9	15,9	13,5	Até 30 mg/100 mL	1,75
<b>Cobre</b>	0,13	0,2	0,3	Até 5 mg/100 mL	0,1
<b>Ésteres</b>	45	65	125	Até 200 mg/100 mL	41,6
<b>Extrato seco total</b>	0,8	1,23	1,5	g/L <sup>1</sup>	0,35
<b>Furfural</b>	0,8	1,02	0,9	Até 5 mg/100 mL	0,12
<b>Grau alcoólico real</b>	54 <sup>3</sup>	55 <sup>3</sup>	52 <sup>3</sup>	38° - 48° GL	1,52

<sup>(1)</sup> não existe padrão definido pelo Decreto Federal nº 2314, de 4 de setembro de 1997, que regulamenta a Lei nº 8918, de 14 de julho de 1994.

<sup>(2)</sup> Apenas uma amostra apresentou álcool metílico.

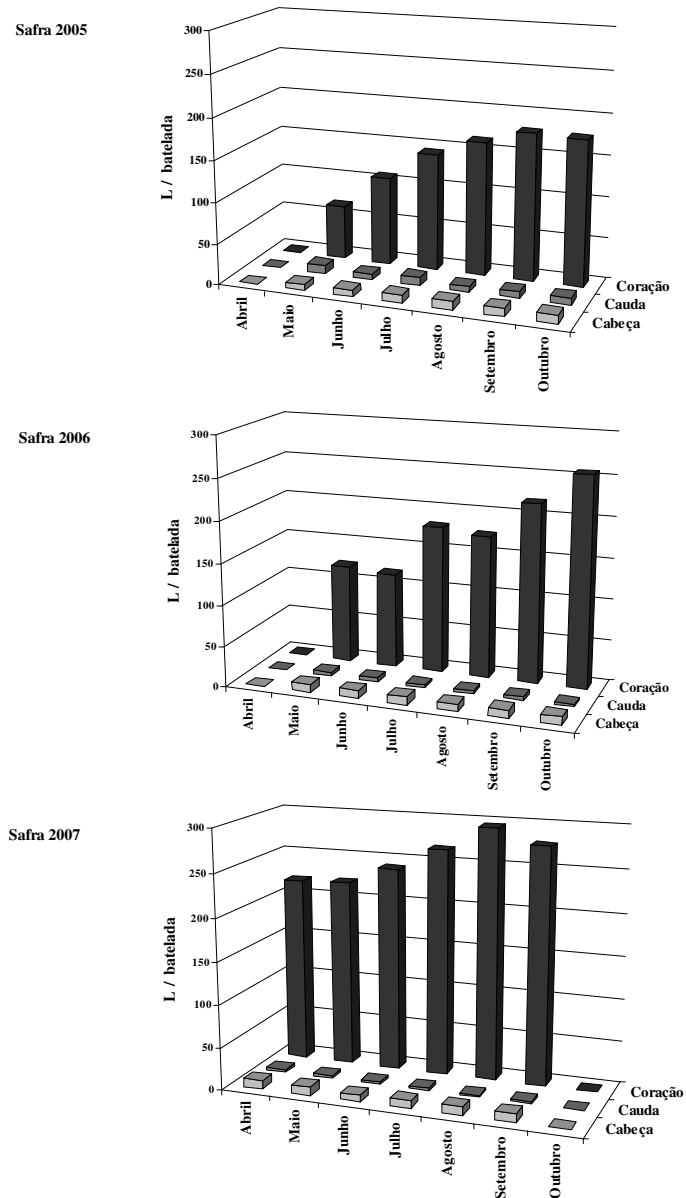
<sup>(3)</sup> O teor alcoólico apresentou-se acima do padrão legal, entretanto, após o envelhecimento estes teores são corrigidos para o padrão legal.

**Tabela 2.** Produção média de mosto fermentado, destilado total, fração coração, número de bateladas e relação fração coração / bateladas obtidas nas safras 2005, 2006 e 2007.

<i>Safra</i>	<i>Batelada</i> <i>(repetições)</i>	<i>Mosto</i> <i>Fermentado</i> <i>( L )</i>	<i>Fração</i> <i>coração</i> <i>(L)</i>	<i>Fração</i> <i>coração</i> <i>(L) /</i> <i>batelada</i>	<i>% fração</i> <i>coração /</i> <i>batelada</i> <i>em</i> <i>relação à</i> <i>safra de</i> <i>2005</i>
<b>2005</b>	<b>259</b>	<b>258.600</b>	<b>37.169</b>	<b>143,5</b>	<b>-</b>
			<b>(14,3%)<sup>1</sup></b>		
<b>2006</b>	<b>263</b>	<b>322.508</b>	<b>47.233</b>	<b>179,6</b>	<b>+ 20 %</b>
			<b>(14,6%)<sup>1</sup></b>		
<b>2007</b>	<b>160</b>	<b>220.633</b>	<b>41.656</b>	<b>258,5</b>	<b>+ 44 %</b>
			<b>(18,9%)<sup>1</sup></b>		

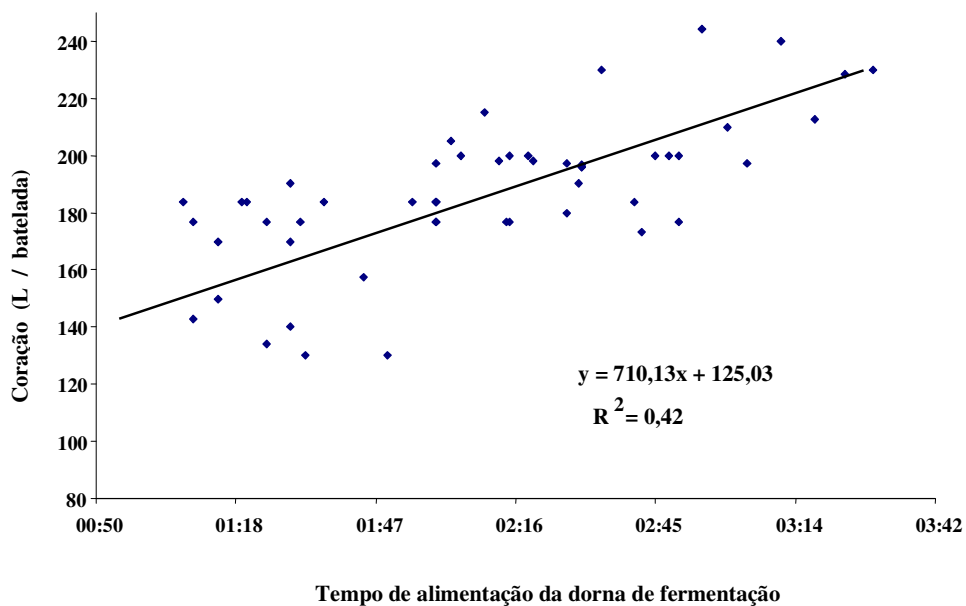
(1) % da fração coração obtida do total de mosto fermentado.

## Figuras

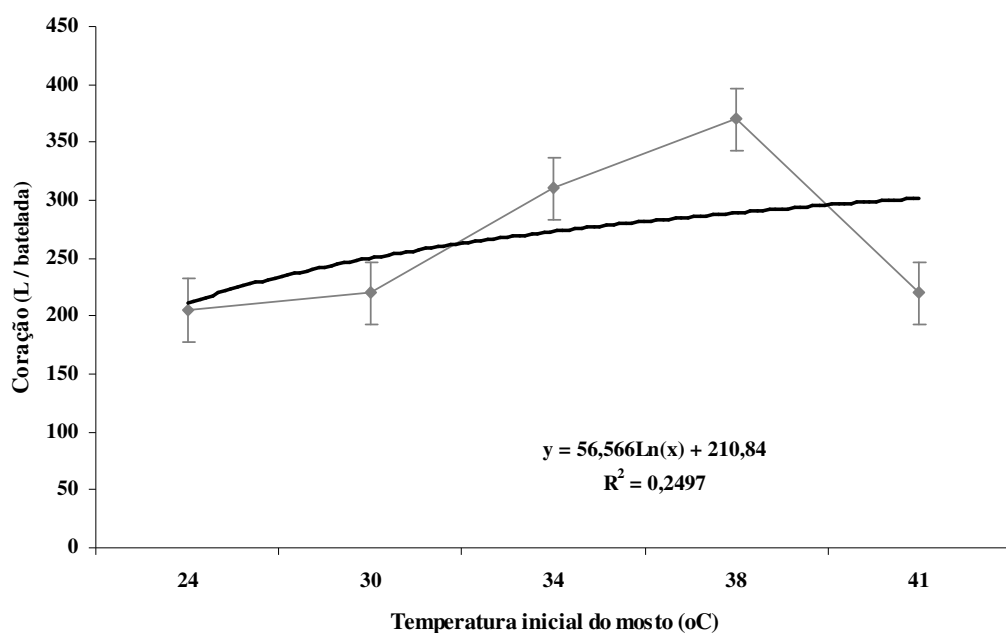


**Figura 1.** Produção das frações de cabeça, cauda e coração durante as safras estudadas. A fermentação e destilação foram conduzidas como descrito em Material e Métodos. Os números em ordenadas representam as médias mensais (litros /bateladas). (A) safra de 2005, (B) 2006 e (C) 2007.

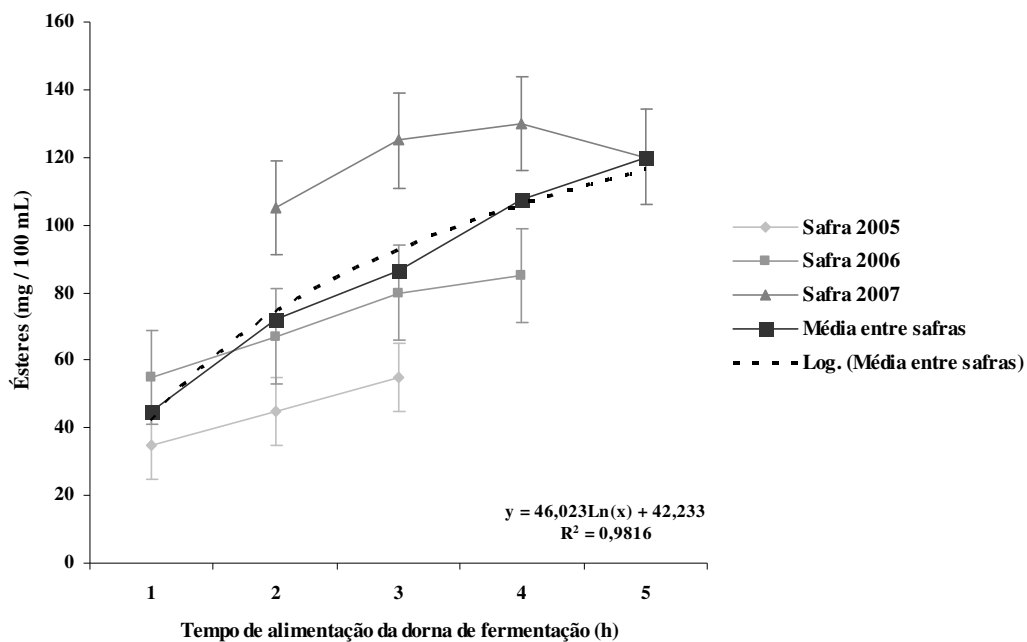




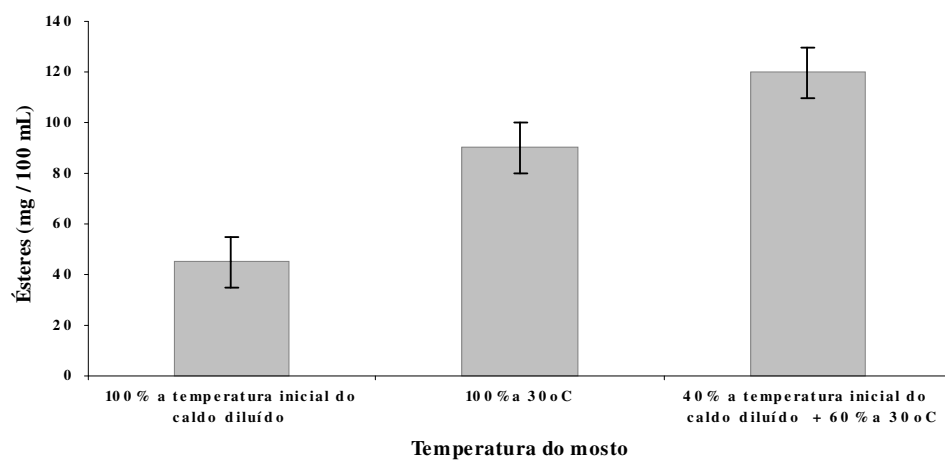
**Figura 2.** O tempo de alimentação das dornas de fermentação influencia a produção da fração coração. Análise de regressão linear simples entre o volume de coração produzido por tempo de alimentação da dorna de fermentação, com sua equação da reta e  $R^2$ , durante as safras de 2005, 2006 e 2007. Cada ponto da curva representa a média de bateladas destiladas em um determinado tempo de alimentação da dorna durante fermentação, ao longo das três safras.



**Figura 3.** Elevação da temperatura inicial do mosto aumenta a produção da fração coração. Análise de regressão linear simples entre o volume de coração produzido em função da temperatura inicial de fermentação do mosto, medido ao longo das três safras. A fermentação e destilação foram conduzidas de acordo com o descrito em Material e Métodos. Os pontos representam as médias (litros/ bateladas) sob as respectivas temperaturas de fermentação.



**Figura 4.** O tempo de alimentação das dornas de fermentação influencia a produção de ésteres totais da fração coração. Análise de regressão linear simples entre a quantidade de ésteres produzida em função do tempo de alimentação da dorna de fermentação, com sua equação da reta e  $R^2$ , para as safras de 2005, 2006 e 2007. Cada ponto da curva representa a média de bateladas destiladas em um determinado tempo de alimentação da dorna durante fermentação, para cada safra.



