



**SELEÇÃO DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* PARA A PRODUÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA DE JABUTICABA (*Myrciaria jaboticaba*)**

**ARAMÁLIA KARAM AMARAL**

**2004**

58353

049844

ARAMÁLIA KARAM AMARAL

**SELEÇÃO DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* PARA A  
PRODUÇÃO DA BEBIDA FERMENTADA  
DE JABUTICABA (*Myrciaria jaboticaba*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Lavras como parte das exigências do  
Programa de Pós-graduação em Microbiologia  
Agrícola para a obtenção do título de "Mestre".

Orientadora

Profa. Rosane Freitas Schwan

DESCARTADO

  
ASSINATURA

Data

14, 7, 17

BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA  
UFLA

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2004



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

Amaral, Aramália Karam

Seleção de cepas *Saccharomyces cerevisiae* para a produção da bebida fermentada de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) / Aramália Karam  
Amaral -- Lavras : UFLA, 2004.

128 p.: il.

Orientador: Rosane Freitas Schwan.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

- I. Jaboticaba. 2. Fermentação. 3. Bebida. I. Universidade Federal de Lavras.  
II. Título.

CDD-663.63  
-663.33

**ARAMÁLIA KARAM AMARAL**

**SELEÇÃO DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* PARA A  
PRODUÇÃO DA BEBIDA FERMENTADA  
DE JABUTICABA (*Myrciaria jaboticaba*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Lavras como parte das exigências do  
Programa de Pós-graduação em Microbiologia  
Agrícola para a obtenção do título de “Mestre”.

**APROVADA em 26 de fevereiro de 2004**

**Prof. João Batista de Almeida e Silva**

**FAENQUIL**

**Prof. Marcelo Enrique Marcet Sanchez**

**Univ. Matanza/Cuba**



**Profa. Rosane Freitas Schwan  
UFLA  
(Orientador)**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRÁSIL  
2004**

*“O homem se torna muitas vezes o que ele próprio acredita que ele é. Se eu insisto em repetir para mim mesmo que sou incapaz de realizar alguma coisa, é possível que realmente me torne incapaz de fazê-la. Ao contrário, se tenho convicção de que posso fazê-la, certamente adquirirei a capacidade de realizá-la mesmo que não a tenha no começo.”*

*Mahatma Gandhi*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, pela minha saúde, pela minha família, meus amigos e pela capacidade de aprender.

À minha mãe, Helena, que é luz que ilumina meu caminho. Você é e sempre será o dom mais precioso de minha vida, minha amiga, meu anjo protetor. Obrigada por sempre ter acreditado em mim.

A meu pai, José, pelo exemplo de vida e conduta. Sou sua fã número um.

A minha irmã Camila, razão de minha vida, obrigada pela paciência e apoio nos momentos difíceis.

A minhas tias Maria, Elisa e Sandra, extensivo aos esposos, filhos e netos. Amo muito vocês. Obrigado por todo apoio.

Ao meu irmão Quintino, aos sobrinhos Rodrigo e Cristina e à minha sempre amiga Gilma.

Aos amigos da Fazenda, Brumadinho e Betim.

Ao meu querido esposo, Junior, obrigada pelo amor, incentivo e ajuda. Aprendi muito com você.

À minha família baiana, D Creusa, minha sempre mãe e amiga, Eudinho, Mapinha, Paulinha e todos de Guanambi, obrigada pelo carinho.

Aos amigos Viviane e Eliton (Proprietários da Cantina Matiello) e Dona Helena e família, de Santa Tereza, ES, obrigada pelo carinho e amizade.

À orientadora, amiga, mãe e professora Rosane Schwan, obrigada pelos ensinamentos, paciência e confiança em mim depositada.

Aos professores Eustáquio e Romildo, pela amizade, carinho e ensinamentos.

Ao Prof. Disney, pelos ensinamentos e ajuda a mim prestada.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização deste mestrado.

À CAPES, pela bolsa de estudos.

À União Européia, pelo apoio financeiro.

A todo corpo docente e aos funcionários do Departamento de Biologia, em especial a D. Irondina, Rosângela, Rafaela, Elaine, Lamartine, Prof. Evaristo e Prof Magno.

Aos amigos Cris e Luis (Tom e Emanuel), pelo exemplo de vida e profissionalismo. Vocês sempre serão muito importantes em minha vida. Obrigada por todo apoio e incentivo.

A Fernanda, pela amizade e companheirismo. Essa vitória também é sua. Agradeço o apoio de sua família.

À grande amiga Claudinelli, por todo carinho, amizade e apoio.

Aos amigos do Laboratório: Ivanir, Cidinha, Cláudia Eugênia, Claudinha Labory, Claudia Bento, Raquel, Luziane, Evânia, Marisa, Sheila Alexandre, Éderson, Euziclei, Márcio, Pascoal, Mirian, Rogério, Cássia, Silvinha, Celso, Cláudia Formiga, Valdirene, Helson, Victor, Jaíne, Márcia, Luana, Leidiane, Helen, Thaís, Ludimila, Ana Paula, Geórgia, Wasley, João Borges, Débora e Léo

A Magda, pela amizade e paciência.

Ao Sr. Antônio Claret Sales, funcionários e familiares, pela amizade e pela oportunidade de estágio.

À Dona Helena e Sr. José Ferreira e familiares pelo acolhimento e aconchego familiar.

E a todos que, de alguma maneira, contribuíram para essa conquista.

Muito obrigada.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	j
ABSTRACT .....	ii
CAPÍTULO 1: VINHO DE FRUTAS: UMA ALTERNATIVA PARA A FRUTICULTURA BRASILEIRA.....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	4
2.1 Jabuticabeira .....	4
2.2 Processo de vinificação .....	9
2.3 Obtenção dos vinhos brancos.....	16
2.4 Obtenção dos vinhos tintos .....	17
2.5 Processo de fermentação.....	21
2.6 Fermentação espontânea .....	23
2.7 Uso de outras frutas como substrato no processo de vinificação.....	25
2.8 Uso de leveduras selecionadas .....	27
2.9 Crescimento de microrganismos .....	32
2.10 Produtos primários e secundários oriundos da fermentação no processo de vinificação.....	37
2.11 Análise química dos vinhos.....	46
2.12 Conservação do vinho.....	49
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51
CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE CEPAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EM POLPA DE JABUTICABA SABARÁ ( <i>Myrciaria jaboticaba</i> ).....	59
1 RESUMO.....	60
2 ABSTRACT .....	61
3 INTRODUÇÃO.....	62
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	64
4.1 Leveduras utilizadas.....	64
4.2 Coleta das frutas e obtenção do mosto .....	65
4.3 Preparo do inóculo .....	66
4.4 Seleção do meio ideal de cultivo para produção de inóculo (Etapa 1).....	67
4.5 Avaliação do crescimento dos isolados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no meio de cultivo ideal previamente escolhido (Etapa 2).....	68
4.6 Confeção da curva de crescimento dos isolados que apresentaram maiores rendimentos (UFC/ mg de açúcar redutor) (Etapa 3) .....	68
4.7 Análise estatística.....	69



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	70
5.1 Caracterização química da polpa de jaboticaba ( <i>Myrciaria jaboticaba</i> ).....	70
5.2 Seleção do meio ideal de cultivo para produção de inóculo (Etapa 1).....	72
5.3 Avaliação do crescimento dos isolados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no meio de cultivo ideal previamente escolhido (Etapa 2).....	82
5.3 Curva de crescimento dos isolados que apresentaram maiores rendimentos (UFC/ mg de açúcar redutor) (Etapa 3).....	86
6 CONCLUSÕES .....	92
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	93
CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FERMENTATIVA DE ISOLADOS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EM POLPA DE JABUTICABA ( <i>Myrciaria jaboticaba</i> ) E ANÁLISE DA BEBIDA FINAL.....	
1 RESUMO.....	96
2 ABSTRACT .....	97
3 INTRODUÇÃO .....	98
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	99
4.1 Leveduras utilizadas.....	100
4.2 Coleta das frutas e obtenção do mosto .....	100
4.3 Preparo do mosto .....	101
4.4 Inoculação.....	101
4.5 Coleta das amostras.....	101
4.6 Obtenção da bebida.....	102
4.7 Análise da bebida final.....	104
4.8 Análise sensorial da bebida.....	105
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	108
5.1 Avaliação da capacidade fermentativa dos isolados.....	108
5.2 Análises química da bebidas .....	113
5.3 Análise sensorial das bebidas .....	116
6 CONCLUSÕES .....	121
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	122
ANEXOS.....	125

## RESUMO

AMARAL, Aramália Karam. Seleção de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* para produção de bebida fermentada de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*). 2004. 128p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. \*

O estudo para a seleção de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* visando a produção da bebida fermentada de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*), foi dividido em duas fases. Primeiramente selecionou-se o meio de cultivo ideal para o crescimento das cepas, o crescimento de cada cepa individualmente no meio previamente escolhido e a confecção das curvas de crescimento para os isolados que apresentaram melhores rendimentos (UFC/mg açúcar redutor). A segunda fase foi avaliar a capacidade fermentativa das cepas de *S. cerevisiae*, com posterior análise química e sensorial das bebidas produzidas. O experimento foi realizado no Departamento de Biologia, no setor de Microbiologia, da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Os isolados de *S. cerevisiae* utilizados, codificados como CA116, CA1174, CA1183 e CA1162, eram pertencentes à coleção do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos. Os frutos de jaboticaba sabará foram coletadas na Fazenda Bocaina, no município de Brumadinho, MG. Para a avaliação de crescimento celular foi feito o plaqueamento das amostras em meio sintético YW. O consumo de açúcares redutores foi avaliado pelo método de DNS e a aferição do °Brix (teor de sólidos solúveis) foi feita com auxílio de refratômetro digital. Para a fermentação utilizou-se polpa de jaboticaba diluída a 10 °Brix e autoclavada. Resultados obtidos indicaram que a polpa de jaboticaba diluída a 5° Brix e autoclavada por 15 min a 121°C, quando comparada com os meios sintéticos testados (YW e YEPG), apresentou os melhores resultados sendo indicada para a produção do inóculo. Os isolados CA1174, CA1183 e CA1162, obtiveram os maiores rendimentos (UFC/mg de açúcar redutor), sendo avaliados posteriormente quanto à capacidade fermentativa. O tempo de fermentação foi de 5 dias para os isolados CA1183 e CA1174 e 9 dias para o isolado CA1162. A bebida produzida apresentou baixo teor alcoólico, teor de açúcar e acidez. Por cromatografia gasosa (CG), foi detectado concentrações de álcool isoamílico e traços de metanol nas bebidas. A análise sensorial indicou ser a bebida produzida pelo isolado CA1174 a de melhor aceitação, sendo este, portanto, indicado para a fabricação da bebida fermentada de jaboticaba.

---

\* Comitê orientador: Rosane Freitas Schwan – UFLA (Orientadora), Disney Ribeiro Dias - UNILAVRAS

## ABSTRACT

AMARAL, Aramália Karam. Selection of strains of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of fermented jaboticaba beverage (*Myrciaria jaboticaba*). 2004. 128 p. Dissertation (Master in Agricultural Microbiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG \*

The study for the selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains aiming at the production of the fermented jaboticaba beverage (*Myrciaria jaboticaba*) was divided into two phases. First, it was selected the optimum culture medium for strains growth and then evaluated the growth of each strain in the previously chosen medium and the of growth curves of the isolates which presented the best yields (CFU/mg of reducing sugar). The second phase was to evaluate the fermentative capacity of the *Saccharomyces cerevisiae* strains with posterior chemical and sensorial analysis of the beverages produced. All the experiments were undertaken in the Biology Department in the Microbiology sector of the Federal University of Lavras (UFLA). The isolates of *S. cerevisiae*, codified as CA 116, CA 1174, CA 1183 and CA 1162, belonged to the collection of the Microbial Physiology Laboratory (UFLA). The Sabará jaboticaba fruits were collected at the Bocaina Farm in the town of Brumadinho, MG. It was evaluated the cellular growth by plating of the samples in the YW synthetic medium. Consumption of reducing sugars was assessed through the DNS method (Miller, 1959), gauging of °Brix (soluble solids content) was done with the aid of digital refractometer. For fermentation process, jaboticaba pulp diluted at 10 °Brix and autoclaved was utilized. In the final beverage, alcohol content, total and volatile acidity, tannin and pectin content were evaluated. Results obtained indicated that the jaboticaba diluted at 5° Brix and autoclaved for 15 minutes at 121 °C as compared with the synthetic media tested (YW and YEPG) presented the best results, so it was indicated for the production of the inoculum. The isolates CA1174, CA1183 and CA1162 reached the highest yields (CFU/mg of reducing sugar), and they were evaluated afterwards in relation to their fermentative ability. The fermentation time was of 5 days for the isolates CA1183 and CA1174 and 9 days for the isolate CA1162. The beverage produced presented a low alcohol content, sugar content and acidity. The Gas Chromatography analysis indicated high concentrations of isoamilic alcohol and traces elements of methanol in the final beverages. The sensorial analysis indicated the isolate CA1174 produced beverage with high score of acceptance, and therefore, indicated for the manufacture of the fermented jaboticaba beverage.

---

\* Guidance Committee: Rosane Freitas Schwan – UFLA (Adviser), Disney Ribeiro Dias – UNILAVRAS

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O vinho é uma bebida alcoólica, resultante da fermentação de uvas frescas, sãs e maduras, por intermédio de microrganismos chamados de leveduras, as quais transformam o açúcar em álcool e numa série de elementos secundários em quantidades variadas, de modo que o produto adquira características próprias que o identificam como uma das bebidas mais requisitadas (Rosier, 1995).

A história da produção de vinho acompanha a história da civilização. Acredita-se que o vinho já era fabricado, no Cáucaso e na Mesopotâmia, há 8 mil anos e há cerca de 4 mil anos na Grécia. Os conquistadores romanos aprovaram a bebida e aprenderam a receita. Por volta de 3 mil anos atrás, o vinho já era consumido na Itália, França, Espanha, em Portugal e Norte da África (Panek, 2003).

O Brasil é um grande produtor de frutas para consumo “in natura”, entretanto, devido a problemas de processamento pós-colheita, a maior parte destas frutas é desperdiçada gerando prejuízos para o produtor. Uma das maneiras viáveis de diminuir o desperdício e acrescentar renda para o produtor é a comercialização das frutas transformadas em produtos industrializados como geléias, sucos e vinhos. Com estas possibilidades, aumenta o interesse pela elaboração de projetos de pesquisa que visem testar a eficiência de microrganismos na fermentação da bebida, usando diferentes polpas de frutas como substrato, bem como a sua análise final para posterior lançamento no mercado. Frutas que não possuem qualidade para serem comercializadas *in natura* e que, na maioria das vezes, são descartadas, poderiam ser aproveitadas para a fabricação de bebidas fermentadas.

As jabuticabeiras são originárias do Brasil e apresentam dispersões naturais, sendo comumente encontradas nos quintais de casas, sítios e fazendas,

apresentando tipos diferentes de plantas e de frutos em muitas regiões. Seu fruto é do tipo baga, redonda ou arredondada, com polpa esbranquiçada, doce, envolvendo de 1 a 4 sementes. As jabuticabeiras frutificam uma duas vezes por ano, sendo que a jabuticaba sabará pode produzir até três colheitas anuais. A produção é altamente variável, podendo oscilar de 50 a 200 kg/planta (Soares et al., 2001).

O vinho de jabuticaba tem sido fabricação de modo extremamente caseiro e empírico. O processo fermentativo é oriundo da fermentação espontânea com microrganismos contaminantes, por meio de adaptações do processo de fabricação de vinhos de uva. Até o presente ainda não se tem conhecimento do registro de vinhos de jabuticaba que tenham controle durante a sua elaboração. Uma definição tanto de cepas de leveduras apropriadas para a fermentação quanto do processo seria de extrema importância para evitar desperdícios da fruta, gerar lucros e valorizar a fruticultura do nosso país, além de preservar a espécie.

O estudo em questão teve como objetivo a seleção de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* para a obtenção da bebida fermentada de jabuticaba, com base nas características fisiológicas e capacidade fermentativa em polpa de jabuticaba, bem como a análise química e sensorial da bebida obtida.

## REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Jabuticabeira

A jabuticaba é conhecida pelos povos civilizados há mais de quatro séculos. Fruta nativa, foi chamada pelos Tupis de *lapoti'kaba*, que quer dizer “fruta em botão”, numa referência à sua forma arredondada. Os indígenas saboreavam-na in natura, além de preparar uma bebida fermentada. Segundo Soares et al. (2001), a sua floração e, conseqüentemente, sua frutificação, muitas vezes, saem da raiz, continuando pelo tronco, galhos e ramos, o que lhe confere beleza e utilidade.

A jabuticabeira é uma espécie originada do centro sul do Brasil, apresentando tipos diferentes de plantas e de frutos em muitas regiões. Ela é cultivada do extremo sul ao extremo norte do Brasil, praticamente em todos os estados, havendo plantas em produção desde o estado do Rio Grande do Sul até o estado do Amapá (Manica, 2000).

Pertencente à família *Myrtaceae* e gênero *Myrciaria*, são conhecidas apenas cinco espécies de jabuticabeira: *Myrciaria peruviana* var *trunciflora* (Berg) Mattos (jabuticaba de cabinho), *Myrciaria cauliflora* (DC.) Berg. (jabuticaba paulista), *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg. (jabuticaba sabará), *Myrciaria spirito-santensis* Mattos e *Myrciaria aureana* Mattos (jabuticaba branca) (Soares et al., 2001). A árvore é de porte médio, com um belo formato e muito vistosa, apresentando grande tendência em formar galhos. Estes iniciam a formação no tronco da planta, chegando, em certas variedades, a constituir uma copa densa e fechada, o que pode dificultar muito a colheita (Figura 1) (Manica, 2000).

Os frutos, que são produzidos em pequenos cachos, ao longo do tronco, possuem diâmetro de 1 a 4 cm, casca grossa, que se torna fina e de coloração negra quando os frutos estão maduros (Figura 2). A polpa é branca, de sabor

subácido e cada fruto possui de uma a quatro sementes (Andersen & Andersen, 1988). As tabelas 1 e 2 apresentam a composição da polpa de 100g de *Myrciaria cauliflora* (Vell) Berg e de *Myrciaria jaboticaba*, conhecida popularmente como jaboticaba sabará; e *Myrciaria cauliflora* (Mart) Berg., denominada jaboticaba açu ou paulista (Mattos, 1983).

TABELA 1 Composição da polpa de 100g de frutos de *Myrciaria cauliflora*

Características	Quantidade
Proteína	1,0 g
Cálcio	13 mg
Fósforo	14 mg
Ferro	1,9 mg
Vitamina B <sub>1</sub>	0,06 mg
Vitamina B <sub>2</sub>	0,16 mg
Vitamina C	12 mg
Calorias	43 Kcal

Fonte: Jaboticaba (1990)

TABELA 2 Composição da polpa de 100g de frutos de *Myrciaria jaboticaba*

Características	Quantidade
Sólidos solúveis	14 g
Acidez total (como ácidos cítrico)	1,241 g
Relação sólidos solúveis/acidez	11,28 g
Açúcares totais	10,87 g
Açúcares redutores	9,40 g
Açúcares não redutores	1,47 g
Vitamina C	117,50 mg

Fonte: Manica, 2000

O fruto da jabuticabeira apresenta potencial de mercado tanto para consumo *in natura* como para industrialização, sendo sua comercialização prejudicada por sua perecibilidade (Mendonça, 2000). Segundo Manica (2000), tudo que se pode fazer com a uva, pode-se da mesma forma fazer com a jabuticaba, que fornece ao consumidor produtos de qualidade, como: aguardente, compota, geléia, jeripoga (espécie de vinho artificial, de mais fácil preparo), licor, suco, xaropes (para preparo de sorvetes ou refrescos), vinagre e vinhos. A jabuticaba também é utilizada na fabricação de um extrato que serve como corante de vinho e vinagres, substituindo flores de sabugueiro, malva e papoulas, que são importadas.





FIGURA 1 Árvores de *Myrciaria cauliflora* (jaboticaba Sabará), na Fazenda Bocaina, Brumadinho, MG. A- Área de coleta das frutas; B- Detalhe das árvores de *Myrciaria cauliflora*

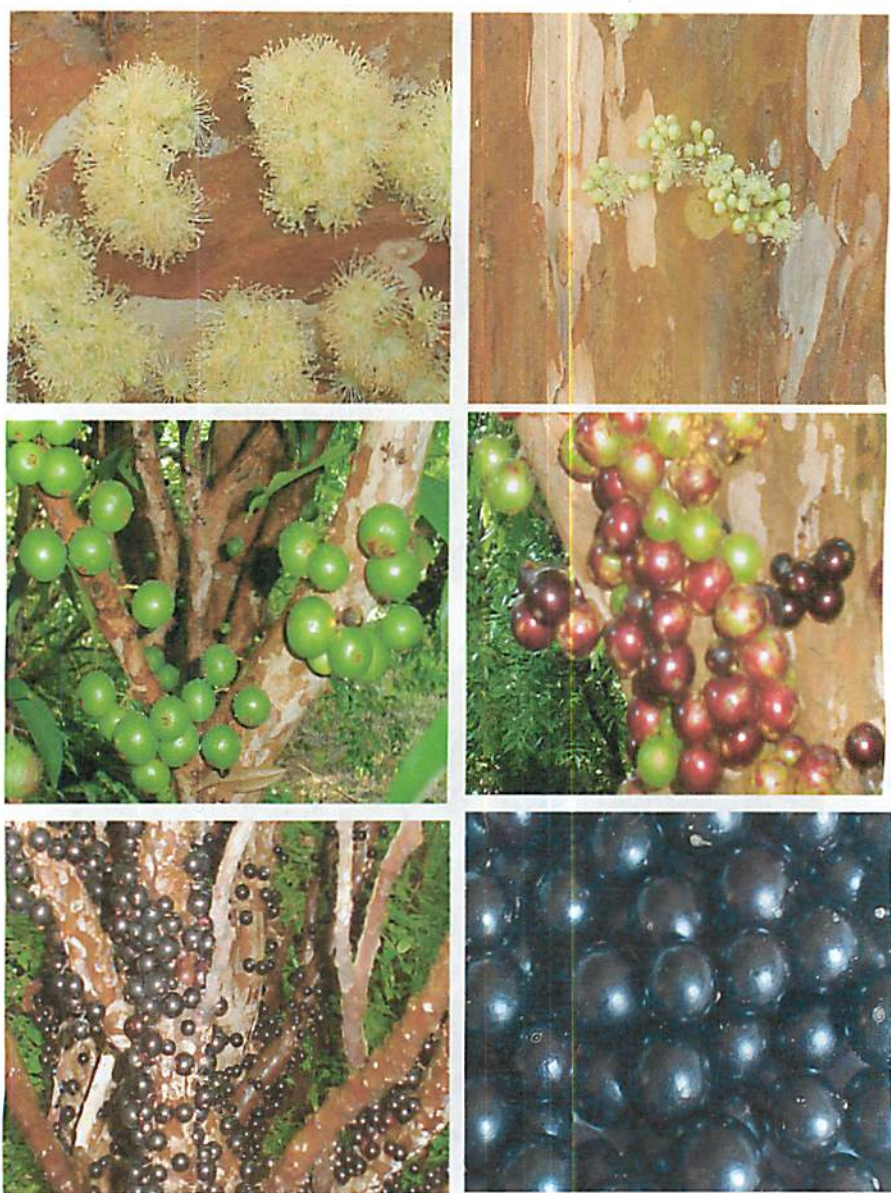


FIGURA 2 Detalhes do desenvolvimento de frutos de jaboticaba *Myrciaria cauliflora* (jaboticaba Sabará) desde o botão floral até a maturação.

## 2.2 Processo de vinificação

O processo de vinificação tem sua origem na antiguidade. Os estudos científicos sobre o processo começaram com Louis Pasteur, que demonstrou que os vinhos eram produzidos pela fermentação alcoólica do suco de uva pelas leveduras (Fleet, 1997). Por vinificação entende-se aplicação de um conjunto de técnicas e operações conhecidas com o objetivo de se obter o vinho por meio da fermentação controlada do mosto de uva (Rosier, 1995).

As principais operações envolvidas no processo de vinificação (em branco e tinto) estão listadas a seguir.

### *Pisa ou esmagamento:*

O esmagamento tem por finalidade dilacerar as bagas para melhor extração do suco, sem, no entanto, provocar o esmagamento de sementes e engaços também objetiva permitir uma boa dissolução de matérias corantes e de taninos contidas na casca dilacerada (vinificação em tinto) e provocar intensa aeração do mosto antes do início da fermentação, para formar o meio bastante favorável ao desenvolvimento de leveduras (Hashizume, 2001).

### *Desengace*

O desengace proporciona a obtenção de vinhos mais saudáveis e aromáticos e saborosos e consiste na separação do engaço das bagas (Pato, 1982). O engaço pode conferir características indesejáveis ao vinho (Hashizume, 2001), visto que a grande maioria das substâncias adstringentes, que dão aspereza ao vinho, se concentra nestes (Pato, 1982). O ideal é que primeiro separe o engaço e depois esmague as bagas, de modo que seja retirado o mínimo de tanino, o qual é principalmente fornecido pela matéria verde e facilita o processo oxidativo indesejável (Rosier, 1995).

### *Prensagem das uvas*

É uma operação realizada em bagaço não fermentado (vinhos brancos) ou fermentado (vinhos tintos), mas sempre necessária, a fim de efetuar a melhor extração dos componentes da casca, como também para aumentar o rendimento do mosto e do vinho. Com a prensagem moderada obtém-se o vinho de lágrima, de melhor qualidade, rico em aroma e tanino nobre. Com a prensagem mais energética obtém-se o vinho de prensa, que é concentrado em todos os nutrientes, menos em álcool (Hashizume, 2001).

### *Obtenção do mosto*

Mosto é o resultado do esfacelamento da polpa, tendo inicialmente a constituição semelhante à mesma (Pato, 1982).

O mosto de frutas, em geral, é um produto rico em substâncias, sendo assim um meio nutritivo para o desenvolvimento de microrganismos, como fungos e bactérias indesejáveis. Para a produção de vinho de boa qualidade deve-se, portanto, evitar que estes microrganismos invadam o mosto (Pederson, 1971).

O rendimento em mosto é extremamente variável de uma cultivar a outra e para uma mesma cultivar. Aumentos importantes podem ocorrer durante a fase de maturação da uva, principalmente em consequência de precipitações pluviométricas intensas (Rizzon et al., 1999).

Os elementos existentes num vinho se agrupam em três categorias conforme a sua origem: os já existentes no mosto, os formados durante a fermentação e os dissolvidos durante a fermentação. Também há certos produtos que aparecem no mosto ou deixam de existir nos vinhos, por motivo de transformação, evaporação, coagulação e precipitação (Pato, 1982).

O preparo do mosto é operação de importância fundamental. Ele é responsável pelo sucesso da elaboração do vinho. Quando mal preparado, pode

carrear substâncias e resíduos indesejáveis, como bagacilhos, sujeitos a outras transformações e decomposições que afetam a qualidade do vinho, perdendo-se a produção (Moretto et al., 1988).

Duas operações importantes são envolvidas no preparo do mosto, as quais são descritas a seguir.

### *Chaptalização*

A adição de sacarose pode ser aplicada para aumentar a concentração dos açúcares fermentescíveis do mosto (Hashizume, 2001). Segundo Rizzon et al. (1986), não devem ser utilizados açúcar mascavo, álcool de cana ou graspa, pois estas substâncias prejudicam a qualidade do vinho.

De acordo com Hashizume (2001), deve-se adicionar 17 g de açúcar por litro de polpa ou suco de fruta, para aumentar 1°GL na produção de álcool etílico, quando a vinificação é efetuada à baixa temperatura. Como na vinificação em tinto a temperatura de vinificação é mais alta, deve-se adicionar, na prática, 18 g/L. A dissolução de açúcar deve ser efetuada antes da adição ao mosto, pois, se adicionado diretamente no mosto, a sua solubilização é mais difícil, favorecendo o depósito de parte no fundo do recipiente (Hashizume, 2001).

Segundo Corraza et al. (2001), 2 graus Brix produzem, aproximadamente, 1 °GL após a fermentação.

Segundo Brasil (1997), a quantidade de açúcar adicionada deve ser, no máximo, igual ao teor de açúcar da fruta.

O decréscimo do °Brix no sobrenadante da fermentação é a medida de conversão de glicose em álcool. Os sólidos dissolvidos contribuem para a gravidade específica, sendo que a gravidade decresce quando o açúcar é convertido em álcool e CO<sub>2</sub> (Narendranath et al., 1997).

### ***Sulfitagem***

A utilização de certas substâncias químicas em enologia proporciona melhor domínio ao processo de fermentação e maior segurança de obtenção de bons vinhos. A justificativa para a sulfitagem é que, no mosto, não existem apenas boas leveduras e nem somente leveduras; portanto, existem microrganismos bons e outros nocivos ao processo direcionado de vinificação (Rosier, 1995).

A sulfitação tem por objetivo principal inibir o desenvolvimento de microrganismos contaminantes oriundos da fruta. Entretanto, esse microrganismo não é destruído, permanecendo só em estado latente, o que possibilita a inoculação do mosto com leveduras selecionadas ou desejadas em plena atividade, as quais dominam rapidamente as selvagens (Hashizume, 2001).

Segundo Rizzon et al. (1986), a sulfitagem proporciona a seleção de leveduras de melhor qualidade e que apresentam uma maior capacidade de produção de álcool, evitando que sobre açúcar no vinho após a fermentação. Possui função anti-oxidante, ou seja, é capaz de captar todo o oxigênio do meio onde se encontra ao transformar sulfitos em sulfatos, protegendo as substâncias corantes e aromáticas do vinho (Rosier, 1995) e ação anti-oxidásica, bloqueando a ação de enzimas da podridão dos cachos, não permitindo com isso uma maior turvação do mosto (Rosier, 1995; Rizzon et al., 1986).

Segundo Hashizume (2001), a dose utilizada de SO<sub>2</sub> (3 a 10g/hl de mosto) varia em função da maturação da uva, seu estado sanitário, temperatura, teor de açúcar e acidez.

### ***Remontagem***

Remontagem é o ato de fazer o vinho sair de uma posição estática pela retirada da parte inferior do líquido nos recipientes e sua colocação na parte superior do mesmo (Pato, 1982), para evitar, no caso de vinhos tintos, que a



parte sólida que sobe à superfície pela pressão da fermentação não resseque, facilitando assim o aparecimento de bactérias (Rizzon et al., 1986).

As primeiras remontagens devem ser realizadas durante a fermentação na fase tumultuosa e visam favorecer a multiplicação das leveduras, homogeneizar sua população no meio e quando se tratar de vinhos tintos, favorecer a extração de substâncias corantes (Pato, 1982), uniformizar o teor de açúcar e a temperatura (Hashizume, 2001).

### *Trasfega*

Trasfega é o ato de deslocar o vinho de um recipiente para outro, visando separá-lo das precipitações que, ao término da fermentação, devido ao esgotamento do açúcar e conseqüentemente paralisação da liberação de CO<sub>2</sub>, decantam por ação da gravidade. O depósito recebe o nome de borra e esta é composta de vestígios de casca de uva, pequenas sementes, leveduras, pectinas, mucilagens, terra, ácidos e outras substâncias sólidas que compuseram o mosto (Rosier, 1995).

Segundo Flett (1997), deixar o vinho em contato com a borra por um longo período não é recomendado, pois a autólise das células das leveduras pode afetar o “flavor” do vinho e servir de nutrientes para o crescimento de bactérias.

A finalidade da trasfega consiste, pois, em dar ao vinho melhores condições de conservação, tanto do ponto de vista sanitário como organoléptico (Pato, 1982).

Segundo Rizzon et al. (1986), a primeira trasfega deve ser realizada entre 20 a 30 dias após o esmagamento das uvas, incorporando uma certa quantidade de ar (oxigênio), o qual possui efeitos benéficos para favorecer a completa fermentação do açúcar e desprender o excesso de gás carbônico e o ácido sulfúrico que estiver presente.

A segunda trasfega (30 dias após a primeira trasfega) tem como finalidade remover os depósitos resultantes das colagens. Mesmo que o vinho não tenha sido colado, realiza-se a trasfega para remover depósitos naturais que não haviam se sedimentado por ocasião da primeira trasfega e para que o vinho permaneça limpo no repouso de inverno. Deve-se ter o mesmo cuidado para que o vinho não entre em contato com o ar para evitar alterações indesejáveis (Rosier, 1995).

A terceira trasfega deve ser executada após a estabilização do vinho, após os primeiros frios de inverno. Deve ser realizada sem incorporar oxigênio (Rizzon et al., 1986).

### *Colagem*

A colagem consiste na adição ao vinho de produtos clarificantes, capazes de coagular e formar flocos. Esses, ao sedimentarem, arrastam as partículas da turbidez e clarificam o vinho. Os produtos são denominados colas, que são de natureza protéica. Essas inicialmente reagem com os polifenóis do vinho, as leucoantocianinas ou taninos, coagulando-os e insolubilizando-os, levando à formação dos flocos, os quais, ao sedimentarem, arrastam as impurezas (Hashizume, 2001).

As colas, segundo Pato (1982), podem ser substâncias albuminóides (albuminas secas de ovos e de sangue, claras de ovo, o próprio sangue fresco, caseína e o leite puro), substâncias gelatinosas (osteocolas ou colas de ossos, as colas de pele, colas de peixe e o ágar-ágar) e substâncias minerais (barro espanhol, bentonite, areia e gesso).

A bentonite é um mineral da família da argila, de silicato de alumínio hidratado, cuja composição principal é montmorilonita ( $Al_2O_3 \cdot SiO_2 \cdot x H_2O$ ) (Hashizume, 2001); possui grande capacidade de expansão e poder de adsorção (Rosier, 1995) e absorve até dez vezes seu peso, aumentando de volume, o que



permite preparar pastas gelatinosas (Rizzon et al., 1986). Possui característica coloidal e de carga eletronegativa, conferindo-lhe um poder de absorção (Hashizume, 2001). A bentonite age sobre as proteínas, arrasta com ela apreciáveis quantidades de ferro e cobre, elementos que com ela são complexados (Pato, 1982). Sob baixo pH, a absorção das proteínas torna-se mais eficiente, pois as cargas positivas dessas aumentam e reagem com as cargas negativas da bentonite (Ough, 1996).

Para a adição da bentonite o vinho já deve estar fermentado, podendo ficar em contato com o vinho por semanas sem causar prejuízos na qualidade sensorial do mesmo (Ough, 1996).

### *Filtração*

O filtro limpa os vinhos das impurezas, deixando-os brilhantes e cristalinos (Pato, 1982).

Buscando uma boa qualidade do vinho é conveniente separá-lo o mais rapidamente possível das partículas e do depósito que originam após a colagem e trasfega, os quais podem ceder gostos e aromas indesejáveis ao vinho (Rosier, 1995).

### *Atesto*

Atesto é a prática de se encher completamente os recipientes vinários em períodos freqüentes e regulares. Essa operação visa evitar o contato do vinho com o ar (Rosier, 1995).

O vinho é normalmente conservado em recipientes de madeira. Pela ação da evaporação, tende a deixar um espaço vazio, que se torna foco de desenvolvimento de microrganismos aeróbios indesejáveis (Hashizume, 2001).

### **2.3 Obtenção dos vinhos brancos**

Denomina-se vinificação em branco o processo de fermentação alcoólica realizada na ausência da casca ou sem a maceração (técnica geralmente empregada na obtenção do vinho tinto). Por esse processo pode-se obter vinho branco com uvas tintas, pois as matérias corantes estando nas cascas e sendo separadas antes da fermentação, produzem o vinho incolor (Hashizume, 2001).

Vinhos brancos são geralmente fermentados a 10 °C a 18 °C, por 14 dias ou mais; temperaturas mais baixas e fermentações mais lentas favorecem a retenção de compostos agradáveis do “flavour” (Flett, 1997).

Dois operações importantes são preconizadas na vinificação em branco: *debourdagem* e *desmontagem*.

#### ***Desmontagem***

*Desmontagem* consiste na separação das películas do restante do mosto imediatamente após o esmagamento. O bagaço pode ser submetido à prensagem de onde se obtém o vinho de prensa, que é muito bom para consumo e também utilizado para elaboração de destilados (Rosier, 1995).

#### ***Debourdagem***

*Debourdagem* consiste na separação física por decantação de grande parte das substâncias sólidas do mosto, as quais são em parte responsáveis pelos fenômenos oxidativos do vinho e que propiciam a formação de aromas grosseiros. Deve ser executada após a *desmontagem* e a *sulfitagem* (Rosier, 1995).

## 2.4 Obtenção dos vinhos tintos

O vinho tinto fermenta em contato com o bagaço por um determinado período. O modo de se efetuar o esmagamento da uva, a eliminação do engaço e a duração do contato do mosto em fermentação com o bagaço influenciam nas características organolépticas do vinho (Rosier, 1995).

Vinhos tintos são fermentados por cerca de 7 dias a 20°C e 30°C, sendo que as altas temperaturas necessárias para promover uma melhor extração dos pigmentos (Flett, 1997).