**Figura 5.** Efeito da temperatura inicial do mosto adicionado nas dornas de fermentação sobre a produção de ésteres totais nas três safras. A fermentação e destilação foram conduzidas de acordo com o descrito em Material e Métodos. A concentração de ésteres totais foi determinada conforme a tabela 1 e representa aqui como a média de bateladas para cada temperatura de alimentação da dorna.

## Referências

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BEBIDAS (ABRABE). **Avaliação do mercado brasileiro de bebidas (2005)**. Disponível em: < <http://www.abrabe.org.br/> >. Acesso em 14 mai. 2008.
- AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**, Blucher, 227: São Paulo, 1983. p.156-193.
- AQUINO, F.W.B.; NASCIMENTO, R.F.; RODRIGUES, S.; CASEMIRO, A.R.S. Determination of aging marks in sugar cane spirits. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p.145, 2006.
- ARESTA, M.; BOSCOLO, M.; FRANCO, D.W. Copper (ii) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.49, p.2819, 2001.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS; **Official Methods of Analysis**, Arlington: AOAC, 1995. p.253-379.
- BIZELLI, L.C.; RIBEIRO, C.A.F.; NOVAES, F.V. Dupla destilação da aguardente de cana: teores de acidez total e de cobre. **Scientia Química**, v.57, p.623, 2000.
- BOZA, Y.; HORII, J. Influência da destilação sobre a composição e a qualidade sensorial da aguardente de cana-de-açúcar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, p.391, 1998.
- CAMPO, E.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Solid phase extraction, multidimensional gas chromatography mass spectrometry determination of four novel aroma powerful ethyl esters assessment of their occurrence and importance in wine and other alcoholic beverages. **Journal Chromatography**, v.1140, p.180, 2006.
- CARDOSO, D.R.; NETO, B. DOS S.L.; FRANCO, D.W.; NASCIMENTO, R.F. Influence of the pot still material on the chemical composition of brazilian sugar cane spirit. **Química Nova**, v.26, p.165, 2003.
- CERDÁN, T.G.; MOZAZ, S.R.; AZPILICUETA, C.A. Volatile composition of aged wine in used barrels of *químico* oak and of *química* oak. **Food Research International**, v.35, p.603, 2002.
- DOMIZIO, P.; LENCIONI, L.; CIANI, M.; DI BLASI, S.; PONTREMOLESI, C.; SABATELLI, M.P. Spontaneous and inoculated yeast populations dynamics and their effect on organoleptic characters of vinsanto wine under different process conditions. **International Journal Food Microbiology**, v.20, p.281, 2007.
- EKSTEEN, J.M.; VAN RENSBURG, P.; CORDERO OTERO, R.R.; PRETORIUS, I. S. Starch fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing the alpha-amylase and glucoamylase genes from *Lipomyces kononenkoae* and *Saccharomycopsis fibuligera*. **Biotechnology Bioenergy**, v.84, p.639, 2003.
- GERMEK, H.A.; **Processo de Destilação**, *Química*, 61: Piracicaba, 1982. p.23-25.
- GUERRA, J.B.; ARAÚJO, R.A.C.; PATARO, C.; FRANCO, G.R.; MOREIRA, E.S.A. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 106, 2001.
- LIMA, A. DE J.B.; CARDOSO, M. DAS G.; GUERREIRO, M.C.; PIMENTEL, F.A. Using activated carbon to remove copper from sugar cane spirit. **Química Nova**, v.29, p.247, 2006.

MAPA- Decreto Nº 2314, de 04 de setembro de 1997. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**, 19/06/00.

MAPA- Decreto Nº 4.062, de 21 de dezembro de 2001. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**, 03/01/02.

MAPA- Decreto Nº 42.644, de 05 de junho de 2002. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**, 20/06/02.

MOLINA, A.M.; SWIEGERS, J.H.; VARELA, C. Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. **Applied Microbial and Cell Physiology**, v. 77, p. 675, 2007.

PIGGOTT, J. R.; HUNTER, E. A.; MARGOMENOU, L. Comparison of methods of analysis of time-intensity data: application to scotch malt whisky. **Food Chemistry**, v.1, p.319, 2007.

RIBEIRO, C.A.F.; NOVAES, F.V.; BIZELLI, L.C. Dupla destilação da aguardente de cana: teores de acidez total e de cobre. **Scientia Agricola**, v.7, p.623, 2005.

SAS – 2006, **Statistics and statistical graphics software**. Princeton University, USA, 2006.

SCHWAN, R.F.; MENDONÇA, A.T.; DA SILVA JUNIOR, J.J.; RODRIGUES, V.E.; WHEALS, A.E. Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.79, p.89, 2001.

TORIJA, M.J.; BELTRAN, G.; NOVO, M.; POBLET, M., GUILLAMÓN, J.M.; MAS, A.; ROZÈS, N. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. **International Journal of Food Microbiology**, v 85, p. 127, 2003.

VALSECHI, O. **Aguardente de Cana de Açúcar**, Agronômica Ceres, 116: São Paulo, 1960. p.69-78.

YOKOYA, F. **Fabricação de Aguardente de Cana-de-Açúcar**, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Toselts, 92: Campinas, 1995. p.153-162.

### **3. PARTE II**

**PROCESSO DE USO DO ABRANDADOR QUITOSANA, COMO  
REMOVEDOR DE CONGÊNERES SECUNDÁRIOS  
INDESEJÁVEIS DE DESTILADOS, PRINCIPALMENTE DA  
AGUARDENTE DE CANA OU CACHAÇA<sup>®</sup>**

## Resumo

Na primeira parte foi discutida a importância do desenvolvimento de estratégias de manejo, controle e otimização das operações unitárias da fermentação, destilação para melhoria físico-química e rendimento industrial da cachaça comercial de qualidade. Nesta segunda parte é apresentada uma tecnologia de tratamento da cachaça recém destilada ou envelhecida com quitosana na forma de patente requerida e publicada na revista do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (PI0601586-7, Revista nº 1924, 2007) e o seu respectivo artigo científico submetido ao *Journal Agriculture and Food Chemistry*. A motivação pelo uso da quitosana deve-se às suas propriedades físico-químicas, conforme relatadas no decorrer da patente e artigo científico, e verifica-se o potencial da quitosana em remover compostos secundários ou congêneres presentes, que muitas vezes são os responsáveis pelos efeitos negativos (toxicológicos) da ingestão da bebida e de sabores desagradáveis. Além disso, o tratamento das frações cabeça e cauda com quitosana diminui significativamente os teores de aldeídos, furfural, hidroximetilfurfural, cobre, etc; destas frações. Os baixos teores destes congêneres nestas frações geralmente descartadas, permitem à sua adequação a legislação (MAPA, 2002), representando um aumento significativo no rendimento industrial conforme descritos nesta segunda parte da tese. Apesar de a quitosana remover estes congêneres secundários citados acima, permanece sensorialmente na cachaça. Portanto, é necessário e possível remover estas características sensoriais da quitosana na cachaça utilizando carvão ativado. Dessa forma, a implementação desta tecnologia nas destilarias dependem de um filtro com refil trocável de quitosana e carvão ativado. E a redução significativa dos congêneres secundários para abaixo da metade dos teores conforme determinados por lei (MAPA, 2002), permite a adequação de bebidas alcoólicas como *LIGHT*. Os produtos *Light*



representam uma tendência na indústria de bebidas de maneira geral, e a cachaça *Light* pode representar vantagens comerciais bastante satisfatórias.



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) **PI 0601586-7 A**

(22) Data de Depósito: 13/04/2006  
(43) Data de Publicação: **04/12/2007**  
(RPI 1926)



**(51) Int. Cl.:**  
**C12G 3/00 (2007.10)**  
**C12H 1/02 (2007.10)**

**(54) Título: PROCESSO DE USO DO ABRANDADOR QUITOSANA, COMO REMOVEDOR DE CONGÊNERES SECUNDÁRIOS TÓXICOS DE DESTILADOS, PRINCIPALMENTE DA AGUARDENTE DE CANA OU CACHAÇA**

(71) Depositante(s): Carlos Átila Álvares da Silva (BR/DF)

(72) Inventor(es): Brenner Magnabosco Marra, Maria Fátima Grossi de Sá, Djair dos Santos de Lima e Souza, Marconi Floripe Ginani

(57) Resumo: PROCESSO DE USO DO ABRANDADOR QUITOSANA, COMO REMOVEDOR DE CONGÊNERES SECUNDÁRIOS TÓXICOS DE DESTILADOS, PRINCIPALMENTE DA AGUARDENTE DE CANA OU CACHAÇA. A presente patente de invenção refere-se a um processo de purificação de bebidas destiladas pela utilização de quitosana para remoção de compostos secundários ou congêneres presentes, que são os responsáveis pelos efeitos negativos (toxicológicos) da ingestão da bebida e de sabores desagradáveis. Mais precisamente, a presente invenção visa a um novo processo para obtenção de cachaça de qualidade, a qual consiste em utilizar a substância quitosana para remover certos elementos indesejáveis da aguardente de cana-cachaça, como remoção de diversos aldeídos presentes na cachaça, como acetaldeído, formaldeído, n-butiraldeído, benzaldeído, valeraldeído, furfural e hidroximetilfurfural e de ésteres, como acetato de etila, carbamato de etila, caprilato de etila e outros.

## **Resumo**

**“Processo de uso do abrandador quitosana, como removedor de congêneres secundários tóxicos de destilados, principalmente da aguardente de cana ou cachaça”.**

A presente patente de invenção refere-se a um processo de purificação de bebidas destiladas pela utilização de quitosana para remoção de compostos secundários ou congêneres presentes, que são os responsáveis pelos efeitos negativos (toxicológicos) da ingestão da bebida e de sabores desagradáveis.

Mais precisamente, a presente invenção visa a um novo processo para obtenção de cachaça de qualidade, a qual consiste em utilizar a substância quitosana para remover certos elementos indesejáveis da aguardente de cana-cachaça, como remoção de diversos aldeídos presentes na cachaça, como acetaldeído, formaldeído, n-butiraldeído, benzaldeído, valeraldeído, furfural e hidroximetilfurfural e de ésteres, como acetato de etila, carbamato de etila, caprilato de etila e outros.

## Reivindicações da patente requerida

**“Processo de uso do abrandador quitosana, como removedor de congêneres secundários tóxicos de destilados, principalmente da aguardente de cana ou cachaça”.**

caracterizado pelo fato de:

- submeter os mesmos a um processo de tratamento com quitosana, no estado de pó ou granulado, na proporção variando de 5 a 15g de quitosana, por litro de cachaça;

- manter a reação sob agitação, por um período de aproximadamente 8-12 horas, em temperatura ambiente; mantendo-se um controle de pH de 5-6;

- posteriormente, submeter a suspensão/solução a uma filtração.

2. **“PROCESSO”**, de acordo com as reivindicações 1, caracterizado pelo fato de que o destilado, preferencialmente a ser tratado é a cachaça.

3. **“PROCESSO”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser aplicado em amostras de cachaça completa (cabeça+coração+cauda), cabeça, cauda, coração e envelhecida por 2-4 anos.

4. **“PROCESSO”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser aplicada em amostras de fração comercial (o coração) e a cachaça sem separação (completa: cabeça +coração+ cauda).

5. **“PROCESSO”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser aplicada, preferencialmente, na proporção de 5 a 15 gramas de quitosana, por litro de cachaça.

6. “**PROCESSO**”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser utilizado, preferencialmente, filtro de celulose ou carvão ativo.
7. “**PROCESSO**”, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de ser utilizado, preferencialmente, filtro de celulose ou carvão ativo, granulometrias variando de 0,5-5  $\mu$ microns.
8. “**PROCESSO**”, de acordo com qualquer das reivindicações 6 ou 7, caracterizado pelo fato de ser utilizado, preferencialmente, filtro de celulose, com granulometrias variando de 0,5-5  $\mu$ microns.
9. “**PROCESSO**”, de acordo com qualquer das reivindicações 6 ou 7, caracterizado pelo fato de ser utilizado, preferencialmente, filtro de carvão ativo, com granulometrias variando de 0,5-5  $\mu$ microns.

## **Relatório final da patente requerida**

**“Processo de uso do abrandador quitosana, como removedor de congêneres secundários tóxicos de destilados, principalmente da aguardente de cana ou cachaça”.**

A presente patente de invenção refere-se a um processo de purificação de bebidas destiladas pela utilização de quitosana para remoção de compostos secundários ou congêneres presentes, que são os responsáveis pelos efeitos negativos (toxicológicos) da ingestão da bebida e de sabores desagradáveis.

Mais precisamente, a presente invenção visa a um novo processo para obtenção de aguardente de cana ou cachaça de qualidade, a qual consiste em utilizar a substância quitosana para remover certos elementos indesejáveis da cachaça.

É também um outro objetivo da invenção o aproveitamento das frações cabeça e cauda, anteriormente descartadas, aumentando o rendimento industrial de produção da aguardente de cana - cachaça em até 40%.

Objetivamente, a presente patente de invenção trata de um processo de utilização de quitosana com abrandador de bebidas, pela remoção de diversos aldeídos presentes na cachaça, como acetaldeído, formaldeído, n-butiraldeído, benzaldeído, valeraldeído, furfural e hidroximetilfurfural e de ésteres, como acetato de etila, carbamato de etila, caprilato de etila e outros.

Os componentes da aguardente de cana ou cachaça, classificados como secundários, constituem-se em um grupo de produtos minoritários, oriundos do processo de fermentação do mosto, tais como álcoois e outros hidrocarbonetos carbonilados superiores, isto é, com três ou mais átomos de carbono. Esses compostos,

especialmente os ésteres e aldeídos, são responsáveis pelo aroma e sabor dos destilados em geral (Valsechi, 1960; Aquarone et al., 1983).

Os aldeídos, principalmente o acetaldeído, são co-produtos normais da fermentação alcoólica. A formação desse tipo de composto é resultado da ação de leveduras durante estágios preliminares do processo de fermentação, tendendo a desaparecer nas etapas finais, desde que o mosto sofra aeração.