Após a separação do mosto das cascas, este sofre uma fermentação secundária conhecida como fermentação malolática, realizada por bactérias lácticas (Ferreira, 1982). É o contato entre o suco das uvas com as cascas que promove a extração de compostos voláteis aromáticos e o crescimento das bactérias lácticas (Dias, 2001).

A vinificação em tinto exige algumas operações, como a encubagem, a descuba e a maceração.

### *Encubagem*

A encubagem vai desde de o enchimento de uva esmagada e desengaçada em cuba até a descuba. A duração da encubagem é que governa a maceração; o tempo varia de região para região, do tipo de vinho que se deseja produzir, bem como a variedade da uva (Hashizume, 2001).

### *Maceração*

Segundo Rizzon et al. (1999), maceração consiste no período em que a parte sólida da uva - película, semente e, eventualmente, a ráquis - permanece em contato com o mosto e tem como objetivo a extração de pigmentos roxos e vermelhos (antocianinas), bem como outras substâncias fenólicas da casca da uva que oferecem cor, tanino e característica adstringente ao vinho. A extração é

favorecida pela produção de etanol produzido nas fermentações preliminares. Depois da extração suficiente o vinho é drenado e prensado para retirada das cascas e transferido para outro tanque para completar a fermentação (Flett, 1997). A maceração é utilizada para fabricação de vinhos tintos e rosados

### *Descuba*

Descuba é a operação na qual se separa o mosto em fermentação das substâncias sólidas mais grosseiras em suspensão, chamadas de bagaço, o qual é composto em sua maior parte pela película da baga (Rosier, 1995). É no momento da descuba que se decidirá se o vinho será tinto ou rosado (Rosier, 1995).

As Figuras 3 e 4 apresentam as etapas de produção dos vinhos tintos e brancos.

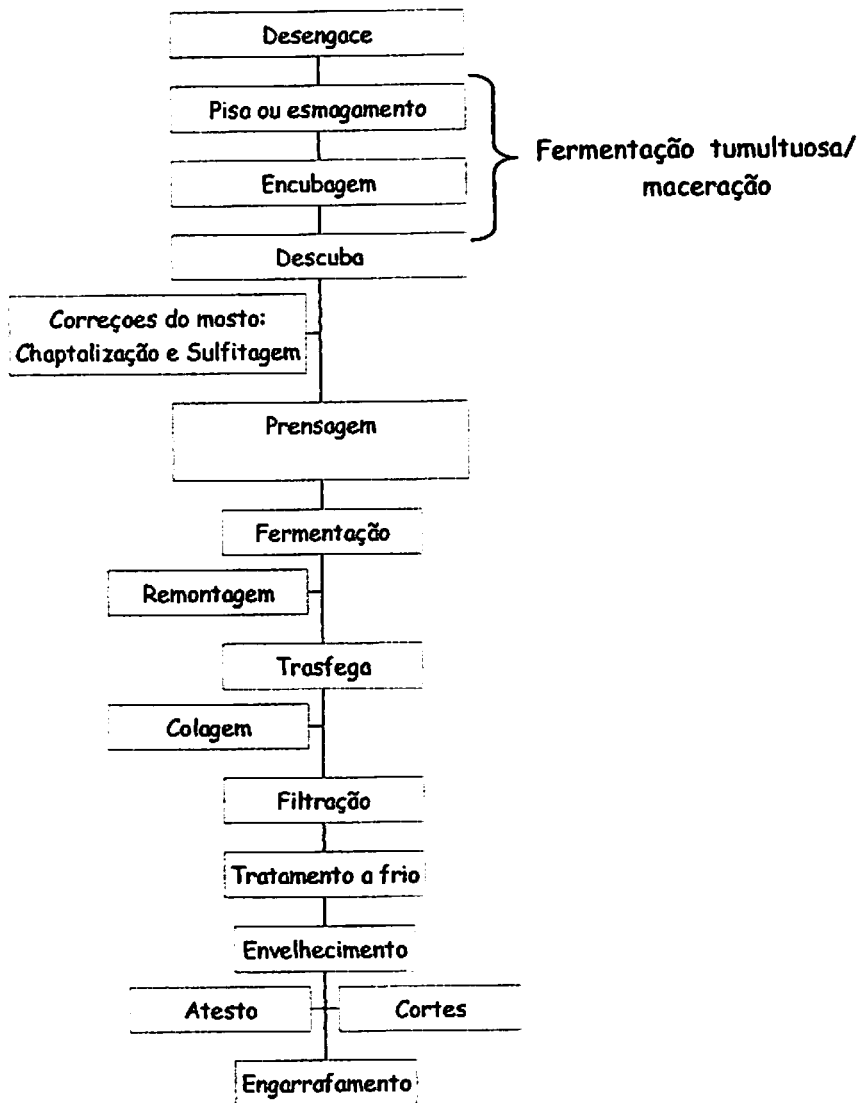
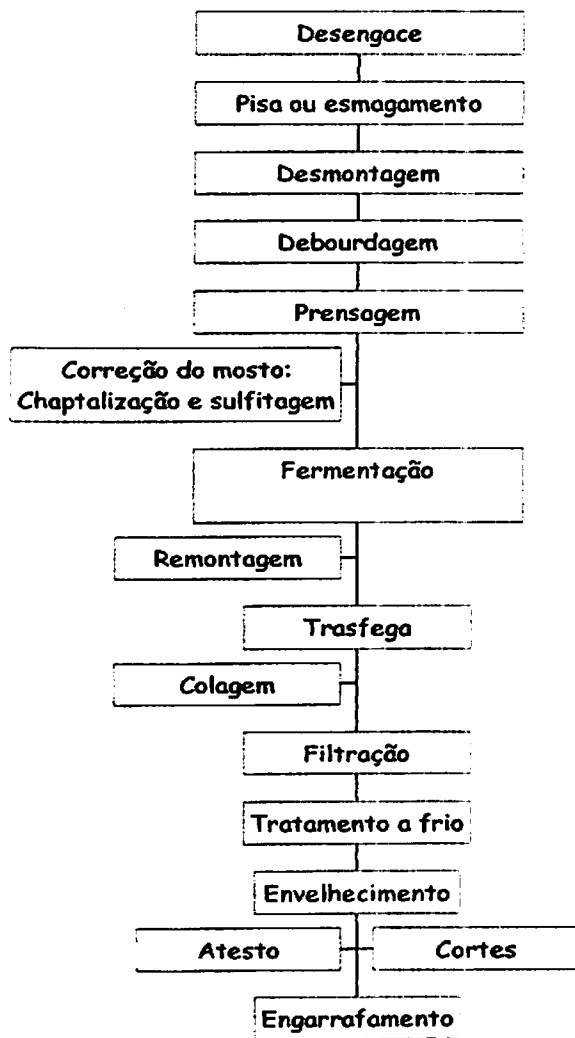


FIGURA 3 Organograma das etapas de produção de vinhos tintos (Vinificação em tinto). Fonte: modificado a partir de Rosier (1995).



**FIGURA 4** Organograma das etapas de produção de vinhos brancos (Vinificação em brancos). Fonte: modificado a partir de Rosier (1995).

## 2.5 Processo de fermentação

A fermentação é um dos métodos mais antigos de preservação de alimentos. Consiste na degradação anaeróbica da glicose, ou outra fonte de carbono, a vários produtos, característico para cada ser vivo, para obter energia na forma de ATP. A maioria dos microrganismos metaboliza a fonte de carbono até piruvato e, deste, sintetiza outros compostos orgânicos retentores de energia, como, o ácido láctico (fermentação láctica), o etanol (fermentação alcoólica), o ácido propiônico e outros (Lehninger et al., 2000).

A fermentação da glicose a etanol e  $\text{CO}_2$  pelas leveduras tem sido explorada há muitos séculos na panificação e na produção de vinhos. A via completa da quebra da glicose (glicólise) foi descrita em 1940, por Gustav Embden, Otto Meyerhof e Jacob Parnas, tendo sido denominada de via Embden-Meyerhof-Parnas em homenagem aos pesquisadores. A glicólise é uma seqüência de 10 reações enzimáticas, nas quais uma molécula de glicose é convertida em duas moléculas de 3 carbonos, o piruvato, com produção de 2 ATPs. Ela desempenha uma função central no metabolismo energético, fornecendo uma porção significativa de energia livre utilizada pela maioria dos microrganismos e preparando a glicose e outros compostos para posterior degradação oxidativa (Voet et al., 2000).

O piruvato produzido pela glicólise pode seguir três destinos metabólicos: em condições aeróbicas, os carbonos do piruvato são oxidados a  $\text{CO}_2$  pelo ciclo do ácido cítrico e os elétrons são transferidos para produzir  $\text{H}_2\text{O}$  na fosforilação oxidativa; em condições anaeróbicas pode ser convertido a lactato (fermentação homoláctica) e em leveduras é descarboxilado a  $\text{CO}_2$  e acetaldeído, o qual é reduzido a NADH para produzir  $\text{NAD}^+$  (que é novamente utilizado na glicólise) e etanol (Fermentação alcoólica) (Voet et al., 2000).

A fermentação alcoólica ocorre sob ação de enzimas provenientes de certos microrganismos, como as leveduras, que transformam os açúcares,

susceptíveis à fermentação, presentes no mosto, em etanol, gás carbônico, glicerina, ácido succínico e outros produtos formados em quantidades menos relevantes, tais como ácidos carboxílicos, ésteres, aldeídos e hidrocarbonetos superiores (Aquarone et al., 2001)

\*| Durante a fermentação, as leveduras utilizam açúcar e outros constituintes do suco da uva, convertem em etanol, CO<sub>2</sub> e outros metabólicos (como produtos finais), que contribuem para composição química e qualidade sensorial resultando no vinho (Querol & Ramón, 1996).|

| A velocidade de fermentação depende do número de células que, por sua vez, é influenciado pelos nutrientes do mosto, da concentração de açúcar e álcool, do pH, da temperatura e da agitação (Ough, 1996).|

Na produção de vinhos, principalmente vinhos tintos, a fermentação alcoólica não é um processo isolado, ocorrendo também a fermentação malolática que trata a suavidade da bebida, melhorando-a (Dias, 2001).

A fermentação malolática constitui um processo biológico de dasacidificação dos vinhos, sendo preconizada em vinhos tintos porque estes são desejados mais redondos e menos picantes ao paladar que os vinhos brancos (Rosier, 1995). Ela é realizada por bactérias ácido lácticas, sendo *Leuconostoc oenos* a principal espécie (Flett, 1999).

Segundo Colagrande et al. (1994), fatores como pH, concentração de etanol, concentração de SO<sub>2</sub>, temperatura de fermentação, competição entre bactérias lácticas e outros microrganismos e escassez de nutrientes afetam o crescimento de bactérias ácido lácticas, dificultando a desacidificação biológica espontânea nos vinhos. Portanto, torna-se freqüente, entre os vinicultores, a inoculação de bactérias indígenas no mosto. Essa prática nem sempre oferece bons resultados, levando a alterações nas características dos vinhos produzidos. Visando diminuir esses problemas, bactérias lácticas tolerantes a etanol e SO<sub>2</sub>, com capacidade de se desenvolver no pH dos vinhos, de produzir pequenas



quantidades de ácido acético e manter as características organolépticas do vinho, têm sido isoladas dos mostos e de vinhos.

Durante o processo de vinificação ocorre na fermentação uma fase tumultuosa em que o líquido aumenta de temperatura e desprende gás carbônico, dando a impressão de estar em ebulição. Quando em presença das cascas, estas são empurradas para cima pelo gás carbônico (formação do chapéu). Ao mesmo tempo, o açúcar é consumido e novas substâncias são produzidas, entre elas o álcool etílico, que aparece em maior quantidade. Na fase lenta da fermentação onde ocorre uma diminuição da liberação do gás carbônico diminuindo assim a efervescência. Os açúcares que restam são normalmente pentoses, que não são fermentescíveis (Rosier, 1995).

A fermentação alcoólica é considerada completa quando açúcares fermentescíveis, glicose e frutose são utilizados por completo. Para a obtenção do vinho, o processo fermentativo era, no início, conduzido em barris de madeira e ou tanques de concreto. Entretanto, atualmente é mais indicado a utilização de domas de aço inox, que permitem controle da temperatura (principalmente o resfriamento) durante o processo (Fleet, 1997).

X| A fermentação alcoólica a partir de polpa ou suco de frutas pode ser natural ou espontânea ou por meio de inoculação de culturas selecionadas.

## 2.6 Fermentação espontânea

A história da produção de bebidas alcoólicas iniciou-se há centenas de anos, com a fermentação espontânea de suco de uvas, as quais, como muitas outras frutas, têm uma microbiota presente em sua superfície (Dias, 2001).

A fermentação do suco de uva para a obtenção do vinho envolve um processo microbiológico complexo com interações entre leveduras, bactérias e fungos filamentosos. Entre esses microrganismos, as leveduras desempenham

um papel principal e podem-se originar das uvas e equipamentos vinários (Querol & Ramón, 1996).

As películas das uvas trazem para o mosto as leveduras, que estão presentes na camada esbranquiçada - a pruína - facilmente arrastada pelo contato dos dedos, a matéria corante e as substâncias aromáticas (Pato, 1982).

‡ O mosto de frutas é rico em nutrientes, sendo, portanto, um meio de cultura ideal para a proliferação de microrganismos que neles se desenvolvem e fermentam. Essa população microscópica é constituída de leveduras chamadas “selvagens”, que são os fermentos naturais desse mosto (Moretto et al., 1988).‡

As principais leveduras encontradas nas uvas são *Kloekera* e *Hanseniapora* (50% a 70%) e, em menor quantidade, *Candida*, *Metschnikowia*, *Cryptococcus*, *Pichia* e *Hansenula*. *Saccharomyces cerevisiae* encontra-se em baixas populações nas uvas (<50 UFC/mL). Vários fatores afetam a população total de leveduras e a proporção individual das espécies na uva, como as condições climáticas (temperaturas, chuvas, etc), ataque de insetos e passarinhos, grau de maturação e variedade da uva (Flett, 1997).

A presença de espécies individuais vai depender do curso da fermentação (início, meio e fim). Estudos mostram que a principal levedura do vinho é *Saccharomyces cerevisiae*. Os 2-4 primeiros dias de fermentação é caracterizado pelo crescimento de várias espécies, como *Kloekera/Hanseniaspora*, *Cândida*, *Metschikowia*, *Pichia* e *Kluveromyces* com cerca de  $10^7$  UFC/mL, que vão morrendo de acordo com a tolerância ao acúmulo de etanol. As leveduras vão consumindo açúcares e aminoácidos do suco e gerando os produtos finais que dão características ao vinho. *Saccharomyces cerevisiae* cresce nesses primeiros estágios, mas, devido à sua tolerância ao etanol, continua crescendo e predominado no meio até o final do processo de fermentação (Fleet, 1999).

A fermentação espontânea acarreta uma grande variação na qualidade dos vinhos. Embora a sulfitagem iniba grande parte dos microrganismos prejudiciais, a microbiota que permanece ativa no mosto é bastante heterogênea (Silva & Silva, 1987). Com o intuito de resolver estes problemas na qualidade dos vinhos, vários vinicultores usam inóculos de culturas puras de *Saccharomyces cerevisiae*, isolados da própria região de origem do vinho. Com isso, o produto final pode exibir uma reprodutibilidade, em sucessivas vindimas, das propriedades sensoriais dos vinhos produzidos na sua região de origem (Querol & Ramón, 1996).

Querol & Ramón (1996) sugerem que a sucessão de espécies conduz a uma maior complexidade no aroma dos vinhos. O uso de leveduras selecionadas torna-se desvantajoso ao suprimir significativamente o desenvolvimento de leveduras nativas durante a fermentação do vinho. Entretanto, de acordo com estudos de Querol et al. (1992), Fleet (1997) e Fraile et al. (2000), espécies inoculadas competem com espécies nativas, mas não suprimem completamente seu crescimento nos primeiros dias após a inoculação. Com isso, os produtos da fermentação podem exibir reprodutibilidade como resultado do controle do processo e também manter as características produzidas pela flora natural.

## 2.7 Uso de outras frutas como substrato no processo de vinificação

✱O vinho é uma bebida alcoólica que é obtida genericamente pela fermentação alcoólica de um suco de fruta natural madura, principalmente a uva (*Vitis vinifera*). O nome “vinho” é tradicionalmente reservado para a bebida proveniente de uva. Para bebidas produzidas pela fermentação alcoólica, que não sejam obtidas da uva, deve-se indicar o nome da fruta, como, por exemplo, vinho de laranja (Corazza et al., 2001).

Brasil (1997) define bebida alcoólica fermentada como “sendo a bebida com graduação alcoólica entre 4% a 14% em volume, a 20°C, obtida da

fermentação alcoólica do mosto de frutas são, fresca e madura, o qual pode ser adicionado de açúcares, água e outras substâncias previstas, em ato administrativo complementar, para cada tipo de fruta”. Vinho gaseificado é aquele em que se adicionou anidrido carbônico e o vinho de fruta licoroso, cuja graduação alcoólica vai de 13°GL a 18°GL, podendo ser doce ou seco (Hashizume, 1991).

Teoricamente, qualquer fruto ou vegetal comestível que contenha umidade suficiente, açúcar e outros nutrientes para as leveduras, pode servir como matéria-prima para a produção de bebidas alcoólicas (Prudêncio, 1969), ou seja, a produção de um bom vinho com sabores característicos de cada fruta (Corazza et al., 2001).

A cidra e o *Perry* são as bebidas mais comumente conhecidas e são originárias da fermentação dos mostos de maçãs e pêras, respectivamente. O teor alcoólico da cidra é geralmente menor que o do vinho, devido ao menor conteúdo de açúcar no suco de maçã para ser convertido em álcool (Carlile et al., 2001).

As frutas sadias, maduras e suculentas constituem a matéria-prima que reúne as qualidades requeridas para a obtenção de um vinho apreciável. Todas as outras operações subsequentes visam apenas melhor conduzir as fermentações e apurar as características próprias introduzidas pelas frutas. A obtenção de um vinho deve, fundamentalmente, basear-se na escolha de boas frutas para a sua elaboração.

As frutas, quando utilizadas completamente amadurecidas, são mais ricas em açúcar, economizando parte daquele que vai ser acrescentado para a correção do mosto para o grau alcoólico desejado e, sendo menos ácidas, favorecem a qualidade do vinho (Moretto et al., 1988).

| Além da uva, outras frutas têm sido utilizadas para a produção de bebidas alcoólicas fermentadas. Dias (2001), trabalhando com cacau e cajá,

conseguiu obter, com adaptações nos processos comumente empregados na fabricação de bebidas alcoólicas, bons resultados na fabricação da bebidas. A análise sensorial revelou boa aceitação dessas e a tecnologia empregada pode ser vista como uma alternativa para a utilização do excedente de safras.

Corazza et al. (2001), na produção de vinho de laranja, obtiveram uma bebida com sabor e qualidade comparável ao vinho de uva, com semelhanças no grau alcoólico e no teor de °Brix. A produção caseira do vinho de laranja pode ser vantajosa devido ao baixo custo da fruta e à relativa facilidade de fermentação por leveduras selecionadas.

Campos et al. (2002) avaliaram o potencial de polpa de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) para a elaboração de bebida fermentada utilizando dois isolados (RL11 e C9) de *Saccharomyces cerevisiae* pertencentes ao Laboratório de Genética de Microrganismos (DBI-UFLA). Resultados obtidos mostraram que os dois isolados foram capazes de fermentar o mosto de jabuticaba, o qual também não impediu o metabolismo das leveduras, concluindo que a jabuticaba pode ser usada na elaboração de bebida fermentada.

## 2.8 Uso de leveduras selecionadas

As leveduras são fungos unicelulares, não filamentosos, esféricos ou ovais, pertencentes à divisão Ascomycota e Basidiomycota, cuja multiplicação ocorre por fissão binária, como *Schizosaccharomyces* ou por brotamento, como, por exemplo, no caso de *Saccharomyces* (Tortora, 2000). Podem viver em uma grande diversidade de ambientes e utilizar como alimentos muitas substâncias (Ough, 1996).

*Saccharomyces cerevisiae* é uma das leveduras mais utilizadas em fermentações industriais, como panificação, produção de vinhos, sakê, álcool de amido ou cereal e produção de bebidas em geral (Kurtzman & Fell, 1998). Este microrganismo tolera níveis elevados de etanol (12% a 15%), hidroliza

oligossacarídeos, tais como a maltose e a maltotrealose em glicose para produção e transformação em etanol, e tolera altas concentrações de açúcar (osmotolerante) (Pataro et al., 2002).

As leveduras usadas na elaboração de vinhos pertencem a um pequeno grupo do gênero *Saccharomyces*, sendo a espécie *Saccharomyces cerevisiae* a mais comum de atuar na fermentação do mosto (Ough, 1996).

O rendimento e a velocidade do processo de fermentação dependem, entre outros fatores, da linhagem de levedura empregada (Silva & Silva, 1987).

Nos últimos 20 anos, a indústria de vinhos tem tido um desenvolvimento notável, levando à melhoria da qualidade dos vinhos produzidos, no que diz respeito à fineza, intensidade, originalidade e intensidade do “flavour” e também à estabilidade microbiológica e físico-químicas. Algumas técnicas biotecnológicas têm sido de fundamental importância, como, por exemplo, o tratamento do vinho com enzimas, o uso de leveduras e bactérias lácticas selecionadas e o uso de microrganismos imobilizados (Colagrande et al., 1994).

Um dos principais interesses da indústria de vinho são as propriedades da bebida final, que pode variar de ano para ano dependendo da microflora presente nas uvas (Querol et al., 1990).

A produção e o uso de leveduras secas no processo de vinificação vêm sendo usados nos Estados Unidos há algumas décadas. A adição de leveduras selecionadas no mosto, além de garantir um rápido início da fermentação alcoólica, também favorece uma conclusão normal desta (Esteve-Zarzoso, 2000).

O uso de culturas selecionadas para iniciar a fermentação nas indústrias de vinho tem sido usado desde a década de 1950. Os institutos de pesquisa, a partir de leveduras selvagens, começaram a isolar culturas com bom rendimento fermentativo e formar coleções próprias (Dias, 2001).



No Brasil, o uso de leveduras selecionadas tem contribuído para a melhoria na qualidade dos vinhos. No entanto, a inexistência de leveduras nacionais selecionadas para este fim implica a necessidade de importação, o que nem sempre leva o produto ao padrão de qualidade esperado e dificulta a adoção da tecnologia para pequenos e médios produtores. O uso de leveduras selecionadas a partir da microbiota nativa tem maiores probabilidades de apresentar melhores resultados por estarem adaptadas às condições climáticas e práticas culturais específicas da região (Silva & Silva, 1987).

Atualmente, em cantinas modernas, têm se utilizado leveduras selecionadas, com propriedades fisiológicas, bioquímicas e enológicas. conhecidas e padronizadas, para aperfeiçoamento da fermentação alcoólica e Com isso, são obtidos produtos mais uniformes anos a ano, sendo as variações causadas apenas por oscilações no mosto devido a condições climáticas (Silva & Silva, 1987).

Para melhor controle da temperatura, grau de oxigenação e de clarificação do mosto e fenômeno de antagonismo microbiano na fermentação alcoólica, o uso de leveduras selecionadas (em particular *Saccharomyces cerevisiae*) tem sido muito difundido, assegurando um rápido início da fermentação (devido ao uso excessivo de células), e prevenção do desenvolvimento da microflora atípica (Colagrande et al., 1994).

De acordo com Dias (2001), vários fatores devem ser considerados para a seleção de um microrganismo, como, por exemplo, a taxa de crescimento celular correlacionado à biomassa; a viabilidade do microrganismo durante o processo; a estabilidade durante o processo de fermentação e o rendimento de metabólitos de interesse produzidos a partir do substrato inicial.

\*As leveduras são também responsáveis pela produção de compostos que conferem aromas desagradáveis ao vinho, como sulfetos e mercaptanos. Muitos são os fatores que estimulam a produção de H<sub>2</sub>S, entre eles, a linhagem de

levedura utilizada. Segundo Silva & Silva (1987), o emprego de leveduras selecionadas adequadas oferece vantagens, como fermentação completa e regular, maior produção de álcool, produção controlada de acidez volátil, possibilidade de uma clarificação mais rápida do vinho e melhoria da sua estabilidade biológica.

Dias (2001) testou duas estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* que são comercializadas na forma liofilizada, usadas para a produção de vinhos ( $S_{c1}$  e  $S_{c2}$ ) e uma outra levedura selecionada de cana-de-açúcar ( $S_{c3}$ ), quanto ao potencial fermentativo, sob diferentes temperaturas a para produção de vinhos de frutas tropicais. Com os resultados obtidos, pôde-se concluir que não houve diferenças significativas entre as leveduras selecionadas e a levedura selvagem no rendimento fermentativo durante o experimento

Silva & Silva (1987) realizaram avaliação enológica de 89 leveduras isoladas a partir do mosto de uva em início de fermentação, com base na velocidade de consumo de açúcar, produção de  $H_2S$ , formação de película e floculação. Dos 89 isolados, cinco linhagens de leveduras pertencentes à espécie *Saccharomyces cerevisiae* (EMBRAPA-20B, 81B, 82B, 87B e 88B) foram comparadas com uma levedura importada (Zymasil), de uso corrente na indústria vinícola local. Pôde-se observar que as leveduras autóctones iniciaram a fermentação dentro de 24 horas, enquanto a levedura importada precisou de um período de adaptação de 72 horas, apresentando um comportamento inferior. Realizou-se análise cromatográfica dos compostos formados (álcool superior, acetato de etila, acetaldeído e glicerol) e sensorial da bebida final. Os vinhos obtidos com as linhagens selvagens testadas, EMBRAPA-20B, 81B e 82B, mostraram-se de qualidade similar ao obtido com levedura importada. Foram considerados de qualidade inferior os vinhos obtidos com as linhagens EMBRAPA-87B e 88B, tendo a última conferido um forte odor de acetaldeído no vinho. A linhagem EMBRAPA-20B, durante a fase fermentativa das



microvinificações, destacou-se pelo aroma produzido, sendo então testada em escala industrial. Resultados demonstraram um bom desempenho dessa linhagem durante a fermentação e a produção de um vinho de qualidade superior ao elaborado com a levedura importada (Zymasil).

Nurgel et al. (2002) investigaram o efeito da adição de *Saccharomyces cerevisiae* selvagem e *Saccharomyces cerevisiae* comercial em comparação com a fermentação espontânea no processo fermentativo e na formação de compostos do “flavor”, em suco de uva pasteurizado. Resultados obtidos mostraram um aumento na quantidade de compostos voláteis com o uso de levedura selvagem e comercial, em comparação com os produtos formados numa fermentação espontânea. A maior concentração de etanol foi obtida com leveduras selecionadas.

Para a seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* que afetam o processo de fabricação de vinhos, algumas características bioquímicas devem ser observadas, de acordo com Colagrande et al. (1994) e Doyle et al. (1997) (Tabela 1).

**TABELA 1** Características desejáveis e indesejáveis de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* que afetam a produção de vinhos.

<b>Desejáveis</b>	<b>Indesejáveis</b>
Rápida iniciação da fermentação	Produção de derivados sulfatos e mercaptanas
Eficiente conversão do açúcar do mosto em álcool	Altas produções de acetaldeído, ácido acético e álcoois superiores
Manutenção por toda a fermentação	Capacidade de formar espuma
Tolerância a etanol	Produção de uréia, que pode ser convertido a carbonato de etila, que é um agente tóxico.
Habilidade para depositar rapidamente no final da fermentação, facilitando o processo de clarificação. Capacidade de floculação.	Inibição da fermentação maloláctica.
Fermentar a baixas temperaturas (10-14°C)	Produção de polifenol oxidase
Resistência a SO <sub>2</sub> (dióxido de enxofre)	
Produção de compostos aromáticos responsáveis pelo "flavor" do vinho, em níveis adequados	
Não formar espuma durante a fermentação	
Produção de um fator <i>killer</i>	

## 2.9 Crescimento de microrganismos

Crescimento microbiano implica no aumento do protoplasma, formação de novas estruturas e de novas células. Divisão celular é, obrigatoriamente, requerida para o crescimento e vida de microrganismos (Cadwel, 1995).



As leveduras multiplicam-se por reprodução assexuada, fissão binária, como *Schizosaccharomyces*, ou brotamento, como, por exemplo, no caso de *Saccharomyces* e por reprodução sexuada.

O crescimento dos microrganismos pode ser quantificado por meio de diferentes métodos. Alguns métodos determinam o número de células enquanto outros analisam a massa total da população, que é diretamente proporcional ao número de células (Tortora, 2000).

A medição do crescimento pode ser realizada pela contagem do número de células em microscópio óptico, com auxílio de câmaras de contagem, proporcionando resultados imediatos, sem necessidade de incubação da cultura. Para leveduras, com auxílio de corantes específicos, pode-se separar células mortas de vivas e obter número de células viáveis e totais (Tortora, 2000).

Outro método muito utilizado é a contagem em placas. A cultura é inoculada em meio adequado para seu crescimento e, após o período de incubação, é quantificada. A grande vantagem desse método é a determinação apenas do número de células viáveis e, como desvantagem, considera-se o tempo, em geral, de 24 horas, para o aparecimento das colônias visíveis na placa. Considera-se que cada colônia é originada da multiplicação de uma célula (Tortora, 2000).

Existem medidas indiretas que são utilizadas quando não há necessidade da contagem de células microbianas, como a medição de massa (peso seco, proteína e DNA) e turbidimetria, que se baseia no fato de que à medida que as células crescem, o meio vai ficando turvo e com alta densidade, impedindo a passagem do feixe de luz (Tortora, 2000).

O crescimento da população de microrganismos, durante intervalos de tempos, pode ser representada graficamente. Esta representação gráfica é denominada curva de crescimento e pode ser realizada de forma logarítmica ou aritmética, sendo a primeira mais utilizada por mostrar claramente as diferentes

fases do crescimento e permitir que um maior número de gerações seja expresso no gráfico (Tortora, 2000).

Segundo Walker (1998), a curva de crescimento de leveduras em cultura em batelada compreende fases denominadas lag, fase de aceleração do crescimento, fase log (logarítmica) ou exponencial, fase de desaceleração do crescimento e fase estacionária. Este autor não representa a fase de morte, considerando que as leveduras possuem habilidade de sobreviver por um longo período (meses), sem nutrientes (Figura 5). Ele menciona apenas que, depois da fase estacionária as leveduras podem morrer e sofrer autólise. Cadwell (1995) considera para os microorganismos, além das fases mencionadas acima a fase de morte acelerada da morte e fase de morte (Figura 6).

A fase lag reflete o tempo requerido para que as células de leveduras inoculadas se adaptem às novas condições físicas e químicas do meio, (temperatura, osmolaridade, agitação, etc.), por meio da síntese de enzimas necessárias para se obter uma alta taxa de crescimento. Se as condições do meio se aproximarem das condições anteriores, a fase lag pode passar despercebida (Walker, 1998; Tortora, 2000, Pelczar, 1996 e Cadwell, 1995).

Como nem todas as células saem da fase lag ao mesmo tempo, o curto período de preparação para o crescimento máximo, compreendido entre a fase lag e log, é denominado de fase de crescimento acelerado. Nesta fase, as células começaram a se dividir, mas ainda não apresentaram um crescimento constante em função do tempo (Walker, 1998; Tortora, 2000; Pelczar, 1996 e Cadwell, 1995).

Na fase log (logarítmica) ou exponencial, ocorre uma multiplicação acelerada que se apresenta sob a forma de crescimento logarítmico (constante em função do tempo). Os microorganismos podem crescer o tanto quanto possível, sendo limitados apenas pelo seu potencial genético, considerando que os nutrientes do meio, fatores ambientais e físicos estiveram adequados. Devido à

intensa capacidade metabólica, as células dessa fase são normalmente mais sensíveis a mudanças fisiológicas (Walker, 1998; Tortora, 2000; Pelczar, 1996 e Cadwell, 1995).

A fase de desaceleração de crescimento inicia quando uma taxa de morte começa a ocorrer, mais ainda apresenta-se menor que a produção de novas células (Walker, 1998; Tortora, 2000; Pelczar, 1996 e Cadwell, 1995).

A fase estacionária pode ocorrer devido à escassez de nutrientes ou acúmulo de produtos tóxicos ao crescimento e excessiva floculação celular. Os organismos ainda são viáveis e usam a reserva endógena para manutenção celular. Nesta fase, as produções de novas células e as taxas de morte são iguais (Walker, 1998; Tortora, 2000; Pelczar, 1996 e Cadwell, 1995).

A fase de morte acelerada é consequência da lise celular por enzimas autolíticas ou efeitos de metabólicos tóxicos. A taxa de morte é maior que a produção de novas células, mas ainda não é logarítmica (Walker, 1998; Tortora, 2000; Pelczar, 1996 e Cadwell, 1995).

A fase de morte é caracterizada pela perda da capacidade de reprodução. Nessa fase ocorre uma morte logarítmica (Walker, 1998; Tortora, 2000; Pelczar, 1996 e Cadwell, 1995).

Todas as fases são importantes para o processo biotecnológico. Um processo fermentativo ideal deve minimizar o período da fase lag e maximizar a taxa e o período da fase exponencial (Lee, 1996).

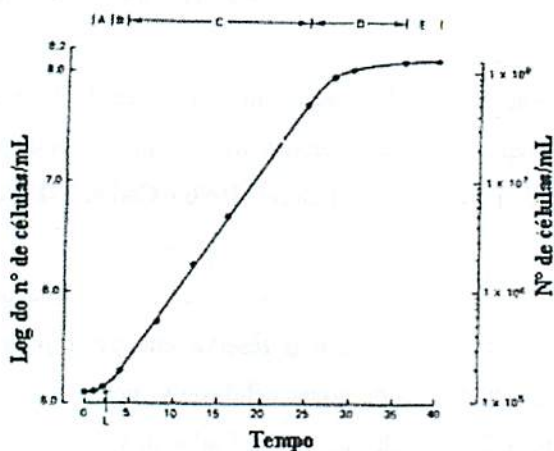


FIGURA 5 Fases da curva de crescimento de leveduras A- Fase lag, B- Fase de aceleração do crescimento, C- Fase exponencial, D- Fase de desaceleração do crescimento, E- Fase estacionária.  
Fonte: modificado a partir de Walker (1998).

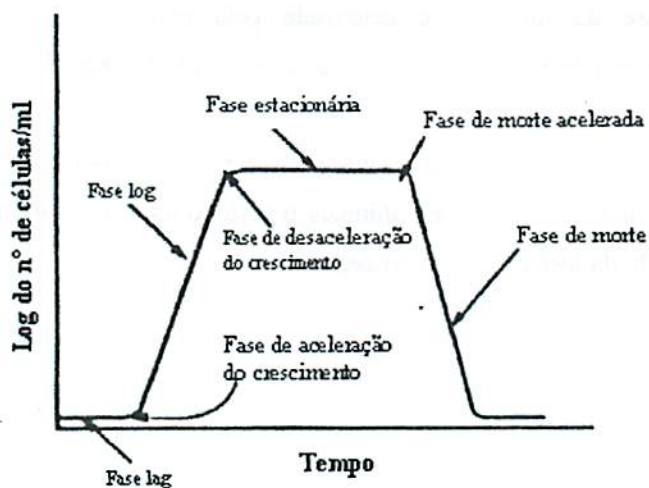


FIGURA 6 Fases da curva de crescimento  
Fonte: modificado a partir de Cadwell (1985).

## **2.10 Produtos primários e secundários oriundos da fermentação no processo de vinificação**

Os microrganismos, na fermentação industrial, produzem metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são formados ao mesmo tempo em que as células e a curva de produção segue a curva de crescimento celular, quase em paralelo, com um atraso mínimo. Já os metabólitos secundários não são produzidos até que o microrganismo tenha completado toda sua fase de crescimento logarítmico e tenha iniciado sua fase estacionária. Estes podem ser uma conversão microbiana de um metabólito primário ou um produto metabólico do meio original de crescimento que o microrganismo produz somente depois que um número considerável de células e metabólitos primários tenha sido acumulado (Tortora, 2000).

A qualidade da bebida está ligada à ecologia dos tipos microbianos e suas populações durante a fermentação e maturação, que são determinantes tanto do rendimento em etanol como da formação e proporções relativas dos compostos secundários (Pataro et al., 2002).

Leveduras e condições de fermentação (temperatura e nutrientes) são apontadas como os fatores que mais influenciam o sabor das bebidas alcoólicas (Oliveira, 2001).

O sabor das bebidas deve-se a inúmeros compostos orgânicos voláteis e não voláteis que podem ser divididos em vários grupos de acordo com sua natureza química. Álcoois superiores, ácidos graxos e ésteres formam, quantitativa e qualitativamente, o maior grupo na fração de aroma volátil das bebidas alcoólicas, sendo os álcoois superiores os mais abundantes. Compostos como acetaldeído e diacetil estão presentes em pequenas concentrações, mas podem desempenhar um papel chave no sabor das bebidas (Berry, 1995).