Os demais aldeídos são obtidos, provavelmente, a partir da oxidação de álcoois superiores, provenientes da degradação de aminoácidos gerados pela hidrólise de proteínas. O furfural é um aldeído de presença rara em algumas aguardentes. É formado, principalmente, pela pirogenação da matéria orgânica depositada no fundo dos alambiques. A sua formação é evitada pela destilação do vinho limpo, livre de substâncias orgânicas em suspensão. Nas cachaças envelhecidas, o furfural pode ser oriundo da ação de ácidos sobre as pentoses e seus polímeros (hemiceluloses). Esse composto pode estar presente no caldo de cana, quando a colheita da cana-de-açúcar for precedida da queima do palhiço (NOVAES, 1974; POTTER, 1980; PIGGOTT et al., 1989; YOKOYA, 1995).

Entretanto, estas substâncias ou congêneres estão presentes em todos os destilados (aguardente de cana, whisky, rum, vodka, conhaque), além de cinzas e metais pesados que são controlados pelos órgãos oficiais em todos os países, ou seja, para cada substância presente no destilado, há um limite para restringir a intoxicação pelo consumo.

Com o objetivo de produzir bebidas, como a cachaça, com melhor rendimento e com melhor padrão de consumo, foram desenvolvidos estudos e análises, que demonstraram resposta significativamente positiva frente ao uso da quitosana.

## **O Estado da Técnica**

A quitina é um biopolímero estrutural e funcionalmente semelhante à celulose, encontrado como elemento estrutural nos exoesqueletos dos artrópodos.

A maior fonte deste biopolímero em termos percentuais são os resíduos da carcinicultura. As cascas descartadas de caranguejo, camarão e lagosta são estimadas em milhares de toneladas anualmente. Somente na Região Nordeste, a pesca do camarão, caranguejo e lagosta alcançam aproximadamente 50.000 toneladas por ano. O conteúdo de quitina na base seca do resíduo processado do caranguejo (13-26%) é mais baixo do que do camarão (14-42%) e lagosta (14-28%), o conteúdo mineral nas bases secas da casca do camarão, lagosta e caranguejo estão acima de 33%, 45% e 66%, respectivamente.

Outra fonte promissora de quitina é o Krill Antártico. A captura anual potencial deste crustáceo, que não afetaria o ecossistema Antártico, está estimado em 100 milhões de toneladas/ano. Esta quantidade de Krill tem cerca de 2 milhões de toneladas de quitina, bem como 0,3 milhões de toneladas de outros açúcares e pigmentos carotenóides. A maioria das empresas exploradoras do segmento estão localizadas nos E.U.A. e Japão, onde largas quantidades de quitina e quitosana são manufaturadas da casca do camarão e caranguejo a cada ano. Geralmente, o isolamento da quitina consiste em desmineralização, desproteíntização e branqueamento.

Já a quitosana, é normalmente preparada pela N-desacetilação da quitina. Isto é realizado em diferentes combinações de tempo e temperatura, usando soluções concentradas de hidróxido de sódio e/ou potássio. A concentração alcalina, o tempo e a temperatura do processo devem ser rigorosamente controlados, porque isto influencia no grau de desacetilação, peso molecular e distribuição do peso molecular,



bem como na distribuição das unidades desacetiladas ao longo da cadeia de polissacarídeo. Essas propriedades refletem na utilidade da quitosana para várias aplicações, especialmente na indústria farmacêutica.

O potencial de uso da quitosana é imenso: como fibra alimentar é discutida por vários autores [(Furda, 1983), (Ishikura, 1993), (Furda & Brine, 1990)] na literatura científica. Diversas publicações de patente do estado da técnica mostram que é possível a utilização da quitosana devido as suas características químicas: para fins médicos na redução de ácidos graxos insaturados (JP2004051615); na prevenção e tratamento de hiperlipidemia (JP2004051615); na absorção e eliminação de metais pesados de fluxos de águas (JP53003982) e como floculante para purificação de águas residuais (US4285819).

Adicionalmente, a quitosana é utilizada para purificação de extratos líquidos de café, retirando sabores e aromas desagradáveis (JP59179034).

Posteriormente, é relatado o emprego no tratamento de alimentos líquidos de origem vegetal, sucos, cerveja, vinho, concentrados de frutas e vegetais com quitosana, para reduzir o tamanho das partículas sólidas e suspensão para 250 microns, agindo como clarificador de bebidas (FR2599048).

O documento US4775650 relata o uso de filmes de materiais quitinosos (quitina) em massas para remover metais contaminantes, compostos orgânicos halogenados ou materiais contaminados ou poluídos.

Os documentos US4992180 e JP2164716 relatam métodos de separação de íons metálicos, presentes em soluções aquosas pela quitosana.

A quitosana é utilizada como floculante em soluções ácidas, solução aquosa de celulose carboxi-metilada, solução de cloreto de cálcio e líquidos fermentados que contenham ácido glutâmico, conforme a publicação de patente CN1073718.

Como método de tratamento para melhoramento de sabor de peixes, carne bovina e carne de aves processadas, visando à retirada de compostos sensorialmente indesejáveis, a quitosana tem ação floculante, como relatado nos documentos US5433865 e CA215939 A1.

O documento RU2238002 C2 trata do uso da quitosana como floculante de partículas suspensas em substâncias contendo sacarose, tais como sucos, visando à melhoria sensorial do produto final. Já o documento US6786336 relata o uso da quitosana como um bioabsorvente utilizado para tratamento de sistemas aquosos, removendo metais pesados.

No que concerne à purificação de líquidos alcoólicos utilizando quitosana, visando à remoção de ácidos graxos e íon metálico, é descrito no documento JP2005137264.

Na literatura científica, a quitosana é relatada para diversas aplicações, tais como: adsorvente e floculante (Wen et al., 2005); removedora de poluentes da aquicultura (Chung et al., 2005), removedora de níquel (Pradhan et al., 2003) e metais (Era & Gibb, 1999) em soluções aquosas.

A quitosana é citada ainda como biofloculante de ácidos graxos de baixo peso molecular, podendo ser utilizada como estratégia de digestão alimentar (Fujita et al., 2001). Muitos artigos caracterizam a quitosana como polímero natural capaz de reduzir de forma moderada o colesterol (Win et al., 2003), reduzir o peso corporal, gorduras e pressão arterial e aumento da digestibilidade em animais (Han et al., 1999; Kondo et al., 1996; Razdan et al., 1997; Deuchi et al., 1994) e em humanos (Sciutto et al., 1995; Colombo et al., 1996; Giustina et al., 1995).

Recentemente, foi comprovada a eficiência da quitosana em tratamentos e regeneração de ferimentos (hemostáticos), como auxiliar na redução de colesterol, na

remoção do vibrião da cólera em águas contaminadas, como agente imobilizador para liberação controlada de medicamentos e como auxiliar na redução de peso no tratamento de obesidade, através da captura das gorduras contidas nos alimentos.

Diferentemente de outras fibras vegetais (pectina, guar, lignina, etc), a quitosana é uma fibra de origem animal que, quando em solução, possui uma carga iônica positiva, o que lhe confere a propriedade de se ligar a moléculas carregadas negativamente. Em meio ácido, os grupos amino do polímero captam íons hidrogênio do meio, resultando uma carga global positiva à quitosana, que atrai e se liga ionicamente a moléculas carregadas negativamente, nas quais estão incluídas os ácidos graxos (lipídios), os ácidos biliares e outros.

Estudos recentes demonstraram a capacidade da quitosana em se ligar às gorduras, tanto em *in vitro*, como em animais. Um grupo de pesquisadores japoneses realizou experimentos em ratos e publicou que “os resultados indicam que a quitosana possui potencial para interferir na digestão e na absorção das gorduras pelo trato intestinal, facilitando a excreção destas gorduras nas fezes dos animais”.

## **Descrição da Invenção**

Desta forma, os processos atualmente existentes para o uso da quitosana não caracterizam a retirada de diversos aldeídos em destilados, e mais especificamente presentes na cachaça, como acetaldeído, formaldeído, n-butiraldeído, benzaldeído, valeraldeído, furfural e hidroximetilfurfural e de ésteres como, acetato de etila, carbamato de etila, caprilato de etila.

Como anteriormente destacado, estes compostos secundários ou congêneres, presentes em destilados, normalmente são os responsáveis pelos efeitos negativos (toxicológicos) da ingestão da bebida. Os aldeídos, sobretudo podem ser responsáveis por dores de cabeça, ressaca, mau hálito, vômito e outros distúrbios fisiológicos provenientes do consumo de produtos de baixa qualidade e/ou em excesso (Bogden & Klevay, 2000; Pigott, 1999).

Buscando otimizar a produção de diversos tipos de bebidas, principalmente da cachaça, manipulando as suas frações, de modo a eliminar concentrações indesejáveis desses compostos secundários presentes e com o objetivo de superá-los, foi proposto um novo processo para obtenção de cachaça de qualidade, a qual consiste em utilizar a quitosana como abrandador, para remover aldeídos e ésteres indesejáveis da mesma.

Além disso, a quitosana remove também lipídeos (ácidos graxos insaturados), metais pesados (cobre, zinco, níquel, cromo) e diminuiu o valor calórico total (VCT) da cachaça conforme descrito adiante.

A aplicação da quitosana, como abrandador de destilados, principalmente de cachaça, surgiu em resposta da verificação da reatividade da quitosana frente a aldeídos, ésteres, metais e lipídeos.

Observou-se que este polímero, com funções amino livres ao longo de sua cadeia polimérica, capta funções aldeído, transformando-os em Base de Schif, ou seja, iminas insolúveis, como também, esses mesmos grupos reacionais são excelentes complexantes de metais pesados em razão do comportamento básico desse polímero. Com relação a lipídeos, esses polímeros são agregadores de gordura, incluso colesterol, tanto é que, esse polímero é comercializado como esponja de gorduras, como anteriormente ressaltado.

Assim, objetivamente, a presente invenção consiste em submeter destilados, principalmente a cachaça, seja oriunda de coluna, ou destilada em coluna de retificação, ou cachaça de alambique, destilada em alambique de cobre e/ou aço inoxidável, em que os compostos secundários (aldeídos, ésteres e outros) estão presentes.

Entretanto, as diversas cachaças apresentam diferentes concentrações destes compostos secundários, não havendo um padrão definido entre diversas marcas disponíveis no mercado. Já as concentrações máximas de cada congêneres, são regulamentadas e controladas pelo MAPA (2005).

Em função dos altos teores de aldeídos, ésteres e outros congêneres presentes na fração inicial (cabeça) e final (cauda) da destilação em alambiques de cobre e/ou aço inoxidável, estas frações são descartadas por motivos toxicológicos. A utilização deste método possibilita a remoção dos congêneres (aldeídos e ésteres) destas frações, tornando-as com teores adequados para consumo de acordo com a legislação de bebidas brasileiras. O aproveitamento destas frações (cabeça e cauda), anteriormente descartadas, aumentam o rendimento industrial em até 40%.

No caso de cachaça de destilação fracionada, Chaves (1998) denomina as frações:

- 1ª fração – Cabeça – represente os primeiros 10-25% do destilado; contendo metanol, íons metálicos e parte dos aldeídos, ésteres e álcoois superiores;
- 2ª fração – Coração – constitui-se na segunda fração ou fração intermediária do destilado, representando 50-80% do destilado total - (cachaça comercial), prevalecendo nesta fração os menores teores dos congêneres tóxicos e as melhores qualidades sensoriais ou organolépticas;
- 3ª fração – Cauda – representa a última fração do destilado, ou seja, os 10-25% finais do destilado total. Contém ácidos voláteis, ácido acético, furfural, aldeídos, ésteres e parte de ácidos graxos e álcoois superiores;

Desse modo, normalmente as frações de cabeça e cauda são descartadas por apresentarem altos teores de aldeídos totais, furfural, ésteres totais, cobre, óleo fúsel e outros, que podem ser altamente tóxicos, e que reduzem significativamente o rendimento industrial e o valor sensorial.

Considerando que estes compostos secundários (aldeídos, furfural, ésteres, íons metálicos, lipídeos, etc) muitas vezes se apresentam como nocivos a saúde, torna-se importante o desenvolvimento de estratégias para suas remoções da cachaça, elevando suas qualidades físico-químicas e sensoriais.

Portanto, com base nestas informações, buscou-se o melhor emprego da quitosana, na recuperação dessas frações, o que elevará, em muito, o rendimento do produto final em até 40% e proporcionando uma redução entre 30-60% e 30-80% os teores de aldeídos e ésteres presentes na cachaça, respectivamente.

Assim, devido às afinidades químicas e eletrostáticas entre a quitosana e os congêneres anteriormente citados, formaram-se agregados quitosana-congêneres em

suspensão na cachaça tratada e que foram removidos utilizando filtros, de preferência, de celulose e carvão ativado, na granulometria de 0,5-5 µm.

Todas as granulometrias poderiam ser usadas; entretanto, quanto menor a granulometria, maior superfície de contato entre a quitosana e os compostos, portanto quanto menor a granulometria, melhor o resultado de remoção. A correlação é a mesma para todos destilados, na aplicação do presente processo (Lang & Clausen, 1989).

As vantagens do processo da presente invenção são inúmeras, conforme será demonstrado abaixo, de modo exemplificativo, mas não delimitativo do escopo da presente invenção.

O processo de uso do abrandador quitosana, como removedor de congêneres secundários tóxicos de destilados, principalmente da cachaça, consiste em se submeter os mesmos a um processo de tratamento com quitosana, esta, estando no estado de pó ou granulado, na proporção variando de 5 a 15% de quitosana, por litro de cachaça, mantendo-se a reação sob agitação por um período de aproximadamente 8-12 horas, em temperatura ambiente, e sendo mantido um controle de pH de 5-6, sendo posteriormente, submetida a suspensão/solução a uma filtração, podendo ser filtro de celulose ou carvão ativado, granulometrias variando de 0,5-5 µm.