Segundo Oliveira (2001), as bebidas podem ser distinguidas umas das outras por suas características organolépticas, mas não por sua composição química. A diferença parece ser no conteúdo dos compostos do aroma.

A diferença entre os vinhos obtidos a partir de um mesmo mosto, fermentados por distintas leveduras, em condições idênticas, deve ser atribuída aos produtos, secundários formados durante a fermentação. Entre esses produtos os álcoois e ésteres desempenham um papel preponderante (Silva & Silva, 1987).

Segundo Colagrande et al. (1994), compostos primários seriam o etanol e CO<sub>2</sub> e os compostos secundários formadores de aroma segundo, Berry & Watson (1987), seriam os álcoois superiores: 1-propanol, 1-butanol, 2-metilpropanol (Isobutanol), 2-metilbutanol (Amilico) e 3-metilbutanol (Isoamilico); ácidos: acético, propiônico, butírico e láctico; os ésteres: acetato de etila e butirato de etila; os aldeídos e cetonas: acetaldeído, acetoina e diacetil e os compostos sulfurados: dimetilsulfito (mercaptana).

O aroma dos vinhos é formado por mais de 800 compostos (Rapp & Versini, 1991). A formação dos compostos formadores do aroma varia conforme o microrganismo fermentador e quanto ao substrato a ser formado, fazendo com que cada bebida tenha suas características próprias (Dias, 2001). A cultivar da fruta a ser utilizada, o método de vinificação, a conservação do vinho e o envelhecimento influenciam nas concentrações e na natureza dos compostos aromáticos encontrados (Salton et al., 2000).

Parte das substâncias responsáveis pelo aroma dos vinhos origina-se das uvas (Terpenos); outras se desenvolvem durante a fermentação (álcoois superiores, ácidos carboxílicos alifáticos, ésteres, etc.) e, finalmente, os que formam durante o envelhecimento do vinho (fenóis voláteis, acetatos, etc.) (Fraile et al., 2000).



Na Figura 3 observa-se um esquema simplificado da formação de compostos em processos fermentativos.

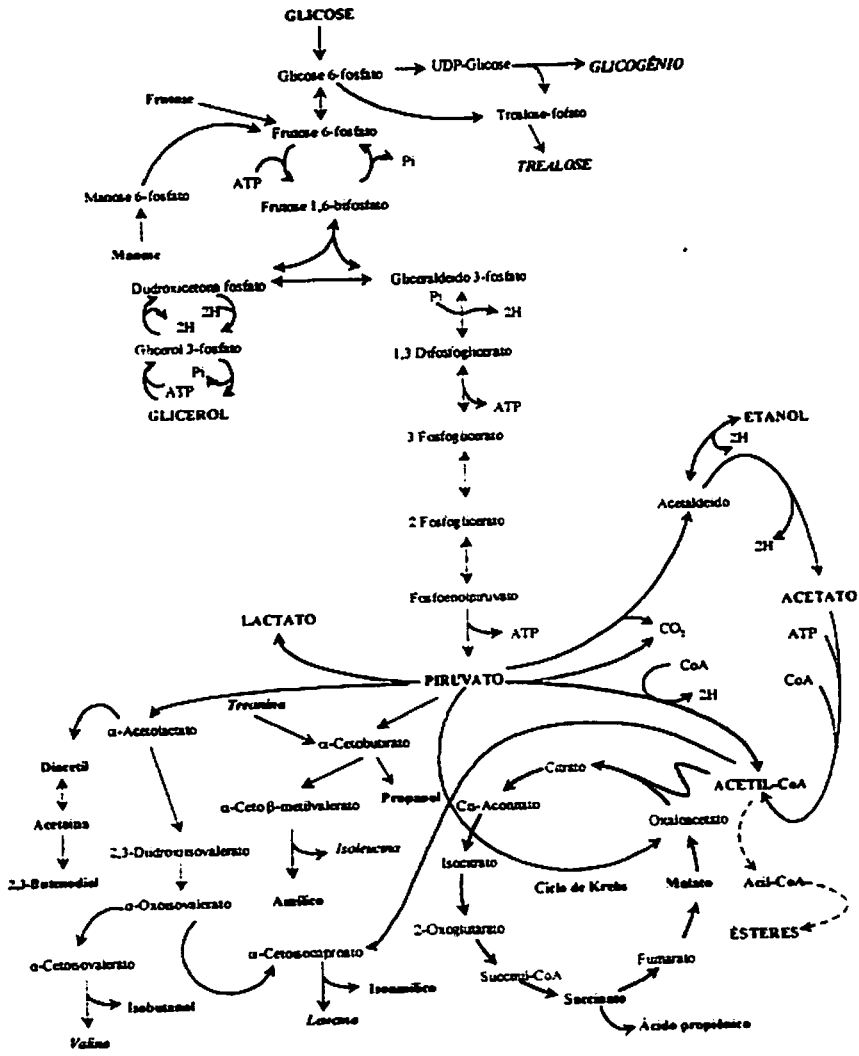


FIGURA 3 Esquema simplificado da formação de compostos em processos fermentativos (Dias, 2002).

## ***Etanol***

O etanol, ou álcool etílico, é um dos principais metabólitos primários de interesse industrial, seja na produção de bebida alcoólica, seja para a produção de combustível (Rose, 1977), produzido na fermentação por leveduras (Walker, 1998).

Etanol é um composto formado a partir da clássica via de Embden-Parnas (EMP) ou via glicolítica. Duas reações relacionadas a essa via conduzem à produção de etanol, por meio da fermentação alcoólica. Na primeira reação, o piruvato é descarboxilado (perde dióxido de carbono), produzindo acetaldeído e liberando CO<sub>2</sub>, que é responsável pelas bolhas da cerveja e nos vinhos espumantes. Em uma segunda reação, o acetaldeído é então reduzido para produzir etanol e, ao mesmo tempo, uma molécula de NADH é oxidada a NAD<sup>+</sup> para cada molécula de etanol produzida (Campbell, 2001).

Brasil (1997) define que os vinhos são divididos, quanto à classe, em: vinho de mesa, com um teor alcoólico de 10°GL e 13°GL (graus Gay-Lussac); vinho champanha, contendo de 10°GL a 13°GL; espumante, entre 7°GL e 10°GL; espumante gaseificado entre 10°GL e 12,5°GL e licoroso, entre 14°GL e 18°GL, podendo ser tintos, rosados ou brancos. A concentração final de etanol depende dos nutrientes e da temperatura de fermentação (Ough, 1996).

Segundo Rosier (1995), aconselham-se valores entre 11°GL e 11,5°GL para vinhos que serão prontamente consumidos e até 12°GL para vinhos que serão armazenados. Valores abaixo destes podem acarretar em má conservação dos vinhos.

Aumentos na concentração de etanol podem ser inicialmente inibitórios e, mais tarde, letais para leveduras (Walker, 1998). Portanto, ele influencia na sucessão de espécies de leveduras envolvidas na fermentação. Inicialmente, há o crescimento de espécies sensíveis ao álcool, como *Kloekera apiculata*, *Hanseniospora guillemondii* e *Candida pulcherrima*, seguidas por algumas

espécies de *Saccharomyces*, como *S. rosei*, *S. veronae* e *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*. A concentração de álcool no mosto em torno de 10% permite o predomínio de *S. cerevisiae* var. *chevalieri* e *S. italicus* (Harrison, 1978), que são espécies produtoras de etanol e toleram até 15% v/v ou mais. Espécies de *K. apiculata* e *C. stellata* raramente toleram etanol em concentrações maiores que 5% ou 8% (Doyle et al., 1997).

O etanol, em altas concentrações, é responsável pela diminuição da viabilidade celular refletindo na desorganização da membrana citoplasmática, de composição fosfolipídica, alterando a sua integridade. Como consequência, ocorre a liberação de metabólitos importantes para o meio externo, bem como a entrada de substâncias, através da membrana, de forma não seletiva (Jones, 1988).

As bactérias lácticas isoladas dos vinhos são particularmente resistentes ao álcool, o que prolonga o período de latência destas bactérias e a duração da fermentação maloláctica. Nos casos de vinhos com teores de álcool acima de 13%, os *Lactobacillus* são os responsáveis pela fermentação maloláctica, pois as outras espécies de bactérias lácticas não sobrevivem a valores elevados de etanol acima de 13% (Pilone, 1975).

O etanal ou aldeído acético é um produto da oxidação do etanol; ele representa cerca de 90% da quantidade total dos aldeídos de um destilado. Seu teor pode variar de 0,003 a 0,030 g/100mL de álcool anidro, conforme a idade do destilado; doses mais elevadas são o resultado de uma sulfitagem dos mostos antes da vinificação (Lafon et al., 1973).

### **Glicerol**

Glicerol é o composto formado a partir da redução da diidroxicetona-fosfato à glicerol-fosfato, o qual é fosforilado e gera glicerol (Lehninger et al., 2000). A produção de glicerol está envolvida com a regulação da produção de

etanol. Em condições normais de crescimento, a maioria da glicose assimilada pela levedura é convertida a etanol. Nesse processo, o  $\text{NAD}^+$  é reduzido a  $\text{NADH}$ , que será reoxidado durante a redução do acetaldeído para a formação de etanol. Uma pequena porção do  $\text{NADH}$  é desviada e usada na redução da diidroxicetona-fosfato, o qual é desfosforilado e gera glicerol. Por um mecanismo de retroalimentação, devido ao excesso de etanol, pode haver um desvio de rota e o  $\text{NADH}$  formado será utilizado para formação de glicerol em vez de etanol (Berry & Brown, 1987).

O glicerol, produto da fermentação alcoólica, é, após o álcool etílico, o constituinte do vinho mais importante, na proporção de 5 a 10 g/l. O sabor adocicado, semelhante ao da glicose, contribui para a maciez do vinho. O teor de glicerol no vinho depende da espécie da levedura, como também de fatores durante o processamento, como temperatura de fermentação, aeração, sulfitação, etc. (Hashizume, 2001).

De acordo com Amerine et al. (1972), a maior parte do glicerol produzido ocorre nos primeiros estágios da fermentação e o rendimento final difere em função a levedura utilizada.

Berg et al. (1955), estabeleceram uma concentração mínima (“threshold”) de 0,38% a 0,44% de glicerol em água.

### *Metanol*

O álcool metílico é um componente natural encontrado em todos os vinhos. Ele se origina das pectinas das uvas, sendo liberado durante o processo de vinificação, portanto, muito comum em vinhos tintos (Rizzon et al., 1986).

O metanol está presente regularmente nos vinhos e destilados em baixos teores e, devido à sua toxicidade, é considerado como elemento prejudicial à saúde. O excesso de metanol ingerido pode ocasionar cegueira ou, mesmo, a morte (Cardoso, 1998). Segundo Crouzet (1986), a quantidade de metanol

formada depende diretamente do teor de pectina da matéria-prima. O teor pode variar de 0,038 a 0,113 g/100 mL de álcool anidro. A legislação brasileira estabelece um máximo de 0,5 g de metanol/100mL de álcool anidro.

### *Álcoois superiores*

Guymon (1978) relatou que a formação de álcoois superiores ocorre paralelamente à produção de etanol e que os principais fatores que influenciam seus níveis são a temperatura de fermentação, a linhagem de levedura, a composição da matéria-prima, a aeração e o material em suspensão. A quantificação dos álcoois 2-metilpropanol, 2-metilbutanol e 3-metilbutanol é atualmente utilizada como um dos critérios de qualidade em vinhos e nos destilados de vinho, sendo o último encontrado em maior quantidade. São geralmente provenientes de reações de degradação de aminoácidos que ocorrem durante o processo de fermentação ou pelas vias de degradação do próprio açúcar, dentro das leveduras (Campos, 2003).

Condições que favorecem alta taxa de crescimento, como temperatura elevada e aeração do mosto, tendem a estimular a produção de álcoois superiores (Berry, 1995) que, em baixas concentrações, desempenham um papel desejável nas qualidades sensoriais das bebidas (Amerine, 1972)

Segundo Hashizume (2001), os álcoois superiores sempre presentes nos vinhos são: 1-propanol, 1-butanol, 2-butanol, 2-metil-propanol, 2-metil-1-butanol, 1-pentanol e 1-hexanol.

Salo et al. (1972) relataram que a concentração mínima (“threshold”) de isobutanol é de 75mg/L e, para álcool isoamílico, 6,5 mg/L.

Segundo Rapp & Mandery (1986), concentrações de álcoois superiores a cerca de 300mg/L contribuem de maneira desejável para a complexidade do vinho; acima de 400mg/L agem de maneira negativa para a qualidade do vinho.

### *Ésteres*

Os ésteres são formados durante a fermentação pelas leveduras, pelas bactérias lácticas e acéticas e durante o envelhecimento. Em baixa concentração são considerados constituintes favoráveis ao aroma do vinho (Hashizume, 2001). Os ésteres são formados por meio de esterificação entre os álcoois e ácidos carboxílicos, durante o processo oxidativo (Maia, 1994).

O principal éster formado durante o processo de fermentação é o acetato de etila (Mateo, 2001).

Segundo Hashizume (2001), além do acetato de etila, outros ésteres são importantes, tais como laurato de etila, butanoato de etila, acetato de amila, acetato de pentila e acetato de hexila.

Segundo Berry (1984), o isolado de levedura, a qualidade do mosto, a temperatura de fermentação, a quantidade de inóculo, a aeração e a agitação do mosto e sólidos em suspensão influenciam na formação dos ésteres.

Durante a fermentação, as leveduras produzem ésteres de cadeia longa e curta (ésteres afrutados). Temperaturas mais baixas favorecem a formação de ésteres afrutados; já temperaturas mais altas favorecem os ésteres de cadeia longa (Ough, 1996).

Cada éster possui um aroma peculiar. Acetato de etila e de butila apresentam aroma frutado; acetato de isoamila e butirato de amila tem aroma de banana, enquanto que os acetatos de álcoois maiores têm aroma cítrico (Maia, 1994).

### *Aldeídos e cetonas*

Aldeídos são compostos muito voláteis e de odor penetrante que afetam o aroma das bebidas alcoólicas. São intermediários da formação dos álcoois, formados pela descarboxilação ou oxidação destes compostos (Campos, 2003) e possuem aromas penetrantes e enjoativos (Maia, 1994).

Os aldeídos são intermediários na produção de álcoois superiores. Condições que favorecem a formação de álcoois superiores também favorecem a formação de pequenas quantidades de aldeídos (Berry, 1995).

Acetaldeído é um dos compostos sensoriais formado durante a vinificação e é originário do metabolismo de leveduras durante a fermentação alcoólica. É altamente volátil e, quando em excesso, proporciona uma cor verde e um aroma de maçã que é usualmente mascarado pela adição de SO<sub>2</sub>. É responsável pelo desenvolvimento da cor nos vinho tintos (Osborne et al., 2000). Ele aparece nos primeiros estágios da fermentação, mas tende a desaparecer nos estágios finais, quando aeração do mosto é menor (Cleto, 1997) ocorrendo a oxidação a ácido acético (Maia, 1994).

Osborne et al. (2000) desenvolveram um trabalho para verificar o potencial de bactérias ácido lácticas (LAB) do gênero *Lactobacillus*, *Oenococcus* e *Pediococcus* em metabolizar acetaldeído, produzindo etanol, visto que o acúmulo deste pode levar à depreciação do vinho. Foi avaliada a degradação do acetaldeído combinado com SO<sub>2</sub> (usado para mascarar os efeitos negativos do excesso de acetaldeído) e também a degradação por meio da fermentação maloláctica ocorrendo simultaneamente com a fermentação alcoólica. Os resultados obtidos mostram que a adição de LAB em vinhos só se torna viável quando são encontrados altos níveis de acetaldeído, visto que a degradação deste foi insignificante. Acetaldeído+SO<sub>2</sub> foi degradado por *Lactobacillus* e *Oenococcus*, embora a taxa de degradação tenha sido pequena. O acetaldeído formado por leveduras na fermentação alcoólica foi degradado por LAB durante a F. maloláctica.

Esta técnica proporciona a fabricação de vinhos sem adição de SO<sub>2</sub>. A importância na degradação do acetaldeído consiste na produção de etanol quando cessa a produção deste por leveduras e também na diminuição do uso de SO<sub>2</sub>, que é prejudicial à saúde, pois, não ocorre seu acúmulo.

Berg et al. (1955) relataram que a concentração mínima (“threshold”) do acetaldeído é de 1,3 a 1,5 mg por litro de água. Mas, em vinho de mesa Hinreiner et al. (1955) encontraram uma concentração mínima (“threshold”) de 0,1 a 0,125 mg. O baixo conteúdo de acetaldeído é freqüentemente associado com a melhoria na qualidade da bebida.

O diacetil é um dos produtos mais importantes do ponto de vista organoléptico. O teor de diacetil foi relativamente alto em vinhos em que ocorrem a fermentação maloláctica, mas sua formação é relacionada indiretamente. Quando sua presença começa a ser detectável pela degustação, ele se torna indesejável (Rankine, 1972).

A concentração de diacetil nos vinhos pode variar de 0,005 a 4 mg/l e pode ser formado e reduzido por leveduras e por bactérias ácido lácticas do vinho em diferentes quantidades. Vinhos tintos, que sofrerão fermentação maloláctica, possuem maiores concentrações de diacetil que vinhos brancos (Henick-Kling et al., 1996). A concentração final de diacetil pode variar em função da prática de fabricação do vinho (Henick-Kling et al., 1996). O acúmulo de diacetil durante a fermentação alcoólica é resultado da descarboxilação oxidativa do  $\alpha$ -acetolactato (Henick-Kling & Martineau, 1995).

Acetoina pode ser formada durante a fermentação, tanto por bactérias ácido lácticas quanto por leveduras, e é muito importante devido o seu envolvimento com o “bouquet” (aroma) do vinho e a biossíntese de 2,3 butanodiol e diacetil. A quantidade de acetoina no vinho varia geralmente em cerca de 80 mg/l, sendo que vinhos tintos tendem a possuir maiores teores que vinhos brancos (Romano & Suzzi, 1996).

## **2.11 Análise química dos vinhos**

A caracterização química das bebidas é necessária para observar se há concordância entre os limites estabelecidos por lei e a concentração presente dos



metabólitos nos produtos obtidos. Para as bebidas fermentadas a partir de frutas tropicais não há legislação específica, baseando-se assim na legislação estabelecida para o vinho e outras bebidas alcoólicas oriundas da fermentação (Dias, 2001).

Por meio da análise química da bebida é possível a verificação da sanidade do produto final obtido, bem como a quantidade de etanol produzido (produto de maior interesse).