A quitosana foi aplicada nas frações de cachaça completa (cabeça+coração+cauda), na cabeça, cauda, coração e envelhecida por 2-4 anos.

A utilização da quitosana se dá preferencialmente, mas não exclusivamente, na forma natural e em pó, entretanto, podendo ser utilizada em outras granulometrias.

Os exemplos que se seguem são mostrados com o objetivo de dar aos técnicos na matéria um melhor entendimento e praticidade do processo, não tendo caráter

limitativo do escopo da invenção, mas meramente ilustrativo e esclarecedor da matéria.

Foram tratadas diferentes amostras de cachaça, nas suas diversas frações, e comparativamente, com outras amostras não tratadas com quitosana.

Após a retirada das amostras, as cachaças completa e de coração tratadas e não tratadas com quitosana foram colocadas em barris de carvalho de 300 l e envelhecidas. Os controles (cachaça não tratada) também foram filtrados e analisados na mesma condição. Cachaça de coração, envelhecida 2 anos em tonéis de carvalho também foi tratada com quitosana utilizando os mesmos parâmetros.

A análise das amostras quanto aos parâmetros físico-químicos, foram feitos de acordo com o Decreto nº 42.644, de 5 de junho de 2002 e serão demonstrados nas tabelas a seguir.

Os controles (cachaça não tratada) foram filtrados e analisados na mesma condição. Os parâmetros analisados foram: aldeídos totais, furfural, ésteres totais, lipídeos, cobre, valor calórico total, carboidrato, álcool metílico, extrato seco, umidade, nitrogênio total e resíduo mineral fixo. O experimento foi repetido duas vezes e as análises feitas em triplicata.

Os resultados obtidos revelam o grande potencial da quitosana em reduzir entre 30-60% e 30-80% os teores de aldeídos e ésteres presentes na cachaça, respectivamente.



### **Exemplo I**

Diferentes tratamentos (cachaça completa, cabeça, cauda, coração e envelhecida por 2 anos em barris de carvalho) de 250 L cada, receberam quitosana natural em pó, na proporção de 5 gramas de quitosana por litro de cachaça, em um tonel de aço inoxidável.

A reação foi mantida sob agitação por 12 horas a temperatura ambiente, em pH 5-6 e sendo, posteriormente, a solução filtrada em um filtro celulose, de 0,5-5  $\mu$ m. Observou-se que houve uma diminuição dos teores de aldeídos da fração cabeça em 45%, da fração coração de 36% e da fração cauda de 45%. O experimento foi feito em triplicata.

### **Exemplo II**

Diferentes tratamentos (cachaça completa, cabeça, cauda, coração e envelhecida por 2 anos em barris de carvalho) de 250 L cada, receberam quitosana natural em pó, na proporção de 10 gramas de quitosana por litro de cachaça, em um tonel de aço inoxidável. A reação foi mantida sob agitação por 12 horas a temperatura ambiente, em pH 5-6 e sendo, posteriormente, a solução filtrada em um filtro celulose, de 0,5-5  $\mu$ m. O experimento foi executado em triplicata.

A Tabela I, abaixo, demonstra a média dos resultados dos diversos tratamentos, nos exemplos I e II, com o abrandador, comparativamente a amostras sem uso do abrandador, e observa-se que ocorreu uma diminuição dos teores de aldeídos da fração cabeça em 45%, da fração coração de 36% e da fração cauda de 45%.

**Tabela I**

<i>Amostras</i>	<i>Aldeídos (mg/100mL)</i>	<i>Furfural (mg/100mL)</i>	<i>Ésteres (mg/100mL)</i>	<i>Extrato Seco Total (mg/100mL)</i>	<i>Cobre (mg/L)</i>
<b>Cabeça</b>	0,215	0,41	309,8	0,135	0,3
<b>Cabeça + Abrandador</b>	0,117	0,37	228,9	0,016	0,1
<b>Coração</b>	0,124	1,32	51,2	0,152	0,01
<b>Coração + Abrandador</b>	0,079	0,54	27,3	0,013	ND
<b>Calda</b>	0,044	4,9	45,25	0,256	0,08
<b>Calda + Abrandador</b>	0,024	1,6	31	0,107	0,01
<b>Envelhecida</b>	0,115	0,62	48	0,016	ND
<b>Envelhecida+ Abrandador</b>	0,085	0,38	38	0,006	ND

Houve também uma redução significativa do Extrato Seco Total em todas as amostras analisadas, conforme se observa na tabela acima. É no extrato seco onde se concentram íons metálicos (metais pesados) e outros compostos indesejáveis.

Além disso, a quitosana removeu 20-30% dos lipídeos totais dependendo da amostra (cachaça de coração e completa) e reduziu o valor calórico total (VCT) em até 30%. Foi ainda observado a eliminação ou remoção parcial do cobre em todas as amostras analisadas.

### **Exemplo III**

Desta vez, foi testada a fração comercial (o coração) e a cachaça sem separação (completa: cabeça +coração+ cauda). A fração coração e completa, aqui destacadas foram testadas com 5 e 15 gramas de quitosana. Neste caso, obteve-se uma redução nos aldeídos de 52% e 57% (coração e completa tratados), enquanto que o aldeído furfural foi diminuído na fração coração em 71% e na fração completa, o furfural foi totalmente eliminado.

A tabela II, abaixo, demonstra a média dos resultados dos diversos tratamentos no exemplo III, com o abrandador, comparativamente a amostras sem uso do abrandador.

Além disso, observou-se que a quitosana removeu 20-30% dos lipídeos totais dependendo da amostra (cachaça de coração e completa) e reduziu o valor calórico total (VCT) em até 30%.

Foi ainda, observado, a remoção total do cobre em todas as amostras analisadas e a redução de 40-80%, dependendo da amostra, do extrato seco total ou cinzas, fração sólida onde se concentram íons metálicos.

**TABELA II**

<i>Amostras</i>	<i>Aldeídos (mg/100mL)</i>	<i>Furfural (mg/100mL)</i>	<i>Ésteres (mg/100mL)</i>	<i>Cobre (mg/L)</i>
<b>Coração</b>	0,282	0,42	32,66	0,01
<b>Coração + Abrandador</b>	0,136	0,12	26,66	ND
<b>Completa</b>	0,385	0,08	50,1	0,04
<b>Completa + Abrandador</b>	0,166	ND	33,82	ND

**Obs:** ND = não detectado; Completa (fração cabeça, coração e cauda juntas).

O aproveitamento da fração cabeça e cauda, ou seja, a possibilidade de comercializar estas duas frações por não apresentarem limitações físico-químicas de acordo com a legislação de bebidas, é efetivamente a melhoria do rendimento. Pois, estas duas frações eram anteriormente descartadas.

Ficam assim evidenciadas as vantagens da presente invenção ao se utilizar como o uso do abrandador quitosana, como removedor de congêneres secundários tóxicos de bebidas destiladas, principalmente da aguardente de cana - cachaça, sendo um processo inovador na melhoria da qualidade do produto final e em seu rendimento.

**A presente patente acima publicada no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) serviu de base para elaboração e redação do artigo científico apresentado abaixo, que foi submetido à revista *Journal Agriculture and Food Chemistry* em 01 de julho de 2008.**

**The use of polymeric Chitosan as an efficient strategy to reduce secondary compounds from Cachaça, improving quality and productivity**

Journal:	<i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Marra, Brenner; EMBRAPA, Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia Silva, Djair; EMBRAPA, Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia Franco, Octavio; Universidade Catolica de Brasilia, Pos-Graduacao em Ciencias Genomicas e Biotecnologia Ginanini, Marconi; Alambique do Ministro Silva, Carlos; Alambique do Ministro Sa, Cesar; EMBRAPA, Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia Grossi De Sa, Maria Fatima; Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Biotecnologia

**The use of polymeric Chitosan as an efficient strategy to reduce secondary compounds from Cachaça, improving quality and productivity**

Brener M. Marra<sup>1,2</sup>, Djair S.L. Souza<sup>1,2</sup>, Octavio L. Franco<sup>3</sup>, Marconi F. Ginani<sup>2</sup>, Carlos A.A. Silva<sup>2</sup>, Cezar Martins de Sá<sup>1</sup>, Maria F. Grossi de Sa<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, DF, Brazil.

<sup>2</sup> Alambique Cachaça do Ministro, GO – Brazil.

<sup>3</sup> Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, UCB, DF, Brazil .

**Corresponding Author:**

Maria F. Grossi-de-Sa

E-mail: [grossidesa@gmail.com](mailto:grossidesa@gmail.com)

\* Patent requested and published by the National Institute of Industrial Property - BRAZIL. PI0601586-7 ®

## **Abstract**

Cachaça is a common denomination for a Brazilian spirit produced from the distillation of freshly fermented sugarcane juice by artisanal methods. Brazilian authorities have recently classified Cachaça as a unique characteristically national product. For these reasons, an intense effort has been dedicated to improving quality control of this beverage. Moreover, Cachaça is the distillate used in the world-famous Caipirinha drink, of which more than one million liters per year are consumed. Available data about production are still scarce, especially concerning side compounds, which normally may be undesirable due to toxicological properties. In order to overcome these compounds and obtain a beverage with superior quality, novel processes have been proposed. In this report, we propose to treat the distillate with 6 to 10 g chitosan per liter following a further filtration. Treatments reduced the total caloric values as well as the quantities of aldehydes, esters, lipids and heavy metals. The congener's side decrease allowed compliance with regulations on Brazilian beverages of the initial and final fractions (head and tail) of distillate. The use of these fractions, previously discarded, increased the industrial yield to 35 %.

**KEYWORDS:** cachaça; chitosan; secondary compounds.

## Introduction

Cachaça is a spirit produced from the distillation of freshly-fermented sugarcane juice. According to the Brazilian Association of Spirits (2005) (1), the Brazilian production of Cachaça consists of approximately 1.8 billion liters per year, and is frequently used in *Caipirinha*, one of the most famous drinks in the world. Brazilian authorities have recently classified Cachaça as a unique and characteristically national product, and a great effort has been dedicated to quality improvement of the beverage. The economic importance of the distillate, however, is growing due to a recent designation of origin (2). Moreover, the production chain of Cachaça is also playing an important role in the structuring of thousands of small farms in Brazil, and the exportation is continuously increasing by about 25% per year (1).

Cachaça secondary compounds are a minority group of products derived from the fermentation process and further removed during distillation procedures. Among these compounds are higher alcohols, methyl alcohols, esters, aldehydes, copper and several others. These substances could contribute not only to the definition of smell and flavor, but also to the formation of harmful toxicological aspects of distillates in general (3 - 6). Between different Cachaça trademarks, the quantities of these harmful compounds vary due to fermentation and distillation, exceeding in some cases the legal levels (7). This variation therefore gives rise to the need for physico-chemical control of the spirits production (8 - 10). In addition, there are two forms in which Cachaça may be distilled: in distillation columns or in a copper pot still. Secondary compounds can be found in both, but in different levels. Therefore, there are still some peculiarities in the process of distilling Cachaça in a pot still. Germek (1982) (11) defined the first 10% produced during the initial distillation process as head Cachaça,



and the 10% at the end as tail Cachaça. Another 80% is known as Cachaça's heart, the beverage with the best organoleptic qualities; minor levels of side congeners prevail in this fraction. Normally, the head and tail fractions are discarded, due to high levels of aldehydes (ethyl carbamate, furfural and hydroxymethylfurfural, among others), methyl alcohols, copper, higher alcohols (oil fusel) and others, which may be considered toxic to consumers. Discarding the head and tail fractions substantially reduces industrial yield and sensory value (12, 4). For these reasons, it is important to develop novel strategies for the removal of these toxic compounds from Cachaça, which would enhance its physico-chemical and sensory qualities. An important strategy that has been developed is the use of polysaccharides, such as chitosan and several others, which have the ability to bind to secondary compounds and remove them from different foods and beverages.

Chitosan is a polymer extracted from chitin, a natural polysaccharide extracted from the shells of crustaceans such as prawns, crabs, insects and shrimps (13-19), by using an alkaline deacetylation procedure that yields a heteropolymer (16). Chitin and chitosan are of commercial interest due to their high nitrogen percentage (6.9%). Furthermore, amine and hydroxyl groups on their chemical structures act as chelation sites for metal ions, making them useful chelating agents (20, 21). Therefore, both polymers have shown desirable properties such as biocompatibility, biodegradability, non-toxicity and metal adsorption (22). Dambies et al. (2001) (16) showed that chitosan beads are able to remove about 60% of Cr (VI) ions from aqueous solution. Chitosan could also be an effective adsorbent for Cu (II) ion collection from aqueous solutions (14, 22, 19). This polymer is also known as an effective adsorbent of reactive dyes (23-26) due to its cationic properties. Additionally, it is also known that it is possible to use the chitosan for medical purposes via unsaturated fatty acids reduction

(27-29) in the prevention and treatment of hyperlipidemia and others (30, 31). Chitosan is also used for liquid coffee purification, removing unpleasant flavors and smells (32). More recently, it has been reported that liquid food of plant origin – juices, beer, wine, fruit and vegetable concentrates – may be processed with chitosan as a beverage clarifier to reduce the size of solid particles in suspension (33).

In view of the presence of numerous undesirable secondary compounds commonly found in Cachaça, this report proposes a new process to obtain better Cachaça quality. This strategy involves the use of chitosan to remove aldehydes, esters, lipids (unsaturated fatty acids), heavy metals (copper, zinc, nickel, chromium) and decrease the total caloric value (TCV), often unattractive in Cachaça, improving beverage quality and enhancing production processes.

## **Materials and Methods**

### ***Collection of Cachaça***

The distillates were obtained in the Alambique Do Ministro – GO, Brazil, using the following conditions: sugar cane was organically grown for 18 months, manually cut without burning and immediately ground after cutting. Wine was obtained by inoculation of *Saccharomyces* spp. at a concentration of 3 g.l<sup>-1</sup> by dry weight, sugar cane juice, diluted with clean water to 14° Brix, supplemented with maize malt (3 g.l<sup>-1</sup>) and rice bran (1 g.l<sup>-1</sup>). Fermentation was conducted at 28-32°C and pH 4.5-5.5, as agitation fermenting in stainless steel with a capacity of 2200 l, with aeration start of the foot-in-vessel in 1 h and total time of fermentation of approximately 24 h. The wine alcohol content was between 6.5% to 8.5% v v<sup>-1</sup>, with average content of 7.3% v v<sup>-1</sup>. Distillation was conducted in a copper pot still of three

bodies with a condenser, with intermittent load capacity of 1200 l and source of heat produced by the steam boiler. The average distillation speed was 0.7 - 1.0 l . min<sup>-1</sup>. This process generates several fractions: head Cachaça (initial fraction of distillate - first 10 l), heart (second fraction: from the head to alcohol content of 30 ° GL volume to 20°C into the collector), tail (of distillate 30 ° GL until GL in volume 3 of the 20°C into the collector) and complete (Head + Heart + Tail).

### ***Treatment of Cachaça with chitosan***

In order to obtain a better chitosan evaluation, two parallel experiments were conducted. Commercial chitosan obtained from crab shells was used (provided by the company Polymar of Brazil, Fortaleza / CE), which has an average desacetylation of 79%, measured by conductometry, and pH of 4.4. In the first experiment, 6 g per liter of chitosan fraction was added to the head, tail and heart after aging for 2 years in an oak vat (*Quercus* sp.). Volumes of 2 l were continuously stirred in Erlenmeyer flasks for 8 h, and then the fractions treated and not treated with chitosan were filtered (cellulose filter: 5 µcras). In the second experiment, 250 liters of heart and complete Cachaça fractions were added to different boxes of stainless steel (capacity 500 l). The different treatments of Cachaça received 10 g of commercial chitosan / liter, and were kept under suspension and in circulation using a 2 HP electric pump for 12 h at room temperature and pH 5.0. The treated with chitosan and untreated (control) Cachaça heart and complete fractions were filtered (activated charcoal filter: 5 µcras). After the withdrawal of the samples, both complete and heart Cachaças treated with chitosan and untreated were placed in a 200 l oak vat, aged for 1 year and analyzed again for the physical-chemical parameters.

## Physico-chemical analysis

For each fraction of Cachaça obtained, three different samples were taken in different glass bottles (700 ml content) sterilized, sealed with new metal lids and sent to a laboratory accredited by the Ministry of Agriculture and Livestock Supply of Brazil. The physico-chemical analyses of the spirits were made in accordance with procedures determined by the Association of Official Analytical Chemists (2007) (34), as can be viewed at <http://www.aoac.org/>. The parameters analyzed were as follows: alcohol real level, total aldehydes, hydroxymethylfurfural, total esters, copper, methyl alcohol, dry extract, total lipids, total caloric value, carbohydrates, total nitrogen, fixed mineral residue and humidity. The results of physical and chemical analyses were subjected to statistical analysis by ANOVA and Medium Tukey Test using SAS software (35).

## Results and Discussion

Results here demonstrated indicate the enormous potential of chitosan to reduce the levels of total aldehydes, hydroxymethylfurfural, copper, esters, total dry extract, lipids and total caloric value in Cachaça. When 6 g chitosan per liter of Cachaça was utilized, there was a clear decrease of aldehyde levels in the head (53%), heart (51%) and tail (77%) fractions. A significant reduction of dry extract (60% to 85%) was also observed (**Figure 1**). A more substantial reduction of the levels of aldehydes, esters and copper occurred when Cachaça was treated with 10 g of chitosan. In heart and complete Cachaça, a reduction in total aldehydes of 51% and 56% was observed, respectively. Moreover, hydroxymethylfurfural was removed from the heart (71%) and complete (87%) fractions (**Figure 2**). The aldehydes are formed

during the fermentation process and separated during the distillation, with higher levels in the initial or head fraction. These substances can contribute to the aroma and flavor and are found in several distillates (6, 5, 3, 12), but are toxicologically harmful. The removal of aldehydes is important to increase the spirit quality and decrease hangover effects. The potential of chitosan to remove aldehydes and polysaccharides involved in postharvest diseases from various horticultural commodities was previously reported by Bautista-Baños et al. (2006) (36) and Ahmad et al. (2005) (29). However, chitosan has not yet been used in the treatment of spirits.

Additionally, the almost complete removal of copper in all samples treated with chitosan was also observed (**Figure 2**). Copper contaminates the drink during the condensation of steam alcohol, causing undesirable symptoms on human health at higher concentrations, such as blindness, dizziness and central nervous system inhibition (37). The potential of chitosan to remove copper from different solutions (wastewater, chromate copper arsenate water treated wood) was previously reported by Sakkayawong et al. (2005) (38), Kartal and Imamura (2005) (39), Beppu et al. (2004) (20) and Huang et al. (1995) (21). Moreover, chitosan removed lipids and reduced the total caloric value (VCT) by up to 35% (**Figure 3**). The lipid and total caloric value reduction is a remarkable benefit to the distillates industry, since the consumption of light drinks is a vast and rich business trend in the world that moves millions of dollar each year. Many articles have reported the potential of chitosan to remove lipids, oils and polysaccharides from wastewater (40, 41, 37).

Due to higher levels of aldehydes, esters, copper and other congeners found in the initial (head) and end (tail) fractions of the distillation stills, these fractions are usually discarded for toxicological reasons, and also have low sensory quality. By using this method, an efficient subtraction of toxic congeners from these fractions was

allowed, making them appropriate for human consumption. The use of these previously discarded fractions (head and tail), could increase the industrial yield by up to 35%, reducing costs and improving distribution potential.

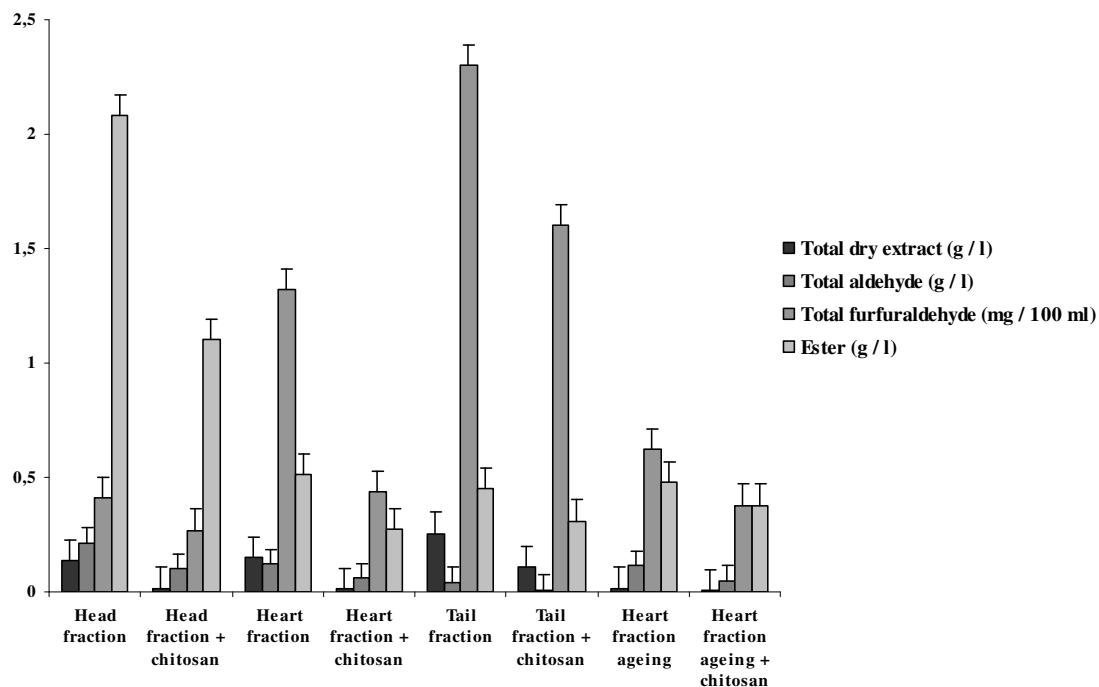
Finally, carbohydrates and methyl alcohol were not detected in any of the treatments examined. Nevertheless, Ahmad et al (2005) (29) reported the potential of chitosan to remove polysaccharides. The humidity detected in samples was approximately 99.8%. Moreover, total nitrogen (0.01 - 0.03 mg/ L) was also evaluated. No significant difference in statistical correlation between the Cachaça treated with chitosan and untreated was observed. An informal sensory analysis of Cachaça treated with chitosan and filtered with cellulose was carried out (data not shown), showing some residual taste of chitosan. In a second experiment, an activated charcoal filter was used, which removed any residual chitosan taste. A detailed sensory analysis will be made in the near future, although the purpose of the filters has been used only to remove the chitosan saturated with the side compounds discussed above.

In summary, side congeners discussed in this paper are also present in all commercial spirits (whisky, rum, vodka, tequila, etc.) at higher or lower levels. Thus, the results discussed here can be extrapolated to any distilled alcoholic beverage. Therefore, the use of reducer (chitosan) as a remover of toxic secondary congeners of Cachaça is an innovative process for improvement of the quality of the final product and for significant gain in productivity.

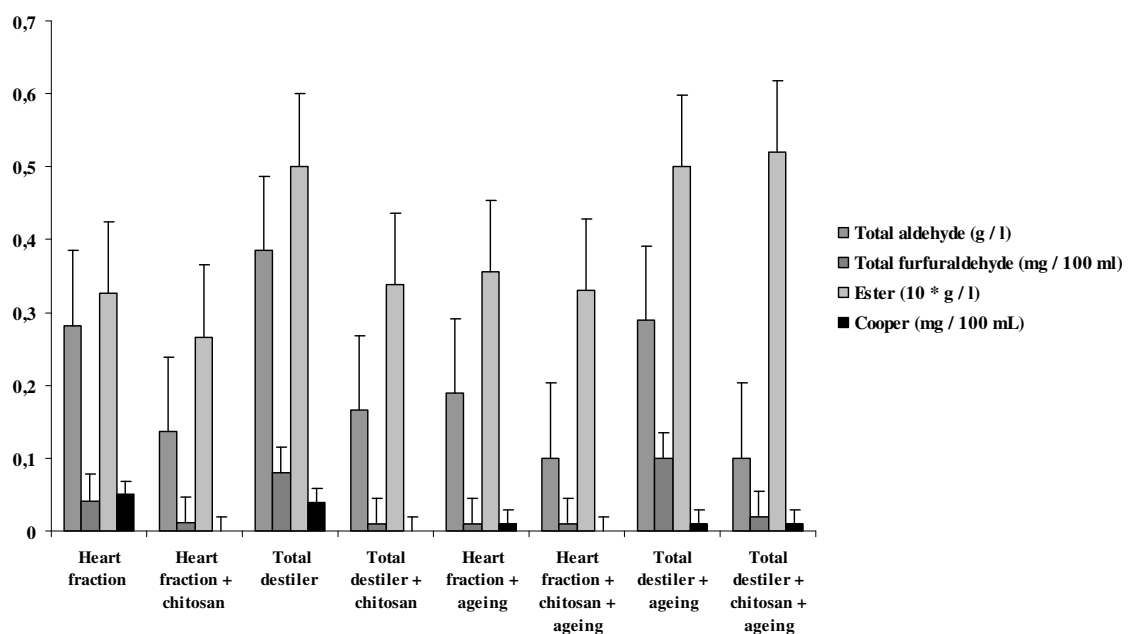
### **Acknowledgments**

This report was financed by CNPq and CAPES.

## Figures:

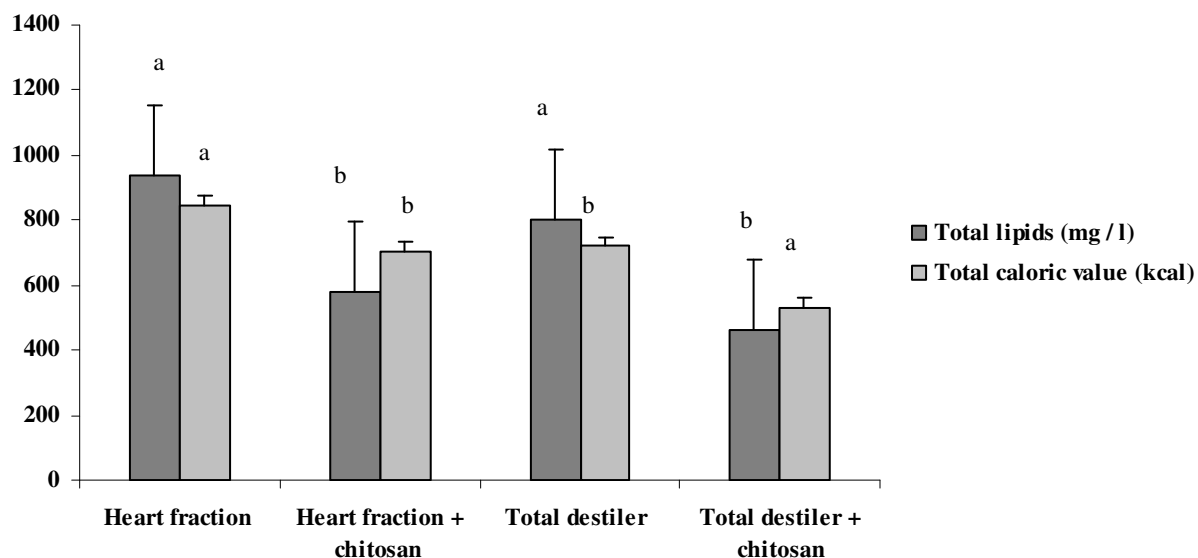


**Figure 1.** Effects of the powder chitosan on the removal of chemical compounds present in cachaça. Samples of Head, Heart, Tail fractions and Heart aged two years in *Quercus* sp. were treated or untreated with chitosan (6 g chitosan per liter of cachaça according Material and Methods). Physico-chemical analysis showed significant reduction of total dry extract, total aldehyde, total furfuraldehyde and ester after the treatment compared to the control.