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa lugar de destaque devido à sua facilidade de efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas (Jham, 2002). As técnicas cromatográficas baseiam-se na distribuição de um soluto entre duas fases. Uma fase estacionária (líquida ou sólida) é uma fase móvel (gasosa ou líquida). Os solutos em solução atravessam a fase estacionária contida em uma coluna ou placa, deslocando-se com velocidades diferentes em função da afinidade relativa entre as fases, resultando em uma separação. Quando a fase móvel for um gás denomina-se cromatografia gasosa e cromatografia líquida (CLAE) quando a fase móvel for líquida (Ferraz, 2001).

O Ministério da Agricultura (1988) estabelece limites analíticos máximos e mínimos de algumas substâncias, ou a relação entre elas, que podem estar presentes, como, por exemplo, para vinhos de mesa (Tabela 2).

**TABELA 2 Limites analíticos estabelecidos para vinho de mesa**

Índices	Limites	
	Máximo	Mínimo
Álcool etílico (g/L)	13,0	10,0
Álcool metílico (g/L)	0,35	-
Acidez total (meq/L)	130,0	55,0
Acidez volátil (meq/L)	20,0	-
Sulfatos totais, em K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)	1,0	-
Cloretos totais, em NaCl (g/L)	0,2	-
Anidro sulfuroso (SO <sub>2</sub> ) total (g/L)	0,35	-
Cinzas g/L		
Vinhos comuns		
Tinto	-	1,5
Rosado e branco	-	1,3
Vinhos finos e especiais		
Tinto	-	1,5
Rosado e branco	-	1,0
Relação álcool em peso/extrato seco reduzido		
Vinhos comuns		
Tinto	4,8	5,2
Rosado	6,0	6,5
Branco	6,5	6,7
Vinhos finos e especiais		
Tinto	5,2	-
Rosado	6,5	-
Branco	6,7	-
Açúcares totais		
Vinho seco	5	-
Vinho meio seco	20,0	4,0
Vinho suave ou doce	-	20,1

Fonte: Ministério da Agricultura. Portaria n° 229, de 25 de outubro de 1988

Os vinhos tintos geralmente apresentam teores mais baixos de acidez total, quando comparados aos vinhos brancos e o teor de acidez volátil, o qual mede o grau de avinagramento do vinho, deve ser o mais baixo possível.

Os açúcares totais no vinho seco representam os resíduos da fermentação alcoólica. Os vinhos meio seco e suave brasileiros geralmente são elaborados a partir de vinhos secos, pela adição de açúcar na fase de pré-engarrafamento, sendo sua conservação garantida com a utilização de aditivos conservantes ou da pasteurização (Rizzon et al., 1986).

## 2.11 Conservação do vinho

Numerosas mudanças químicas ocorrem em vinhos durante o armazenamento. Estas mudanças podem afetar drasticamente as suas características. Novos componentes do “flavor” podem ser formados, enquanto as concentrações de outros podem aumentar ou diminuir. Essas mudanças podem ser benéficas ou não para a qualidade do vinho (Rapp & Marais, 1993).

O envelhecimento inicia na madeira, depois na garrafa, onde o aroma, a cor e o gosto sofrem profundas modificações (Rosier, 1995). Muitos vinhos têm o sabor melhorado se armazenados por alguns anos. Durante este tempo, a acidez diminui, várias substâncias pouco solúveis acabam precipitando e vários componentes formam complexos, afetando o sabor e o odor. Uma das formas de envelhecimento clássica é feita em barris de carvalho, que são porosos e permitem a entrada de oxigênio e que devem ser renovados a cada safra para evitar a proliferação de microrganismos maléficos.

O vinho também extrai componentes da madeira que influenciam no aroma final. Um dos principais componentes extraídos durante o envelhecimento em barris de carvalho é o cis-isômero conhecido como “oak lactones” [4S,5S-5butil-4-metil-4,5-dihidroxi-2 (3H)-furanone]. Em vinhos Chardonnay a concentração de cis-isômero é correlacionada com o aroma de coco e em vinhos Cabernet Sauvignon com aroma de coco, vanilla, framboesa e chocolate (Pollnitz et al., 1999).

O oxigênio exerce sua função no fenômeno de oxidação que ocorre pelos poros da madeira e da porção dissolvida no vinho. Nessa fase ocorre uma pequena oxidação benéfica, pois melhora a cor, devido à oxidação dos taninos e polimerização das antocianinas. O tempo de envelhecimento depende das propriedades de cada vinho a ser envelhecido. Os vinhos brancos, quando envelhecidos, tendem a perder a qualidade e adquirem características que não são desejáveis (Rosier, 1995).

O envelhecimento na garrafa só acrescenta qualidades em vinhos que tenham potencial para isso. É na garrafa que ocorre o fenômeno de esterificação, no qual se verifica a transformação do aroma em “bouquet” e mudanças na cor devido à polimerização parcial das antocianinas que em ambiente redutor modifica a coloração dos vinhos de tons avermelhados para tons amarronzados. Para que o envelhecimento na garrafa ofereça ao vinho características desejáveis, deve-se tomar cuidados como, por exemplo, manter a garrafa numa posição horizontal durante a armazenagem para que a rolha de cortiça esteja umedecida, e, portanto, inchada, evitando assim as trocas com o meio externo (Rosier, 1995).

Segundo Rizzon et al. (1999), as antocianinas são compostos fenólicos encontrados nas películas das uvas tintas e nos mostos de algumas cultivares tintórias, responsáveis pela cor vermelha dos vinhos tintos jovens. Os vinhos tintos envelhecidos não possuem antocianinas livres, uma vez que essas substâncias se degradam ou se complexam com os taninos

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERINE, M. A.; BERG, H. W. **The technology of wine making**. 3. ed. Westport: The Avi publishing Company, 1972a. cap. 5: Chemistry of fermentation and composition of wine.
- ANDERSEN, O.; ANDERSEN, V. U. **As frutas silvestres brasileiras**. 3. ed. Rio de Janeiro: Globo, 1988. p. 131-135.
- AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. **Biotecnologia- alimentos e bebidas produzidas por fermentação**. São Paulo. Edgard Blucher, 2001. 230 p.
- BERG, H. W.; FILEPELLO, F.; HINREINER, E.; WEBB, A. D. Evaluation of thresholds and minimum difference concentrations for various constituents of wines. I. Water solutions of pure substances. **Food Technology**, Chicago, v. 9, p. 23-26, Jan./Dec. 1955
- BERRY, D. R. Alcoholic beverage fermentations. In: LEA, A. G. H.; PIGGOTT, J. R. **Fermented beverage productions**. London: Blackie Academic & Professional, 1995. Cap. 2, p. 32-44.
- BERRY, D. R. The physiology and microbiology of scotch whisky production. In: BUSHELL, M. E. (Ed.) **Progress in industrial microbiology: modern applications of traditional biotechnologies**. Amsterdam: Elsevier, 1984, v. 19, p. 199-243.
- BERRY, D. R.; BROWN, C. Physiology of yeast growth. In: BERRY, D. R.; STEWART, G. G. (Ed.). **Yeast biotechnology**. London : Allen & unwin, 1987. Cap. 6
- BERRY, D. R.; WATSON, D. C. Production of organoleptic compounds. In: BERRY, D. R.; RUSSEL, I.; STEWART, G. G. (Ed.). **Yeast biotechnology**. London: Allen & Unwin, 1987. cap. 11.
- BRASIL. Decreto n. 2314, de 4 de setembro de 1997, regulamenta a lei nº 8918, de 04 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial** [da República Federativa do Brasil], Brasília, p. 19549, 5 de set. 1997.
- CALDWELL, D. R. **Microbial physiology e metabolism**. Philadelphia: William C. Brown Publishers, 1995. 353 p.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001. 752 p.

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

CAMPOS, C. R.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; VIDAL, J. V. Avaliação do processo fermentativo da bebida alcoólica de jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17., 2002, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 2002.

CARDOSO, M. das G. Análises físico-químicas de aguarentes. In: \_\_\_\_\_. **Produção artesanal de aguardente**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 218 p.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The Fungi**. 2. ed. California: Academic Press, 2001. 588 p.

CLETO, F. V. G. **Influência da adição de ácido sulfúrico e fubá de milho no processo fermentativo, rendimento e composição da aguardente de cana**. 1997. 109 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, SP.

COLAGRANDE, O.; SILVA, A.; FUMI, M. D. Recent Applications of Biotechnology in Wine Production. **Biotechnology Progress**, Washington, v. 10, n. 1, p. 2-8, Mar. 1994. (Review)

CORAZZA, M. L.; RODRIGUES, D. G.; NOZAKI, J. Preparação e caracterização do vinho de laranja. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 449-452, July/Aug. 2001

CROUZET, J. Les enzymes et l'arôme des vins. **Revue Française d'Oenologie**, Paris, n. 102, p. 42-49, 1986

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

DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington, 1997. 768 p.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; GOSTINCAR, A.; ROBERT, R.; URUBURU, F.; QUEROL, A. Selection and molecular characterization of wine yeast isolated from the 'El Penedès' area (Spain). *Food Microbiology*, London, v. 17, n. 5, 558-562, Oct. 2000.

FERRAZ, V. *Cromatografia líquida de alta eficiência*. Viçosa: UFV, 2001. 33 p.

FERREIRA, M. A. M. F. M. *A fermentação Maloláctica*. Vila Real: Instituto Universitário de Trás-Os-Montes e Alto Douro, 1982. 43p.

FLEET, G. H. Microorganisms in food ecosystems *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 50, n. 1/2, p. 101-107, Sept. 1999.

FLEET, G. H. Wine. In: DOYLE, M. P.; BEAUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington, 1997. 768 p.

FRAILE, P.; GARRIDO, J.; ANCÍN, C. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* selected strain in the volatile composition of Rosé wines evolution during fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 48, n. 5, p. 1789-1798, May 2000.

GUYMON, J. F. Chemical aspects of distilling wines into brandy. In: WEBB, A. D. *Chemistry of Winemaking*. Washington: American Chemical Society, 1978. p. 232-253.

HARRISON, D. E. F. Mixed cultures in industrial fermentation processes. *Advances in Applied Microbiology*, San Diego, v. 24, p. 129-164, 1978.

HASHIZUME, T. *Manual prático da fabricação de vinhos de frutas*. Campinas: ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1991. p. 1.

HASHIZUME, T. Tecnologia do vinho. In: AQUARONE, E.; BORZANE, W.; SCHEMEDELL, W.; LIMA, U. de A. *Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos*. 2001. v. 4, 523 p.

HENICK-KLING, T.; MARTINEAU, B. Formation e degradation of diacetyl in wine during alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* strain EC1118 and maloláctica fermentation with *Leuconostoc oenos* strain MCW *American Journal Enology and Viticulture*, Davis, v. 46, n. 4, p. 442-448, Oct./Dec. 1995.



HENICK-KLING, T.; MARTINEAU, B.; ACREE, T. E. The role of diacetyl in Wine Flavor: Metabolism by Yeast and Lactic Acid Bacteria. In: INTERNATIONAL OENOLOGICAL SYMPOSIUM, 11., 1996, Austria. 1996.

HINREINER, E.; FILIPELLO, F.; BERG, H. W.; WEBB, A. D. Evaluation of thresholds and minimum difference concentrations for various constituents of wines. IV. Detectable differences in wine. **Food Technology**, Chicago, v. 9, p. 489-490, Jan./Dec. 1955.

JABUTICABA. **Guia Rural**, p. 331, 1990

JHAM, G. N. **Cromatografia líquida de alta eficiência** Viçosa: UFV, 2002. 104 p.

JONES, R. P. Intracellular ethanol- accumulation and from yeast and other cell. **Fems Microbiology Review**, Amsterdam, v. 54, n. 3, p. 239-258, Sept. 1988.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. (Ed.). **The yeast: a taxonomic study**. 4. ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. p. 79.

LAFON, J.; COUILLAUD, P.; GAY-BELLILE, F. **Le Cognac. Sa distillation**. Paris: Editions J. B. Baillière, 1973. 285 p.

LEE, B. H. **Fundamentals of food biotechnology**. New York: VCH Publishers, 1996. 431 p.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of biochemistry**. 3. ed. Worth, 2000. 1152 p.

MAIA, A. B. R. Componentes secundários da aguardente. **STAB, Açúcar, Álcool e subprodutos**, Piracicaba. v.12, n. 6, p. 29-34, 1994.

MANICA, I. **Frutas nativas, silvestres e exóticas I: Técnicas de produção e mercado** : abiu, aroma-preta, araçá, bacuri, biribá, carambola, cereja-do-rio-grande, jabuticaba. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2000. 372 p.

MATEO, J. J.; JIMÉNEZ, A.; PASTOR, A.; HUERTA, T. Yeast starter cultures affecting wine fermentation and volatiles. **Food Research International**, Amsterdam, v. 34, n. 4, p. 307-314, 2001.

MATTOS, J. L. R. **Fruteiras nativas do Brasil**. Jaboticabeiras, São Paulo: Nobel, 1983. 92 p.



MARTINEAU, B.; HENICK-KLING, T.; ACREE, T. Reassessment of the influence of Malolactic Fermentation on the Concentration of Diacetyl in wines. *American Journal Enology and Viticulture*, Davis, v. 46, n. 3, p. 385-388, Oct./Dec. 1995

MENDONÇA, R. M. N. **Maturação secagem e armazenamento de sementes e propagação vegetativa de jabuitcaba (*Myrciaria* sp.)**. 2000. 136 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Portaria n. 229, de 25 de outubro de 1988. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, p. 20948-20950, 31 maio 1988

MORETTO, E.; ALVES, R. P.; CAMPOS, C. M. T. de; ARCHER, R. M. B. e PRUDÊNCIO, A. J. **Vinhos e vinagres (processamento e análises)**. Florianópolis: Editora de UFSC, 1988.

NARENDRANATH, N. V.; INÉS, S. H.; THOMAS, K. C.; INGLEDOW, W. Effects of Lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, v. 63, n. 11, p. 4158-4163, Nov. 1997.

NURGEL, C.; ERTEN, H.; CANTAS, A.; CABAROGLU, T.; SELLI, S. Contribution by *Saccharomyces cerevisiae* yeasts to fermentation and flavour Compounds in wines from cv. Kalecik Karasi grape. *Journal of the Institute of Brewing*, London, v. 108, n. 1, p. 68-72, Jan./Feb. 2002.

OLIVEIRA, E. de S. **Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais**. 2001. 135 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

OSBORNE, J. P.; ORDUÑA, R. M.; PILONE, G. J.; LIU, S-Q. Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 191, n. 1, p. 51-55, Oct. 2000.

OUGH, C. S. **Tratado básico de enologia**. Tradução de Concepción Llaguno Marchena e Maria Dolores Cabezudo Ibañes. Zaragoza: Acribia, 1996. 294 p. Tradução de: Winemaking basics.

PANEK, A. D. **Pão e Vinho: a arte e a ciência da fermentação**. *Ciência Hoje*, São Paulo, v. 33, n. 195, p. 62-65, jul. 2003

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

PATO, O. **O vinho: sua preparação e conservação**. 7. ed. Lisboa: Livraria Clássica Editora, 1982. 433 p. (Coleção Técnica Agrária)

PEDERSON, C. S. **Microbiology of food fermentations**. Westport: The Avi Publishing Company, 1971.

PELCZAR Jr.; J. M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. 1996. v. 1, 524 p.

POLLNITZ, A. P.; JONES, G. P.; SEFTON, M. A. Determination of oak lactones in barrel-aged wines and in oak extracts by stable isotope dilution analysis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 857, n. 1/2, p. 239-246, Oct. 1999.

PILONE, G. Control of malolactic fermentation in table wines by addition of fumaric acid. In: CARR, J. G.; CUTTING, C. V.; WHITING, G. V. (Ed.). **Lactic acid bacteria in beverages and food**. 1975. P. 121-138.

PRUDÊNCIO, A. J. Vinhos de mesa. **Rev. SBCTA**. Núcleo Reg. de SC. N 09, junho/1969.

QUEROL, A.; BARRIO, E.; HUERTA, T.; RAMÓN, D. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strain. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 9, p. 2948-2958, Sept. 1992.

QUEROL, A.; JIMENEZ, M.; HUERTA, T. Microbiological ecological parameters during fermentation of must from poor and normal grape harvestes in the region of Alicante (Spain). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 6, p. 1603-1606, Nov./Dec. 1990.

QUEROL, A.; RAMÁON, D. The application of molecular techniques in wine microbiology. **Trends in food Science & Technology**, Oxford, v. 7, n. 3, p. 73-78, Mar. 1996.

RANKINE, B. C. Influence of yeast strain and malo-lactic fermentation on composition and quality of table wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, Davis, v. 23, n. 4, p. 152-158, 1972.

RAPP, A.; MANDERY, H. Wine aroma. *Experientia*, Basel, v. 42, p. 873-884, 1986.

RAPP, A.; MARAIS, J. The self life of wines: changes in aroma in substances during storage and ageing of white wines. In: *Shelf life studies of foods and beverages*. 1993. p. 891-921.

RAPP, A.; VERSINI, G. Influence of nitrogen compounds in grapes on compounds of wines. In: *INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN IN GRAPES AND WINES*, p. 156-164, 1991.

RIZZON, L. A.; MIELE, A.; MENEGUZZO, J. Efeito da relação das fases líquida e sólida da uva na composição química e na característica sensorial do vinho Cabernet. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 19, n. 3, p. 424-428, set./dez. 1999.

RIZZON, L. A.; ZANUS, M. C.; MANFREDINI, S. *Como elaborar vinho de qualidade na pequena propriedade*. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 1986. 24 p. (EMBRAPA Uva e Vinho. Documentos, 21)

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

ROSE, A. H. History and scientific basis of alcoholic beverage production. In: ROSE, A. H. (Ed.). *Alcoholic beverages*. London: Academic Press, 1977. v. 1, cap. 1 (Economic Microbiology series).

ROSIER, J. P. *Manual de elaboração de vinho para pequenas cantinas*. 2. ed. Florianópolis: EPAGRI, 1995. 72 p.

SALO, P.; NYKANEN, L.; SUOMALAINEN, H. Odor thresholds and relative intensities of volatile aroma components in artificial beverage imitating whisky. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 37, n. 3, p. 394-398, May/June 1972.

SALTON, M. A.; DAUDAT, C. E.; RIZZON, L. A. Influência do dióxido de enxofre e cultivares de videira na formação de alguns compostos voláteis e na

qualidade sensorial do destilado de vinho. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 20. n. 3, p. 302-308, set./dez. 2000

SILVA, M. A. A. A. de; SILVA, G. A. da. **Leveduras selecionadas para elaboração de vinho**. Bento Gonçalves, RS: EMBRAPA-CNPVU: Centro de pesquisa de uva e vinho, 1987. 19 p.