**Figure 2.** Effects of the powder chitosan on the removal of chemical compounds present in cachaça. Samples of Heart and Total Destiler were treated or untreated with chitosan (10 g chitosan per liter of cachaça according Material and Methods) and aged 1 year in *Quercus* sp. or not aged. Physico-chemical analysis showed significant reduction of total aldehyde, total furfuraldehyde, ester and cooper after the treatment compared to the control.





**Figure 3.** Effects of the powder chitosan on the removal of total lipids and reduced total caloric value present in cachaça. Samples of Heart and Complete (Head + Heart + Tail) fractions were treated or untreated with chitosan (10 g chitosan per liter of cachaça according to Material and Methods). Physico-chemical analysis showed enhanced depletion on the levels of total lipids and total caloric value after the treatment compared to the control. Different letters represent significant differences by Tukey test.

## LITERATURE CITED

- (1) Brazilian Association of Spirits. Evaluation of the Brazilian beverages market, **2005**; <http://www.abrabe.org.br/>
- (2) Brasil, S. P. *Diário Oficial Estadual*; **2001**; No. 4.062, Dec 21, p 56.
- (3) Schwan, R.F.; Mendonça, A.T.; Da Silva Junior, J.J.; Rodrigues, V.E.; Wheals, A.E. Microbiology and physiology of Cachaça (aguardente) fermentations. *Anton. Van Leeuwenhoek* **2001**, 79, 89-95.
- (4) Aresta, M.; Boscolo, M.; Franco, D.W. Copper (ii) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 281-289.
- (5) Aquarone, E.; Lima, U.A.; Borzani, W. Food and beverages produced by fermentation, *Blucher*, **1983**, 227, 156-193.
- (6) Valsechi, O. Sugar-cane spirit, *Agronômica Ceres*, **1960**, 116, 69-78.
- (7) Brasil, S. P. *Diário Oficial Estadual*; **2002**; No. 42.644, Jun 20, p 32.
- (8) Aquino, F.W.B.; Nascimento, R.F.; Rodrigues, S.; Casemiro, A.R.S. Determination of aging marks in sugar cane spirits. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2006**, 26, 145-150.
- (9) Cerdán, T.G.; Mozaz, S.R.; Azpilicueta, C.A. Volatile composition of aged wine in used barrels of french oak and of american oak. *Food Res. Inter.* **2002**, 35, 603-613.
- (10) Piggott, J. R.; Hunter, E. A.; Margomenou, L. Comparison of methods of analysis of time-intensity data: application to scotch malt whisky. *Food Chem.* **2007**, 1, 319-322.
- (11) Germek, H.A. Distillation process, *Esalq* 1982, 61 , 23-25
- (12) Lima, A. De J.B.; Cardoso, M. Das G.; Guerreiro, M.C.; Pimentel, F.A. Using activated carbon to remove copper from sugar cane spirit. *Química Nova* **2006**, 29, 247-249.
- (13) Tikhonov, V.; Radigina, L.A.; Yamskov, Y.A. Metal-chelating chitin derivatives via reaction of chitosan with nitrilotriacetic acid. *Carbohydrate Research* **1996**, 290, 33-41.
- (14) Ngah, W.S.W.; Isa, I.M. Comparison study of copper ion adsorption on chitosan, dowex A-1, and zerolit 225. *J. Appl. Poly Sci.* **1998**, 67, 1067-1070.
- (15) Kumar, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. *React. Func. Poly.* **2000**, 46, 1-27.
- (16) Dambies, L.; Guimon, C.; Yiacoumi, S.; Guibal, E. Characterization of metal ion interactions with chitosan by X-ray photoelectron spectroscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2001**, 177, 203-214.
- (17) Benguella, B.; Benaissa, H. Cadmium removal from aqueous solutions by chitin: kinetic and equilibrium studies. *Water Res.* **2002**, 36, 2463-2474.
- (18) Dutkiewicz, J.K. Superabsorbent materials from shellfish waste. *J. Biom. Mat. Res.* **2002**, 63, 373-381.
- (19) Gyliene, O.; Rekertas, R.; Salkauskas, M. Removal of free and complexed heavy-metal ions by sorbents produced from fly (*Musca domestica*) larva shells. *Water Res.* **2002**, 36, 4128-4136.
- (20) Beppu, M.M.; Arruda, E.J.; Vieira, R.S.; Santos, N.N. Adsorption of Cu(II) on porous chitosan membranes functionalized with histidine. *J. Membr. Sci.* **2004**, 240, 227-235.
- (21) Huang, C.; Chung, Y.C.; Liou, M.R. Adsorption of Cu(II) and Ni(II) by pelletized biopolymer. *J. Hazard. Mater* **1996**, 45, 265-277.

- (22) Ngah, W.S.W.N.; Endud, C.S.; Mayanar, E.R. Removal of copper(II) ions from aqueous solution onto chitosan and cross linked chitosan beads. *React. Func. Poly.* **2002**, 50, 181–190.
- (23) Juang, R.S.; Wu, F.C.; Tseng, R.L. *Bioresour. Technol.* **2001**, 80, 187–193.
- (24) Juang, R.S.; Wu, F.C.; Tseng, R.L. *Adv. Environ. Res.* **2002**, 6, 171–177.
- (25) Wu, F.C.; Tseng, R.L.; Juang, R.S. *J. Hazard. Mater.* **2000**, 73, 63–75.
- (26) Wu, F.C.; Tseng, R.L.; Juang, R.S. *Water Res.* **2001**, 35, 613–618.
- (27) Li, Y.H.; Zhang, M.; Wang, J.C.; Zhang, S.; Liu, J.R.; Zhang, Q. Effects of absorption enhancers on intestinal absorption of lumbrokinase. *Yao Xue Xue Bao.* **2006**, 41, 939-944.
- (28) Kiliç, A.; Teke, M.; Onal, S.; Telefoncu, A. Immobilization of pancreatic lipase on chitin and chitosan. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2006**, 36, 153-63.
- (29) Ahmad, A.L.; Sumathi, S.; Hameed, B.H. Residual oil and suspended solid removal using natural adsorbents chitosan, bentonite and activated carbon: A comparative study. *Chem. Eng. J.* **2005**, 108, 179–185
- (30) Yang, J.; Tian, F.; Wang, Z.; Wang, Q.; Zeng, Y.J.; Chen, S.Q. Effect of chitosan molecular weight and deacetylation degree on hemostasis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* **2008**, 84, 131-137
- (31) Hossain, S.; Rahman, A.; Kabir, Y.; Shams, A.A.; Afros, F.; Hashimoto, M. Effects of shrimp (*Macrobrachium rosenbergii*)-derived chitosan on plasma lipid profile and liver lipid peroxide levels in normo- and hypercholesterolaemic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **2007**, 34, 170-176.
- (32) Japan Patent Office, JP2005137264A. Method for purifying distilled liquor. Nov. 06, **2003**.
- (33) Institut National de la Propriété Industrielle, FR2599048. Méthode de traitement pour liquides alimentaires d'origine végétale en vue de les stabiliser, notamment en ce qui concerne leur couleur. Mai. 26, **1987**.
- (34) Association of Official Analytical Chemists; *Official Methods of Analysis*, Arlington: AOAC, **2007**, 253-379. <http://www.aoac.org/>.
- (35) SAS – *Statistics and statistical graphics software* **2006**. Princeton University, USA.
- (36) Bautista-Banôsa, S.; Hernandez-Lauzardo, A.N.; Velazquez-del Valle, M.G.; Hernandez-Lopez, M.; Ait Barkab, E.; Bosquez-Molinac, E.; Wilson C.L. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protect.* **2006**, 25, 108–118.
- (37) Lang, G., Clausen, T. The use of chitosan in cosmetics. In: Skjak-Braek, G., Thorleif Anthosen, T., Standford, P. (Eds.), Chitin and Chitosan. Sources, Chemistry, Biochemistry. *Physical Properties and Applications*; **1989**; Elsevier Applied Science, London and New York, 139–147.
- (38) Sakkayawong, N.; Thiravetyan, P.; Nakbanpote, W. Adsorption mechanism of synthetic reactive dye wastewater by chitosan. *J. Colloid Interf Sc* **2005**, 286, 36–42.
- (39) Kartal, N.S.; Imamura, Y. Removal of copper, chromium, and arsenic from CCA-treated wood onto chitin and chitosan. *Bioresource Technology* **2005**, 96, 389–392.
- (40) Tapola, N.S.; Lyyra, M.L.; Kolehmainen, R.M.; Sarkkinen, E.S.; Schauss, A.G. Safety aspects and cholesterol-lowering efficacy of chitosan tablets. *J Am Coll Nutr.* **2008**, 27, 22-30.
- (41) Crini, G. Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review. *Bioresour Technol.* **2006**, 97, 1061-1085.

## **4. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O objetivo de nossa proposta foi avaliar os principais parâmetros envolvidos fermentação e destilação em alambique de cobre de três corpos ao longo de três safras e otimizá-los, e ainda correlacioná-los com a composição físico-química da cachaça, sob condições operacionais práticas. Sugerimos que os resultados aqui adquiridos podem ser aplicados diretamente nas destilarias sem nenhuma necessidade de fazer um escalonamento. São eles: - a temperatura e o tempo de alimentação das dornas de fermentação podem influenciar até 42% do volume de produção da fração coração; o fracionamento da cachaça de coração estendido até 20°GL a 20°C aumenta significativamente a produção de coração e de álcoois superiores sem ultrapassar os níveis tolerados na legislação vigente. Além disso, as dornas de fermentação alimentadas com 40% do caldo de cana-de-açúcar diluído a temperatura ambiente e os 60% restantes com temperatura de aproximadamente 30 °C aumentam os teores de ésteres totais em até 120% no destilado final. Não obstante ao incremento na produtividade da cachaça aqui apresentado, os parâmetros microbiológicos da fermentação, as alterações bioquímicas da levedura e análises das populações de microorganismos nas atuais condições de fermentação restam a ser estabelecidos. Além disso, outros parâmetros ou resultados obtidos ainda precisam ser mais bem estudados em experimentos adicionais, tais como: o volume de coração pode apresentar uma relação inversamente proporcional e significativa ao teor alcoólico médio da fração coração; a velocidade de destilação e o volume de coração podem apresentar uma relação linear significativa e positiva de até 35%; a velocidade média de destilação entre 0,7- 0,9 L/min em alambique de cobre de três corpos apresentou melhor relação de volume de coração para as demais frações.

Já para o maior rendimento industrial e de qualidade, será necessário analisar ainda a relação dos genótipos de maturação precoce, média e tardia, o maior controle

de temperatura, tempo e pH durante todo o processo, especialmente na alimentação das dornas de fermentação, e análises físico-químicas mais detalhadas, além de avaliar a cinética do processo de envelhecimento. Entretanto, os dados e parâmetros de controle de qualidade (fermentação e destilação) durante safras seguidas, como este trabalho proposto, ainda não estavam disponíveis na literatura científica.

Tabelas de controle de produção foram elaboradas no programa EXCEL e testadas durante as safras por diferentes produtores de cachaça. A partir destes dados pode-se avaliar, correlacionar e projetar os parâmetros quantitativos e qualitativos. Alternativamente, pode ser criado um software ou programa específico para destilarias de cachaça a partir destes parâmetros.

Tais resultados são de grande relevância para as destilarias e alambiques, tanto para cachaça artesanal quanto para a industrial. Atualmente, as destilarias Cachaça DoMinistro (GO), Cachaça do Piloto (GO), Cachaça Cambeba (GO), Cachaça Siriema (GO), Cachaça Alma Gêmea (DF) e Cachaça Buriti Tizão (DF) estão utilizando estes resultados e tabelas para controle de produção e qualidade.

Espera-se, também, avançar nos conhecimentos tecnológicos sobre a produção e remoção de congêneres secundários tóxicos, incorporando técnicas (tecnologias) e filtros comercialmente explorados. Existem ainda fortes indícios da capacidade da quitosana remover o carbamato de etila. Este aldeído é altamente tóxico e cancerígeno (Andrade-Sobrinho et al., 2002) e está mais presente nas bebidas destiladas de baixa qualidade e são alvos de discussão em todo o mundo atualmente, principalmente nos maiores países consumidores de destilados (EUA, Alemanha, França, Canadá e Brasil). Caso estes indícios sejam comprovados, o processo de remoção de carbamato de etila através do uso da quitosana poderá apresentar aplicações diretas na indústria de bebidas destiladas. Um filtro com quitosana e carvão ativado com capacidade de

filtragem de 1000 l /h foi elaborado, e encontra-se em fase de testes comerciais. Além disso, novas análises físico-químicas estão sendo efetuadas para validar este protótipo e quantificar o grau de saturação da quitosana no filtro.

Análises sensoriais deverão ser feitas para complementação destes resultados, visto que o uso das estratégias aqui propostas poderá ser extrapolado para quaisquer outros destilados. Além disso, este processo de remoção de congêneres secundários tóxicos com patente requerida e publicada trata-se da primeira e única patente com cachaça no Brasil até o presente momento.

Portanto, esperamos contribuir desta maneira para a cadeia produtiva da cachaça, que cresce anualmente de forma significativa e para a cachaça de Brasília, que já é a segunda maior cidade consumidora do Brasil segundo ABRABE e vem se destacando no cenário nacional como produtora de alto padrão de qualidade.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alegre, R. M., Rigo, M., Joekes, I. Ethanol Fermentation Of A Diluted Molasses Medium By *Saccharomyces Cerevisiae* Immobilized On Chrysotile. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 46, 4, 751-757. 2003

Aquarone, E.; Lima, U. A. & Borzani, W. **Alimentos e Bebidas Produzidos por Fermentação**, Bulcher, 227, São Paulo. 1983.

Aquino, F. W. B., Nascimento, R. F., Rodrigues, S., Casemiro, A. R. S. Determination of Aging Marks In Sugar Cane Spirits. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 26, 1, 145-149. 2006

Aresta, M.; Boscolo, M. & Franco, D. W. Copper. Catalysis In Cyanide Conversion Into Ethyl Carbamate In Spirits and Relevant Reactions. **Journal Agricultural Food Chemical**, 49, 6, 2819-2824. 2001.

Associação Brasileira de Bebidas - **ABRABE**. Disponível em <http://www.abrabe.org.br>. 2005.

Association of Official Analytical Chemists; **Official Methods of Analysis**, Arlington: AOAC, 253-379. <http://www.aoac.org/>. 2007.

Bizelli, L. C., Ribeiro, C. A. F., Novaes, F. V. Dupla destilação da aguardente de cana: teores de acidez total e de cobre. **Scientia Agricola**. 57, 4, 623-627. 2000.

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 Chemical Society**. 11,1, 86-90. 2000.

Boza, Yolanda; Horii, Jorge. Influência da destilação sobre a composição e a qualidade sensorial da aguardente de cana-de-açúcar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 18, 391-396. 1998.

Brasil. Decreto N° 4.062, de 21 de dezembro de 2001. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**, 03 de janeiro de 2002.

Brasil. Decreto N° 4.072, de 21 de dezembro de 2002. Ministério da Agricultura. **Diário Oficial Da União**, 03 janeiro de 2002.

Câmara, M. **Cachaça – Prazer brasileiro**, MAUAD, 144 p., Rio de Janeiro, RJ, 2003.



- Campo, E.; Cacho, J.; Ferreira, V. Solid phase extraction, multidimensional gas chromatography mass spectrometry determination of four novel aroma powerful ethyl esters Assessment of their occurrence and importance in wine and other alcoholic beverages. **Journal of Chromatography A**, 1140, 180-188. 2006.
- Campos, J. O. S., De Aquino, F. W. B., Do Nascimento, R. F., Da Costa, J. G. M., De Keukeleire, D., De Casimiro, A. R. S. Influence and effect of thermal treatment in elaboration of regional wood extracts for cachaça. **Journal of Food Composition And Analysis**. 17, 179–185. 2004.
- Cardello, H. M. A. B., Faria, J. B. Análise descritiva quantitativa da aguardente de cana durante o envelhecimento em tonel de carvalho (*Quercus alba L.*). **Ciência e Tecnologia de Alimento**. 18, 2, 169-175. 1998.
- Cardoso, D. R., Lima Neto, B. Dos S., Franco, D. W., Do Nascimento, R. F. Influência do material do destilador na composição química das aguardentes de cana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 20, 3, 279-284. 2000.
- Cardoso, D. R., Neto, B. dos S. L., Franco, D. W., Nascimento, R. F. Influence of the pot still material on the chemical composition of brazilian sugar cane spirit. **Química Nova**. 26, 2, 165-169. 2003.
- Casalone, E.; Fia, G.; Barberio, C.; Cavalieri, D.; Turbanti, L.; Polsinelli, M. Genetic and biochemical characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to trifluoroleucine. **Res. Microbiol.**, 148, 613– 623. 1997.
- Cavalieri, D.; McGovern, P. E.; Hartl, D. L.; Mortimer, R. & Polsinelli, M. Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. **Journal of Molecular Evolution**, 57, S226–S232. 2003.
- Cerdán, T. G.; Mozaz, S. R. & Azpilicueta, C. A. Volatile composition of aged wine in used barrels of french oak and of american oak. **Food Research International**, 35, 603-610. 2002.
- Chaves, J. B. P. Cachaça: produção artesanal de qualidade. Viçosa: CPT, 78 p. **Manual Técnico**. 1998.
- Chung, Y.C.; Li Y.H. & Chen, C.C. Pollutant removal from aquaculture wastewater using the biopolymer chitosan at different molecular weights. **J Hazard Mater**, 125(1-3):201-4. 2005.
- CN1073718**. Nantong Institute of Aquatic Science. Method of separating from glutamic acid fermented liquor. 1993.
- CN606931**. Zhang Ruicheng. Modified wild almond beverage for relieving or neutralizing the effect of alcohol. 2005.

De Andrade-Sobrinho, L. G., Boscolo, M., Lima-Neto, B. S., & Franco, D. W. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa). **Química Nova**. 25, 6b, 1074-1077. 2002.

De Casimiro, A. R. S., Da Costa, R. S., Santosa, S. R. B., Almeida, L. F., Nascimento, E. C. L., Pontesa, M. J. C., Lima, R. A. C., Simões, S. S., Araújo, M. C. U. A novel strategy to verification of adulteration in alcoholic beverages based on schlieren effect measurements and chemometric techniques. **Microchemical Journal**. 78, 27–33. 2004.

Dietler, M.; Hayden, B. Feasts: Archaeological and Ethnographic Perspectives on Food, Politics, and Power (**Smithsonian Institution, Washington, DC**). 2001.

Domizio, P.; Lencioni, L.; Ciani, M.; Di Blasi, S.; Pontremolesi, C. & Sabatelli, M. P. Spontaneous and inoculated yeast populations dynamics and their effect on organoleptic characters of Vinsanto wine under different process conditions. **International Journal of Food Microbiology**, 115, 281-289, 2007.

Eksteen, J. M., Van Rensburg, P., Cordero Otero, R. R., Pretorius, I. S. Starch fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing the alpha-amylase and glucoamylase genes from *lipomyces kononenkoae* and *saccharomycopsis fibuligera*. **Biotechnol Bioeng**. 84, 6, 639-46. 2003.

Erten, H. Relations between elevated temperatures and fermentation behaviour of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 18, 373–379. 2002.

Faria, J. B. A., **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de São Paulo, Brasil, 1989.

Faria, J. B., Cardello, H. M. A. B., Boscolo, M., Isique, W. D., Odello, L., Franco, D. W. Evaluation of brazilian woods as an alternative to oak for cachaça aging. **European Food Research and Technology**. 218, 1, 83-87. 2003.

**FR2599048**. Cesarin E.; Pifferi, P. Méthode de traitement pour liquides alimentaires d'origine b. Vétégale en vue de les stabiliser, notamment en ce qui concerne leur couleur. 1987.

Fujita, M.; Ike M.; Jang, J.H.; Kim, S.M. & Hirao, T. Bioflocculation production from lower-molecular fatty acids as a novel strategy for utilization of sludge digestion liquor. **J. AOAC Int.** ,84(5):1475-83, 2001.

Gao, C. & Fleet, G.H. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. **Journal of Applied Bacteriology**, 65, 405–410, 1988.

Guerra, J. B.; Araújo R. A. C.; Pataro, C.; Franco, G. R.; Moreira, E. S. A.; Mendonça-Hagler, L. C. & Rosa, C. A. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. **Letters in Applied Microbiology**, 33, 106-111, 2001.

Hansen, E.H.; Nissen, P.; Sommer, P.; Nielsen, J.C.; Arneborg, N. The effect of oxygen on the survival of non-Saccharomyces yeasts during mixed culture fermentation of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Microbiology**, 91, 541–547. 2001.

Heard, G.M. & Fleet, G.H. The effects of temperature and pH on the growth of yeasts during the fermentation of grape juice. **Journal of Applied Bacteriology**, 65, 23–28. 1988.

Huang, H. T. Science and Civilisation in China, ed. Needham, J., **Cambridge Univ. Press**, Cambridge, U.K., Vol. 6, pp. 151–153, 155–203, 232, 240–242, 247–248, and 258–282. 2000.

Ichikawa, E.; Hosokawa, N.; Hata, Y.; Abe, Y.; Suginami, K.; Imayasu, S. Breeding of sake yeast with improved ethyl caproate productivity. **Agric. Biol. Chem.** 55, 2153–2154, 1991.

Isique, W. D.; Cardello, H. M. A. B.; Faria, J. B. Teores de enxofre e aceitabilidade de aguardentes de cana brasileiras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 18, 3, 356-359. 1998.

**JP 2004051615 A.** Snowden CO LTD. Bile acids adsorbent using chitosan-ototic acid salt. 2002.

**JP 59179034 A.** Advance Res. & Dev. CO LTD. Agent for removing mutagenic substance from coffee extract liquid and filter made there of chitosan. 1983.

**JP2003289837.** Japan Maize Prod. Beverage and method for production the same. 2003.

**JP2005137264.** Otsuka Shoruhin KK. Method for purifying alcoholic liquor. 2005.

**JP60094081 A.** Advance Res. & Dev. CO LTD. Agent for removing mutagenic substance from alcoholic drink. 1983.

Kaosowski, G.; Czuprynski, B. Kinetics of acetals and esters formation during alcoholic fermentation of various starchy raw materials with application of yeasts *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Food Eng.** 72, 242–246. 2006.

**KR2003010293.** Anthrobiotech CO. LTD. Beverage containing high molecular weight of aqueous chitosan. 2003.

Küchler, I. L. & Silva, F. A. M. Potentiometric method for copper determination in sugarcane spirit. **Química Nova**. 22, 3, 339-349. 1999.

Labanca, R. A., Glória, M. B. A., Gouveia, V. P. J., Afonso, R. J. De C. F. Determination of copper and alcohol contents in sugar cane spirits produced in the State of Minas Gerais, Brazil. **Química Nova**. 29, 5, 1110-1113. 2006.

Lilly, M., Lambrechts, M. G. And Pretorius, I. S. Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. **Applied and Environmental Microbiology**. 66, 2, 744-753. 2000.

Lima, A. De J. B.; Cardoso, M. Das G.; Guerreiro, M. C. & Pimentel, F. A. Using activated carbon to remove copper from sugar cane spirit. **Química Nova**, 29, 2, 247-250. 2006.

Mason, A.B., Dufour, J.P., Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. **Yeast** 16, 1287-1298, 2000.

McGovern, P. E.; Zhang, J.; Tang, J.; Zhang, Z.; Hall, G. R.; Moreau, R. A.; Nuñez, A.; Butrym, E. D.; Richards, M. P.; Wang, C. S.; Cheng, G.; Zhao, Z. & Wang, C. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. **PNAS**, 101, 51, 17593-17598. 2004.

Nascimento, R. F., Cardoso, D. R., Lima Neto, B. Influência do material do alambique na composição química das aguardentes de cana-de-açúcar . **Química Nova**. 26, 9, 735-739. 1998.

Oba, T.; Nomiya, S.; Hirakawa, H.; Tashiro, K. & Kuhara, S. Asp578 in Leu4p is one of the key residues for leucine feedback inhibition release in sake yeast. **Biosci. Biotechnol. Biochem**. 69, 1270-1273. 2005.

Oliveira, S. G. De & Magalhães, M. A. Procedimentos para produção da cachaça artesanal de Minas regulamentados pelo decreto nº 42.644 de 05/06/2002. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 78-83, 2002.

Oshita, D., De Oliveira, A. P., Gomes Neto, J. A., De Moraes, M. Determinação direta e simultânea de Al, As, Fe, Mn e Ni em cachaça por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. **Ecletica Química**. 28, 1, 91-96. 2003.

Pataro, C., Guerra, J. B., Gomes, F. C. O., Neves, M. J., Pimentel, P. F., Rosa, C. A. Trehalose accumulation, invertase activity and physiological characteristics of yeasts isolated from 24 h

fermentative cycles during the production of artisanal brazilian *cachaça*. **Brazilian Journal of Microbiology**. 33, 202-208. 2002.

**PI0204379 3**. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Processo de obtenção de membranas de quitosana com tamanhos de poros controlados. 2000.

**PI9801361-0**. Polymar Industria, Comércio e Exportação LTDA. Sistema de bioreator com membranas semipermeáveis de quitosana equipado com processo de extração contínua. 2000.

Piggott, J. R.; Hunter, E. A. & Margomenou, L. Comparison of methods of analysis of time-intensity data: application to scotch malt whisky. **Food Chemistry**. 71, 319-326, 2007.

Pradhan S.; Shukla S.S. & Dorris K.L. Removal of nickel from aqueous solutions using crab shells. **J Hazard Mater.**,125(1-3):201-4. 2005.

Rank, M., Gram, J., Nielsen, K. S., Danielsson, B. On line monitoring of ethanol, acetaldehyde and glycerol during industrial fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology And Biotechnology**. 42, 6, 813-817. 1995.

**RU2238002**. Evdokimov, I. A.; Vasilisin, V.; Alieva, L.R. Volodin, D.N. Method for producing of beverage from whey. 2004.

Schwan, R. F.; Mendonça, A. T.; Da Silva Junior, J. J.; Rodrigues, V. E. & Wheals, A. E. Microbiology and physiology of *cachaça* (*aguardente*) Fermentations. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 79, 89–96. 2001.

Underhill, A. P. *Craft Production and Social Change in Northern China*. **Kluwer**, New York, 2002.

**US4285819**. California Institute of Technology. Functional magnetic microspheres. 1981.

**US4775650**. Louisiana State University. Decontamination of contaminated streams. 1988.

**US4992180**. Shin-Etsu Chemical LTD. Method of separating a heavy metal ion using chitosan. 1991.

**US5433865**. Laurent, E.L. Method for treating cattle, fish, and poultry processing waste streams by sequential addition of natural flocculants chitosan. 1995.

**US5433865**. Laurent. E.L. Method for treating process waste streams by use of natural flocculants. 1995.

**US6482456.** Suntory Limited. Method for producing low acid beverage by adding at least one of chitosan, chitosan oligosaccharide and glucosamine. 2002.

**US6786336.** University of Illinois. Treating aqueous systems, including wastewater and aqueous waste streams, by removing undesired heavy metals. 2004.

Vallee, B. L. **Sci. Am.** 278 (6), 80–85. 1998.

Vaselchi, O. Aguardente de Cana-de-Açúcar, **Agronômica Ceres**, 116, São Paulo, 1960.