SOARES, N. B.; POMMER, C. V.; SARMENTO, B. M. de M.; RIBEIRO, I. J. A.; JUNG-MENDAÇOLI, S.; ARAÚJO, A. P.; PEREIRA, R. A. **Jaboticaba: instruções de cultivo**. Porto Alegre, RS. 2001. 33 p.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. 827 p.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. 931 p.

WALKER, G. M. **Yeast: physiology and biotechnology**. Scotland: John Wiley, 1998. 350 p.

## CAPÍTULO 2

### **AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* EM POLPA DE JABUTICABA SABARÁ (*Myrciaria jaboticaba*)**

## 1 RESUMO

AMARAL, Aramália Karam. Avaliação do crescimento de cepas *Saccharomyces cerevisiae* em polpa de jabuticaba sabará (*Myrciaria jaboticaba*). 2004. 128 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

O Brasil é um grande produtor de frutas tropicais, mas grande parte da produção é perdida na fase de pós-colheita, o que acarreta em prejuízos para o produtor. A jabuticabeira, uma espécie originada do centro-sul do Brasil, é um exemplo dessas frutas. A maior parte das jabuticabas é consumida in natura e grande parte é descartada devido, principalmente, ao desconhecimento do seu potencial para a produção de geléias, doces e fabricação de bebidas fermentadas. O objetivo do trabalho foi avaliar o crescimento de quatro isolados de *Saccharomyces cerevisiae* em polpa de jabuticaba sabará (*Myrciaria jaboticaba*). Primeiramente selecionou-se o meio de cultivo ideal para o crescimento dos isolados. Após esta etapa, avaliou-se o crescimento destes no meio previamente escolhido e, por último, a confecção das curvas de crescimento dos isolados que apresentaram melhores rendimentos, (UFC/mg-de AR). As frutas foram coletadas na Fazenda Bocaina, no município de Brumadinho, MG. Os isolados de *Saccharomyces cerevisiae*, codificados como CA1162, CA1183, CA116 e CA1174, pertencentes à coleção do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos da Universidade Federal de Lavras foram inoculados primeiramente nos meios: YEPG (A), YW (B), polpa de jabuticaba 5°Brix + 1% de extrato de levedura autoclavada a 121°C por 15 minutos (C), polpa de jabuticaba 5°Brix + 1% de extrato de levedura autoclavada a 111°C por 10 minutos (D) e polpa de jabuticaba 5° Brix submetida a vapor fluente por 10 minutos (E). Concluiu-se que o meio de cultivo C foi o que mais se assemelhou aos meios sintéticos, em relação ao número de células, tendo o comportamento superior aos meios D e E, sendo, portanto, indicado para a produção de inóculo na fabricação do fermentado de jabuticaba. Avaliando o crescimento dos isolados no meio previamente escolhido (meio C), o isolado CA1174 foi que apresentou melhor crescimento, seguido dos isolados CA1183, CA1162 e CA116. O consumo de sólidos solúveis e açúcares redutores (AR) apresentou decréscimos durante todo o experimento. Entretanto, o isolado CA1162, mostrou-se mais eficiente ao apresentar um menor consumo de AR em relação aos outros isolados. A curva de crescimento foi confeccionada para os isolados CA1174, CA1182 e CA1183, que apresentaram maior rendimento (n° de células/mg AR).

## 2 ABSTRACT

AMARAL, Aramália Karam. Evaluation of the growth of *Saccharomyces cerevisiae* on Sabará jaboticaba pulp (*Myrciaria jaboticaba*) 2004. 128 p. Dissertation (Master in Agricultural Microbiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.

Brazil is a great grower of tropical fruits but much of the production is lost during the post-harvest period, which brings damages for the grower. The jaboticaba tree, a species originated from Center-South Brazil, is an example of those fruits. Most of the jaboticabas are consumed in “natura” and a great part are discarded due, mainly, to the unawareness of its potential for production of jams, sweets and manufacture of fermented beverages. The aim of this work was to evaluate the growth of four isolates of *Saccharomyces cerevisiae* on Sabará jaboticaba pulp (*Myrciaria jaboticaba*). First, the ideal culture medium for the growth of the isolates was selected. After that step, the growth of them in the previously chosen medium and of end, the making of the isolates’ growth curves which presented better yields (CFU/mg of AR). The fruits were harvested on the Bocaina farm in the town of Brumadinho, MG. The isolates of *Saccharomyces cerevisiae*, codified as CA116, CA1174, CA1183 and CA1162 belonging to the collection of the Microbial Physiology Laboratory of the Federal University of Lavras/DBI were inoculated first in the media: YEPG (A), YW (B), jaboticaba pulp of 5° Brix + 1% of yeast extract autoclaved at 121°C for 15 minutes (C), jaboticaba pulp 5° Brix + 1% of yeast extract autoclaved at 111°C for 10 minutes (D) and jaboticaba extract 5° Brix submitted to uninterrupted steam for 10 minutes (E). It was observed that the C culture medium was the one which was similar to the synthetic media in relation to cells number, presenting behaviour superior to the D and E media, and therefore, pointed to the production of inoculum of isolates CA1183, CA1162 and CA116. The consumption of total soluble solids and reducing sugars (RS) decreased throughout the experiment. However, the isolate CA 1162 proved to be more efficient due to smaller consumption of RS relative to the other isolates. The growth curve was made for isolates CA1174, CA1182 and CA1183, which presented greater yield (number of cells/mg RS).

### 3 INTRODUÇÃO

Para a obtenção de bebidas fermentadas utilizando-se leveduras selecionadas, torna-se de extrema importância estabelecer condições de crescimento para os microrganismos que serão inoculados.

Microrganismos são fundamentais no processo de vinificação. Para entender a sua contribuição, é necessário conhecer a identificação taxonômica, o seu comportamento e a cinética de crescimento de cada espécie associada ao processo. A influência das práticas de vinificação sobre o crescimento e atividade dos microrganismos afeta a qualidade sensorial e aceitabilidade do vinho (Fleet, 1997).

Para que ocorra uma multiplicação vigorosa das células, é necessário que as exigências nutricionais sejam supridas, permitindo assim a reprodução e garantindo a viabilidade (Schwan & Castro, 2001).

Para o crescimento microbiano, ou seja, multiplicação celular, é necessário que ocorra a divisão celular. Para microrganismos, vida e crescimento são impossíveis sem a divisão da célula. Entender, pois, o motivo e a maneira como o microrganismo se divide é de extrema importância para o entendimento do processo da vida microbiana e o controle do seu crescimento (Caldwell, 1995).

O cultivo de microrganismos requer meios de cultura apropriados. Os meios de cultivo são preparações que contêm todos os nutrientes utilizados para o crescimento dos microrganismos. Estes elementos são necessários tanto para a síntese como para as funções normais dos componentes celulares. Eles existem na natureza em uma grande variedade de compostos, que são inorgânicos ou orgânicos. Quando os microrganismos são removidos do seu meio e cultivados em laboratório, os microbiologistas utilizam meios que simulam ou até mesmo melhoram as condições naturais. Um dos fatores que devem ser observados é o



fornecimento de elementos químicos essenciais. Os elementos químicos principais para o crescimento da célula incluem carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, enxofre, fósforo, cálcio, potássio, magnésio, além dos micronutrientes e vitaminas (Pelkzar, 1996). Todos estes aspectos tornam os meios de cultura sintéticos onerosos.

Frente a isso, foram testadas, neste trabalho, polpas de jaboticaba sabará (*Myrciaria jaboticaba*) submetidas a diferentes tratamentos, em comparação com os meios sintéticos YW e YEPG, para o crescimento de isolados de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. O objetivo foi o de diminuir os custos de multiplicação dos inóculos para a formação do pé de cuba que será utilizado na obtenção da bebida fermentada, avaliação do crescimento de cada isolado no meio previamente escolhido e confecção da curva de crescimento dos isolados de maior rendimento (nº de células/mg de AR).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Leveduras utilizadas

Quatro cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, codificadas como CA116, CA1162, CA1183 e CA1174 (Figura 1) e pertencentes à coleção de leveduras do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do DBI/UFLA, foram utilizadas para avaliação do crescimento em polpa de jabuticaba submetida a diferentes tratamentos e meios sintéticos YW (em g.l<sup>-1</sup>; extrato de levedura, 3,0; extrato de malte, 3,0; peptona universal, 5,0; e glicose, 10,0) e YEPG (em g.l<sup>-1</sup>; extrato de levedura, 3,0; peptona bacteriológica, 10,0; e glicose, 20,0). As cepas foram isoladas e identificadas por Mendonça (1999) e Fialho (2000).

As leveduras foram primeiramente certificadas quanto à pureza. Partiu-se de uma alíquota da cultura pura, estocada em glicerol a 20%, a -20°C, em congelador, que foi ressuspendida em 2,0 mL de meio YW líquido (em g.l<sup>-1</sup>; extrato de levedura, 3,0; extrato de malte, 3,0; peptona universal, 5,0; e glicose, 10,0). Depois de incubadas a 28°C por 24 horas, uma alçada de cada levedura foi transferida para placas de petri, através de estrias compostas, com meio YW a pH 3,5 acrescido de ampicilina 30 ppm (30 µL .L<sup>-1</sup> ) como agente bactericida. Foram feitas lâminas de cada isolado, observadas em microscópio óptico comum.

Depois de verificada a pureza dos isolados, preparou-se uma cultura estoque de YW líquido (100 mL), que foi mantida sob refrigeração, sendo esta utilizada no decorrer de todo o experimento.

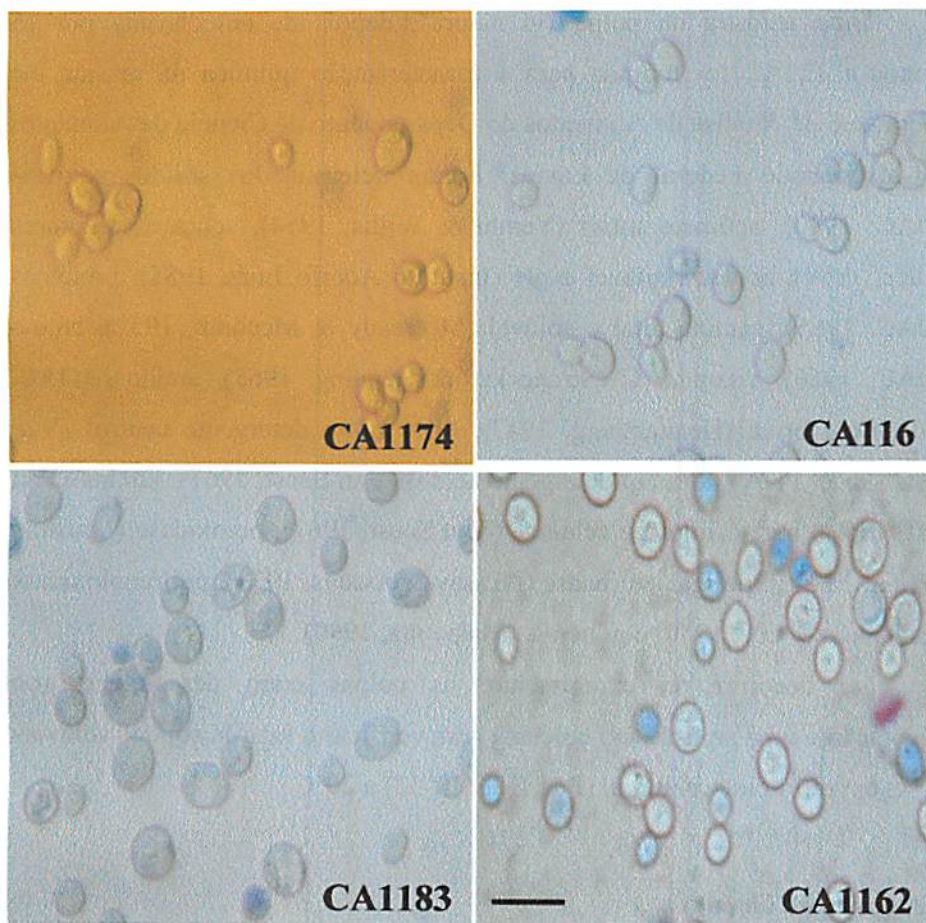



FIGURA 1 Fotomicrografias de isolados de *Saccharomyces cerevisiae*, em meio YEPG, após 24 horas de incubação a 28°C. Barra corresponde a 20µm.

#### 4.2 Coleta das frutas e obtenção do mosto

Os frutos de jaboticaba sabará (*Myrciaria jaboticaba*) foram coletados na Fazenda Bocaina, no município de Brumadinho, MG, no mês de novembro de 2002. Após a coleta, as frutas foram lavadas, secas e prensadas manualmente, obtendo-se a polpa, que foi filtrada em peneiras simples com tela de alumínio, acondicionadas em sacos plásticos e congeladas em freezer.



Uma amostra da polpa “in natura”, depois de autoclavada por 15 minutos a 121°C, foi retirada para a caracterização química da mesma, no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade Federal de Lavras. Foram determinados sólidos solúveis (AOAC, 1990), açúcares totais (Yemm & Willis, 1954), açúcares redutores (Miller, 1959), acidez titulável e pH (Instituto Adolfo Lutz, 1985), proteínas (AOAC, 1965), pectina total e solúvel (McCreedy & McComb, 1952), tanino (AOAC, 1960), vitamina C (Strohecker & Henning, 1965), amido (AOAC, 1990), fibra bruta (Hennenberg, 1947), FDN (fibra detergente neutro) (Van Soest, 1967), FDA (fibra em detergente ácido) (Van Soest, 1967), lignina (Van Soest, 1967), hemicelulose e celulose (Van Soest, 1967), peroxidase (Matsuno & Uritani, 1972), poligalacturonase (Pressey & Avants, 1973), polifenoloxidase (Wissemann & Lee, 1980) e minerais (Malavolta, 1990).

No decorrer do experimento, as polpas eram descongeladas sob refrigeração e uma amostra era coletada para verificar o teor de sólidos solúveis (°Brix) em refratômetro digital (PALETE PR-32) a 20°C.

#### 4.3 Preparo do inoculo

Da cultura estoque de cada isolado de *S. cerevisiae* (CA116, CA1162, CA1183 e CA1174), armazenada sob refrigeração, uma alíquota de 1 mL era transferida para 100 mL de cada meio que seria utilizado no experimento, para que as células passassem por um período de adaptação. Os frascos eram incubados a 28°C, por um período de 24 horas.

## **4.4 Seleção do meio ideal de cultivo para a produção de inóculo (Etapa 1)**

### **4.4.1 Preparo do mosto**

A polpa de jabuticaba diluída a 5°Brix (diluição de acordo com experimentos realizados anteriormente-dados não publicados), foi submetida a diferentes tratamentos: C- polpa acrescida de 1% de extrato de levedura e autoclavada por 15 minutos a 121°C; D- polpa acrescida de 1% de extrato de levedura e autoclavada por 10 minutos a 121°C; E - polpa sem adição de extrato de levedura e submetida a vapor fluente por 10 minutos. Foi avaliado também o crescimento dos isolados em meios sintéticos YW líquido (tratamento B) (em g.l<sup>-1</sup>; extrato de levedura, 3,0; extrato de malte, 3,0; peptona universal, 5,0 e glicose, 10,0) e YEPG (tratamento A) (em g.l<sup>-1</sup>; extrato de levedura, 3,0; peptona bacteriológica, 10,0 e glicose, 20,0). Foram realizadas três repetições para cada tratamento, utilizando-se 250 mL de polpa por frasco.

### **4.4.2 Inoculação**

Cada frasco recebeu 1mL dos isolados de *S. cerevisiae* (CA116, CA1162, CA1183 e CA1174) previamente adaptados e foram incubados a 28°C, sob agitação (30 rpm) em incubadora refrigeradora (Shaker) MA 830/A.

### **4.4.3 Amostragem, análises microbiológicas e químicas**

Para verificação da viabilidade celular, por meio do plaqueamento por microgotas (Romeiro, 2001) em meio YW (em g.l<sup>-1</sup>; extrato de levedura, 3,0; extrato de malte, 3,0; peptona universal, 5,0; e glicose, 10,0), coletaram-se amostras 0 e 24 horas após a incubação. A aferição do °Brix em refratômetro digital (PALETE PR-32) a 20°C foi feita com amostras coletadas em 0, 24 e 48 horas.

#### **4.5 Avaliação do crescimento dos isolados de *Saccharomyces cerevisiae*, no meio de cultivo ideal previamente escolhido (Etapa 2)**

##### **4.5.1 Preparo do mosto**

A polpa de jabuticaba foi diluída a 5 Brix , acrescida de 1% de extrato de levedura e esterilizada a 121°C por 15 minutos. Foram realizadas três repetições para cada tratamento, utilizando-se 250 mL de polpa em cada frasco.

##### **4.5.2 Inoculação**

Cada frasco contendo polpa de jabuticaba foi inoculado com 1mL de cada cultura crescida por 24 horas em meio YW (em g.l<sup>-1</sup>; extrato de levedura, 3,0; extrato de malte, 3,0; peptona universal, 5,0 e glicose, 10,0). Os frascos foram incubados a 28°C sob agitação (30 rpm), em incubadora refrigeradora (Shaker) MA 830/A.

##### **4.5.3 Amostragem, análises microbiológicas e químicas**

Foram coletadas amostras com 0, 7, 14 e 21 horas após a inoculação. Para verificação da viabilidade celular foi realizado o plaqueamento das diluições seriadas por microgotas (Romeiro, 2001) em meio YW. O conteúdo de sólidos solúveis totais (Brix) foi verificado em refratômetro digital (PALETE PR-32) a 20°C. O monitoramento do consumo de açúcares redutores foi realizado pelo método do ácido do dinitrossalicílico (DNS) (Anexo 3A) (Miller, 1959).

#### **4.6 Confeção da curva de crescimento dos isolados que apresentaram maiores rendimentos (UFC/ mg de açúcar redutor) (Etapa 3)**

A curva de crescimento de cada isolado foi observada a partir da inoculação de 1 mL dos isolados CA1162, CA1183 e CA1174 previamente adaptados, em polpa de jabuticaba diluída a 5°Brix , acrescida de 1% de extrato

de levedura e esterilizada a 121 °C por 15 minutos. Foram realizadas três repetições para cada tratamento, utilizando-se 800 mL de polpa por frasco. Os frascos foram incubados a 28°C, sob agitação (30 rpm), em incubadora refrigeradora com agitação TE-422.

Foram coletadas amostras, 0, 3, 6, 9, 12, 15, 22, 29 e 48 horas após a inoculação. Para verificação da viabilidade celular foi realizado o plaqueamento das diluições seriadas por microgotas em meio YW. O monitoramento do consumo de açúcares redutores foi realizado pelo método do ácido do dinitrossalicílico (DNS) (Anexo 3 A) (Miller, 1959).