Verstrepen, K.J.; Van Laere, S.D.M.; Vanderhaegen, B.M.P.; Derdelinckx, G.; Dufour, J.-P.; Pretorius, I.S.; Winderickx, J.; Thevelein, J.M.; Delvaux, F.R. Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters. **Appl. Environ. Microbiol.** 69, 5228– 5237, 2003.

Vicente, M. A.; L. G.; Castro, L. M.; Santos, A. N. G.; Coutrim, M. X. & Brandão, R. L. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains producing higher levels of flavoring compounds for production of “cachaça” the Brazilian sugarcane spirit. **International Journal of Food Microbiology**, 108, 51 – 59. 2006.

Wen Y.Z.; Liu W.Q.; Fang Z.H. & Liu W.P. Effects of adsorption interferents on removal of Reactive Red 195 dye in wastewater by chitosan. **J. Environ. Sci.**,17(5):766-9, 2005.

Yokoya, F. Fabricação de aguardente de cana-de-açúcar. **Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologias André Toselts**, 92, Campinas. 1995.

Yoshikawa, K. Sake: production and flavor. **Food Rev. Int.** 15, 83– 107. 1999.

Yoshimoto, H., Fukushige, T., Yonezawa, T., Sone, H. Genetic and physiological analysis of branched-chain alcohols and isoamyl acetate production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 59, 501–508. 2002.

## **6. ANEXOS**

**Trabalhos realizados em colaboração durante o curso de doutorado e  
que não fazem parte do corpo e discussão da tese**

## Pro domain peptide of HGCP-Iv cysteine proteinase inhibits nematode cysteine proteinases

Francine B. Silva<sup>1,3</sup>, João A.N. Batista<sup>3</sup>, Brenner M. Marra<sup>2,3</sup>,  
Rodrigo R. Fragoso<sup>1,3</sup>, Ana Carolina S. Monteiro<sup>4</sup>,  
Edson L.Z. Figueira<sup>2,3</sup> and Maria Fátima Grossi-de-Sá<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília,  
Brasília, DF, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil

<sup>3</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil

<sup>4</sup>Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho,  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Corresponding author: M.F. Grossi-de-Sá

E-mail: fatimasa@cenargen.embrapa.br

Genet. Mol. Res. 3 (3): 342-355 (2004)

Received March 10, 2004

Accepted June 29, 2004

Published September 2, 2004

**ABSTRACT.** Cysteine proteinases (CPs) are synthesized as zymogens and converted to mature proteinase forms by proteolytic cleavage and release of their pro domain peptides. A cDNA encoding a papain-like CP, called *hgcp-Iv*, was isolated from a *Heterodera glycines* J2 cDNA library, expressed and utilized to assess the ability of its propeptide to inhibit proteinase in its active form. The *hgcp-Iv* cDNA sequence encodes a polypeptide of 374 amino acids with the same domain organization as other cathepsin L-like CPs, including a hydrophobic signal sequence and a pro domain region. HGCP-Iv, produced in *Escherichia coli* as a fusion protein with thioredoxin, degrades the synthetic peptide benzyloxycarbonyl-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin and is inhibited by E-64, a substrate and inhibitor commonly used for functional characterization of CPs. Recombinant propeptides of HGCP-Iv, expressed in *E. coli*, presented high inhibitory activity *in vitro* towards its cognate enzyme and proteinase activity of *Meloidogyne incognita* females,



available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)journal homepage: [www.elsevier.com/locate/peptides](http://www.elsevier.com/locate/peptides)

## Proregion of *Acanthoscelides obtectus* cysteine proteinase: A novel peptide with enhanced selectivity toward endogenous enzymes

F.B. Silva<sup>a,b</sup>, A.C.S. Monteiro<sup>a</sup>, R.P. Del Sarto<sup>a,b</sup>, B.M. Marra<sup>a,b</sup>, S.C. Dias<sup>a,b,c</sup>,  
E.L.Z. Figueira<sup>a</sup>, G.R. Oliveira<sup>a,b</sup>, T.L. Rocha<sup>a</sup>, D.S.L. Souza<sup>b</sup>, M.C.M. da Silva<sup>a</sup>,  
O.L. Franco<sup>c,d</sup>, M.F. Grossi-de-Sa<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF 70770-900, Brazil

<sup>b</sup>Universidade de Brasília, Brasília-DF 70910-900, Brazil

<sup>c</sup>Centro de Análises Proteômicas e Bioquímica, Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, UCB, Brasília-DF 70790-160, Brazil

<sup>d</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 January 2007

Received in revised form

21 March 2007

Accepted 22 March 2007

Published on line 31 March 2007

#### Keywords:

*Acanthoscelides obtectus*

Cysteine proteinase

Propeptide

Plant defense

### ABSTRACT

*Acanthoscelides obtectus* is a devastating storage insect pest capable of causing severe bean crop losses. In order to maintain their own development, insect pest larvae feed continuously, synthesizing efficient digestive enzymes. Among them, cysteine proteinases (CPs) are commonly produced as inactive precursors (procysteines), requiring a cleavage of the peptide proregion to become active. The proregion fits tightly into the active site of procysteines, efficiently preventing their activity. In this report, a CP cDNA (*cpao*) was isolated from *A. obtectus* midgut larvae. *In silico* studies indicated that the complete CP sequence contains a hydrophobic signal peptide, a prodomain and a conserved catalytic region. Moreover, the encoding cDNA contains 963 bp translating into a 321 residue protein, CPAo, which was expressed in *E. coli*, fused with thioredoxin. Enzymatic assays using the recombinant protein revealed that the enzyme was catalytically active, being able to cleave the synthetic substrate Z-Phe-Arg-7-AMC. Additionally, this report also focuses the *cpao* propeptide (PCPAo) subcloning and expression. The expressed propeptide efficiently inhibited CPAo, as well as digestive CP of other bean bruchids. Little or no activity was found against proteolytic enzymes of two other coleopterans: *Rhyzopertha dominica* and *Anthonomus grandis*. The data reported here indicate the possibility of endogenous propeptides as a novel strategy on bruchids control, which could be applicable to bean improvement programs.

© 2007 Published by Elsevier Inc.

### 1. Introduction

Plant tissues are frequently attacked by insect pests and pathogens. This predation process can lead to severe

economic loss [1]. Two species of bruchids, *Acanthoscelides obtectus* and *Zabrotes subfasciatus*, are known to cause intense damage to the common bean grains *Phaseolus vulgaris* [7,21]. The digestion process of bean bruchids is essentially based on

\* Corresponding author. Tel: +55 61 3448 4705; fax: +55 61 3340 3624.

E-mail address: [fatimasa@cenargen.embrapa.br](mailto:fatimasa@cenargen.embrapa.br) (M.F. Grossi-de-Sa).

Abbreviations: AMC, amidomethylcoumarin; CP, cysteine proteinase; CPAo, cysteine proteinase from *Acanthoscelides obtectus*; DTT, dithiotreitol; DMSO, dimethyl sulfoxide; E-64, trans-epoxysuccinyl-L-leucylamide-(4-guanidino)butane; PCPAo, propeptide of cysteine proteinase from *A. obtectus*

0196-9781/\$ – see front matter © 2007 Published by Elsevier Inc.

doi:10.1016/j.peptides.2007.03.020

# Protective effects of cysteine proteinase propeptide expressed in transgenic soybean roots

Brener M. Marra,<sup>1, 2</sup> Djair S.L. Souza,<sup>1,2</sup> Octavio L. Franco,<sup>1,4</sup> João N. Aguiar,<sup>1</sup> Francine B. Silva,<sup>1</sup> Charles D.S. Almeida,<sup>1</sup> Juvenil E. Cares,<sup>3</sup> Marise V. Continho,<sup>1</sup> Silva, M.C.M.,<sup>1</sup> Cezar Martins-de-Sa,<sup>2</sup> Maria F. Grossi-de-Sa<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, DF, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, DF, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, DF, Brazil.

<sup>4</sup>Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, UCB, DF, Brazil

## Abstract

The sedentary endoparasitic nematodes cause extensive damage to a large number of ornamental and food crops with an economically loss estimated to be in excess of US \$ 100 billion worldwide. Efforts to eliminate or minimize damage caused by nematodes have typically involved the use of nematicides, in which their costs and toxicity to humans and the environment make them unsafe as a control measure. Different methodologies aimed towards the development of resistant plants with improved nematode resistance include strategies such as anti-invasion and migration, feeding-cell attenuation and antinematode feeding. The question addressed in the present study involves the evaluation of the potential use of the cysteine proteinase propeptide as an alternative control strategy by using transgenic.. The cysteine proteinase prodomain, isolated from *Heterodera glycines* (HGCP prodomain), which is a natural inhibitor peptide, was used to transform soybean cotyledons by using *Agrobacterium rhizogenes*. Genetic modified soybean roots expressing the propeptide were detected by Western-blot and expression levels were measured by ELISA (around 0.3%). Each transgenic root expressing the propeptide was inoculated with a thousand of *H. glycines* at second juveniles stage and a remarkable reduction in the number of females and eggs were observed. Moreover, a reduction of female length and diameter was observed after 35 days post inoculation. Furthermore, the *H. glycines* mature protein was detected in female that fed on soybean transformed root expressing or not the propeptide. This data suggests that the HGCP propeptide can reduce soybean cyst nematode infection and possibly could be used, in a near future, to generate resistant cultivars.

**Keyword:** nematode, cysteine proteinase, propeptide, transgenic plants, *Heterodera glycines*,

## Identification of a novel $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase (Pcb-NAHA1) from marine Zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa, Zoanthidea)

Djair S.L. Souza <sup>a,b,c</sup>, Maria F. Grossi-de-Sa <sup>a,d,\*</sup>, Luciano P. Silva <sup>a</sup>, Octavio L. Franco <sup>d</sup>, José E. Gomes-Junior <sup>a,b</sup>, Gustavo R. Oliveira <sup>a,c</sup>, Thales L. Rocha <sup>a</sup>, Cláudio P. Magalhães <sup>a</sup>, Brenner M. Marra <sup>a,b</sup>, Maira Grossi-de-Sa <sup>a</sup>, Eduardo Romano <sup>a</sup>, César Martins de Sá <sup>b</sup>, Erich Kombrink <sup>f</sup>, Arnubio V. Jiménez <sup>a,b,g</sup>, Luiz R.D. Abreu <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB-Final W5 Norte-Cp02372, Brasília, DF, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, DF, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica, UFRN, Rio Grande do Norte, Brazil

<sup>d</sup> Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, UCB, DF, Brazil

<sup>e</sup> Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, UFRGS, RS, Brazil

<sup>f</sup> Department of Plant-Microbe Interaction, Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Carl-von-Linné-Weg 10, 50829 Cologne, Germany

<sup>g</sup> Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Manizales, Calle 65#26-10, Colombia

Received 7 October 2007, and in revised form 28 October 2007

Available online 7 November 2007

### Abstract

$\beta$ -*N*-Acetylhexosaminidases (EC 3.2.1.52) belong to an enzyme family that hydrolyzes terminal  $\beta$ -*D*-*N*-glucosamine and  $\beta$ -*D*-*N*-galactosamine residues from oligosaccharides. In this report, we purified a novel  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase (Pcb-NAHA1) from the marine zoanthid *Palythoa caribaeorum* by applying ammonium sulfate fractionation, affinity chromatography on a chitin column, followed by two rounds of size exclusion chromatography. SDS-PAGE analysis indicated a single band protein of apparent homogeneity with a molecular mass of 25 kDa. The purified enzyme preferentially hydrolyzed *p*-nitrophenyl-2-acetoamide-2-deoxyamide-2-deoxy- $\beta$ -*D*-*N*-acetylglucosamide (pNP-GlcNAc) and to a lesser extent *p*-nitrophenyl-2-acetoamide-2-deoxyamide-2-deoxy- $\beta$ -*D*-*N*-acetylgalactosamide (pNP-GalNAc). Detailed kinetic analysis using pNP-GlcNAc resulted in a specific activity of 57.9 U/mg, a  $K_m$  value of 0.53 mM and a  $V_{max}$  value of 88.1  $\mu$ mol/h/mg and  $k_{cat}$  value of 0.61  $s^{-1}$ . Furthermore, purified Pcb-NAHA1 enzyme activity was decreased by HgCl<sub>2</sub> or maltose and stimulated in the presence of Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>, BaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, chondroitin 6-sulfate, and phenylmethylsulfonyl fluoride. The optimum activity of Pcb-NAHA1 was observed at pH 5.0 and elevated temperatures (45–60 °C). Direct sequencing of proteolytic fragments generated from Pcb-NAHA1 revealed remarkable similarities to plant chitinases, which belong to family 18, although no chitinase activity was detected with Pcb-NAHA1. We conclude that  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidases, representing a type of exochitinolytic activity, and endo-chitinases share common functional domains and/or may have evolved from a common ancestor.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:**  $\beta$ -*N*-Acetylhexosaminidase; *Palythoa caribaeorum*; Chitin-active-enzymes; Inactivated chitinases

$\beta$ -*N*-Acetylhexosaminidases<sup>1</sup> (EC 3.2.1.52) are enzymes involved in the degradation of O-glycosides by catalyzing

\* Corresponding author. Address: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB-Final W5 Norte-Cp02372, Brasília, DF, Brazil. Fax: +55 61 3340 3658.

E-mail address: [fatimasa@cenargen.embrapa.br](mailto:fatimasa@cenargen.embrapa.br) (M.F. Grossi-de-Sa).

URL: <http://www.cenargen.embrapa.br/laboratorios/LIMPP/index.htm> (M.F. Grossi-de-Sa).

<sup>1</sup> Abbreviations used: Pcb-NAHA1, *Palythoa caribaeorum*  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase 1; pNP-GlcNAc, *p*-nitrophenyl-2-acetoamide-2-deoxyamide-2-deoxy- $\beta$ -*D*-*N*-acetylglucosamide; pNP-GalNAc, *p*-nitrophenyl-2-acetoamide-2-deoxyamide-2-deoxy- $\beta$ -*D*-*N*-acetylgalactosamide.