#### 4.7 Análise estatística

Os dados foram interpretados estatisticamente por meio de análise de variância. As médias foram comparadas, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando software de estatística SISVAR 4.3 (Ferreira, 1999).

Cada isolado de *S. cerevisiae* foi inoculado em três frascos (três repetições). De cada frasco foi retirada: uma amostra para plaqueamento, que era submetida a diluições seriadas, de onde plaqueavam-se três diluições, com três repetições para cada diluição e uma amostra para aferição do °Brix e análise de açúcares redutores (AR) por DNS. Para cada amostra de °Brix eram feitas três leituras em refratômetro digital e, para AR, três leituras em espectrofotômetro.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização química da polpa de jaboticaba sabará (*Myrciaria jaboticaba*)

As Tabelas 1 e 2 apresentam a média dos resultados obtidos em triplicata da caracterização físico-química da polpa de jaboticaba sabará (*Myrciaria jaboticaba*) “in natura” e após a autoclavagem a 121°C, por 15 minutos.

TABELA 1 Caracterização físico-química da polpa de jaboticaba Sabará (*Myrciaria jaboticaba*) “in natura” e após a autoclavagem.

Análises realizadas	Polpa “in natura”	Polpa autoclavada
Proteínas	0,49%	0,45%
Sólidos solúveis	15,90%	15,90%
pH	3,75	3,78
Acidez titulável	0,73%	0,78%
Açúcares redutores (Glicose)	13,85%	12,52%
Açúcares não redutores (sacarose)	3,08%	3,75%
Açúcares totais	17,09%	16,47%
Pectina solúvel	303,86 mg/100g	294,89 mg/100g
Pectina total	611,09mg/100g	564,300 mg/100g
Solubilização	49,00%	52,26%
Tanino	259,580 mg/100g	240,37%
Vitamina C total	47,22 mg/100g	44,77 mg/100g
Amido	0,179%	0,255%
Fibra bruta	0,095%	0,090%
FDN	0,45%	0,29%
FDA	0,27%	0,16%
Lignina	0,10%	0,07%
Hemicelulose	0,180%	0,135%
Celulose	0,18%	0,09%
Peroxidase	40,02u/g/m	36,09u/g/m
Poligalaturonase	36,77%	33,33%
Polifenoloxidase	não teve atividade	não teve atividade



TABELA 2 Minerais presentes na polpa de jaboticaba sabará (*Myrciaria jaboticaba*) "in natura" e após a autoclavagem

Minerais	Polpa "in natura"	Polpa autoclavada
Cálcio	7,20%	7,00%
Fósforo	5,50%	5,20%
Potássio	18,00%	14,00%
Magnésio	1,00%	1,00%
Enxofre	9,00%	5,00%
Nitrogênio	7,30%	8,40%
Cobre	0,260 mg/100g	0,303 mg/100g
Ferro	2,333 mg/100g	1,702 mg/100g
Zinco	1,231 mg/100g	0,935 mg/100g
Sódio	6,144mg/100g	9,389 mg/100g

A polpa de jaboticaba apresentou valor de pH 3,7, o que a caracterizou como uma fruta ácida. A concentração de açúcares totais em torno de 17% realça o potencial da fruta para a fabricação de bebidas na indústria de alimentos. Resultados semelhantes foram encontrados por Dias et al. (2003), ao caracterizarem a polpa de cajá (*Spondias mombin* L.), que apresentou pH 3,3 e 9,4% de açúcares totais, para a fabricação da bebida fermentada e por Corazza et al. (2001) que, na fabricação do vinho de laranja, obtiveram o suco da fruta, com 9,5°Brix e pH 3,64.

Após a autoclavagem da polpa a 121°C por 15 minutos, pode-se destacar o aumento na concentração de amido, de 0,179% para 0,255% e a solubilização que passou de 47,22% para 52,60%.

## 5.2 Seleção do meio ideal de cultivo para produção de inóculo (Etapa 1)

A avaliação da população leveduriforme durante o experimento foi realizada em todos os tratamentos. Os dados apresentados na Tabela 3 referem-se à população inicial, após inoculação de 1 mL de cada isolado que foi previamente adaptado, nos tratamentos a serem testados: A- meio YEPG; B- Meio YW; C- polpa de jabuticaba diluída a 5 Brix acrescida de 1% de extrato de levedura e autoclavada por 15 minutos a 121°C; D- polpa de jabuticaba diluída a 5°Brix acrescida de 1% de extrato de levedura e autoclavada por 10 minutos a 121°C; E- polpa de jabuticaba diluída a 5°Brix sem adição de extrato de levedura e submetida a vapor fluente por 10 minutos.

Foi observado crescimento celular em todos os meios testados após 24 horas de incubação a 28°C sob agitação (Tabela 4). Os dados de crescimento celular encontram-se subtraídos da população inicial. Em análise estatística, por meio do teste de médias (Tukey, a 5% de probabilidade), quando os meios independente dos isolados inoculados foram analisados, observou-se que os meios sintéticos A e B apresentaram melhores condições de crescimento celular seguidos dos meios C, D e E, respectivamente. O meio de cultivo C foi o que mais se assemelhou estatisticamente aos meios sintéticos (Figura 2).

TABELA 3 População inicial de isolados de *S. cerevisiae* inoculados em diferentes tratamentos

Tratamentos	Isolados (UFC x 10 <sup>5</sup> /mL)			
	CA116	CA1162	CA1183	CA1174
A	1,9	20,7	0,26	3,3
B	1,8	37	2,4	2,0
C	6,6	370	0,66	4,5
D	22,5	35	3,4	4,3
E	1,5	1,4	1,5	4,9

TABELA 4 Unidades formadoras de colônia (UFC) x 10<sup>9</sup>/mL de isolados de *S. cerevisiae* em diferentes tratamentos após 24 horas de incubação

Tratamentos	Isolados (UFC x 10 <sup>9</sup> /mL)			
	CA116	CA1162	CA1183	CA1174
A	11,95	37,5	64,9	6,95
B	7,49	6,0	1,39	185
C	25,4	50	4,14	5,0
D	1,74	0,22	5,44	5,0
E	0,199	0,024	0,169	0,23

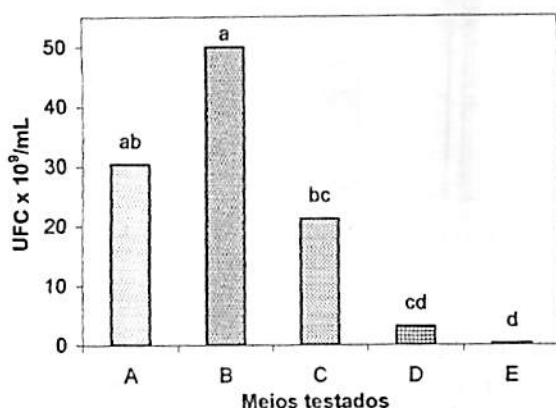


FIGURA 2 Comparação entre os diferentes meios testados, independente do isolado de *S. cerevisiae* inoculado. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Os resultados obtidos para o crescimento dos isolados CA116, CA1162, CA1183 e CA1174 de *S. cerevisiae* em meios sintéticos YEPG (Meio A) e YW (Meio B), após 24 horas de incubação, podem ser observados nas Figuras 3 e 4.

No meio A, os isolados CA1183 e CA1162 (64,9 x 10<sup>9</sup> UFC/mL e 37,5

x  $10^9$  UFC/mL) apresentaram melhores crescimentos seguidos dos isolados CA116 ( $11,94 \times 10^9$  UFC/mL) e CA1174 ( $6,95 \times 10^9$  UFC/mL). No meio B (YW), o isolado CA1174 destacou-se em relação aos outros isolados inoculados, com um aumento de  $185 \times 10^9$  UFC/mL, em relação à população inicial, seguido dos isolados CA116 ( $7,49 \times 10^9$  UFC/mL), CA1162 ( $6,0 \times 10^9$  UFC/mL) e CA1183 ( $1,39 \times 10^9$  UFC/mL), que não diferiram estatisticamente.

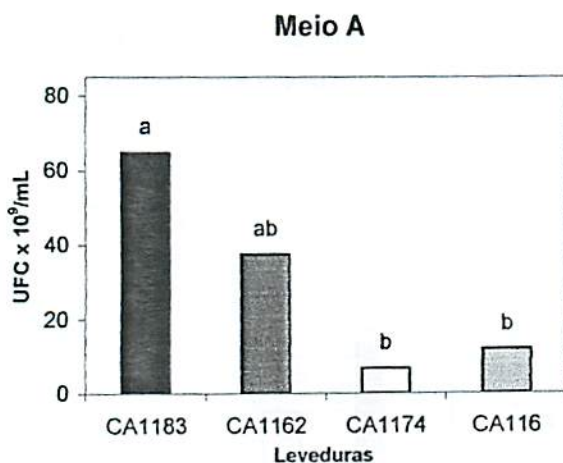


FIGURA 3 Crescimento celular, após 24 horas de incubação, dos isolados de *S. cerevisiae*, inoculados no meio sintético YEPG (Meio A) As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

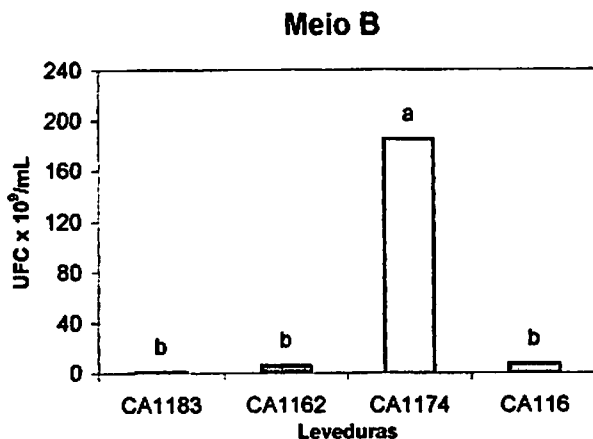


FIGURA 4 Crescimento celular, após 24 horas de incubação, dos isolados de *S. cerevisiae*, inoculados no meio sintético YW (Meio B). As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Na Figura 5, os dados referem-se a UFC x 10<sup>9</sup>/mL dos isolados de *S. cerevisiae* em relação à população inicial nos meios: C- polpa de jabuticaba diluída a 5°Brix acrescida de 1% de extrato de levedura e autoclavada por 15 minutos a 121°C e D- polpa de jabuticaba diluída a 5°Brix acrescida de 1% de extrato de levedura e autoclavada por 10 minutos a 121°C.

A diferença do meio C e D consistiu no tempo de autoclavagem. O meio C foi autoclavado por 15 minutos e meio de cultivo D, por 10 minutos. Apesar da polpa autoclavada sofrer alterações nas suas características físico-químicas em relação à polpa “in natura” (Tabela 1 e 2), o tempo de autoclavagem parece não ter interferido, visto que o meio C apresentou maior número de UFC/mL para todos os isolados analisados em relação ao meio D (Tabela 4 e Figura 5).

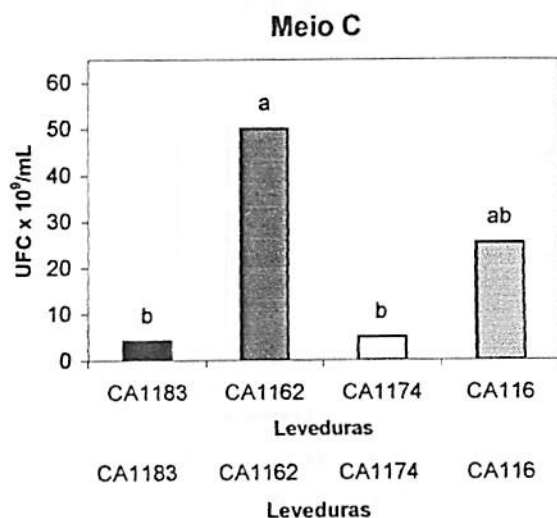


FIGURA 5 Crescimento celular, após 24 horas de incubação, dos isolados de *S. cerevisiae*, inoculados nos meios C e D. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O crescimento das leveduras no meio E (polpa de jabuticaba diluída a 5°Brix sem adição de extrato de levedura e submetida a vapor fluente por 10 minutos) entre os meios testados foi o menor (Tabela 4 e Figura 6), o que pode estar relacionado à ausência de extrato de levedura. O extrato de levedura obtido pela extração aquosa de autólise de leveduras da indústria de bebidas possui um elevado conteúdo de vitaminas e proporciona uma excelente condição de crescimento para um grande número de microrganismos. Usualmente, o extrato de levedura é adicionado aos meios de cultura como uma fonte de vitaminas (MERCK, 2001). O crescimento dos isolados analisados, no meio E, não diferiram estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

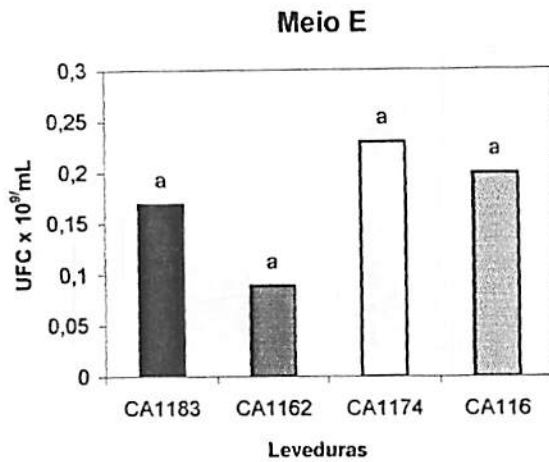


FIGURA 6 Crescimento celular, após 24 horas de incubação, dos isolados de *S. cerevisiae*, inoculados no meio E. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

O consumo de sólidos solúveis pelos isolados CA1183, CA1174 e CA116 pode ser observado nas Figuras 7 e 8. Nos meios C e D houve maior queda do °Brix após 48 horas de incubação, comparados com o meio E, isso pode estar relacionado ao menor número de células presentes nestes meios, como foi observado anteriormente.

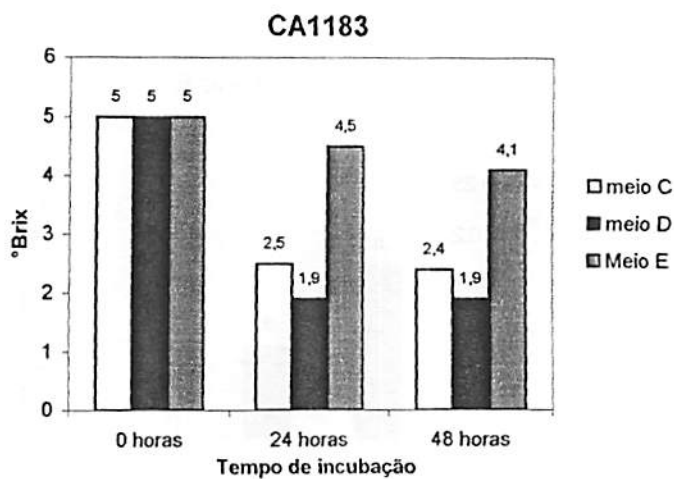


FIGURA 7 Teor de sólidos solúveis (°Brix) em polpa de jabuticaba submetida a diferentes tratamentos térmicos e adição de extrato de levedura, inoculada com o isolado CA1183, de *S. cerevisiae*



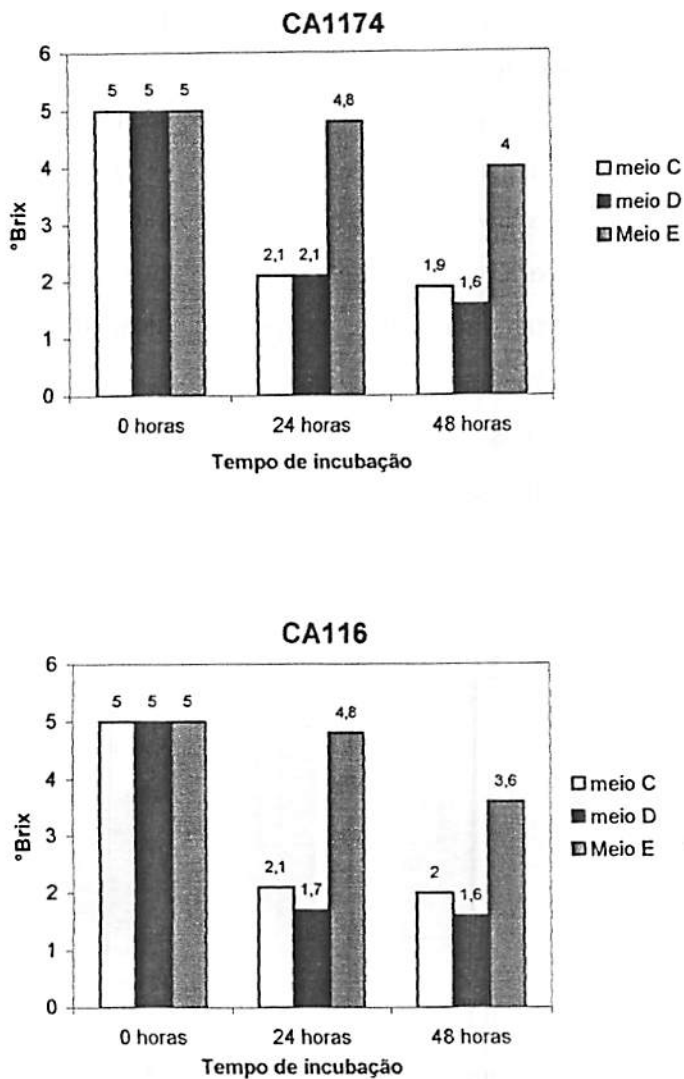


FIGURA 8 Teor de sólidos solúveis (°Brix) em polpa de jabuticaba submetida a diferentes tratamentos térmicos e adição de extrato de levedura, inoculada com os isolados CA116 e CA1174, de *S. cerevisiae*.

O isolado CA1162 apresentou comportamento diferente em relação aos outros isolados, consumindo mais lentamente os sólidos solúveis dos meios testados após 48 horas de incubação (Figura 9). O meio E foi o que apresentou menor decréscimo de sólidos solúveis, quando comparado com os outros meios.

O meio D, para todos os isolados inoculados, foi o que apresentou menor teor de sólidos solúveis após 48 horas de incubação.

Na Figura 10, compararam-se os meios obtidos com a polpa de jabuticaba submetida a diferentes tratamentos, independente dos isolados. O meio C apresentou maior número de células ( $21,13 \times 10^9$  UFC/mL) após incubação por 24 horas, seguido dos meios D ( $3,1 \times 10^9$  UFC/mL) e E ( $0,155 \times 10^9$  UFC/mL). Os meios D e E não diferiram estatisticamente

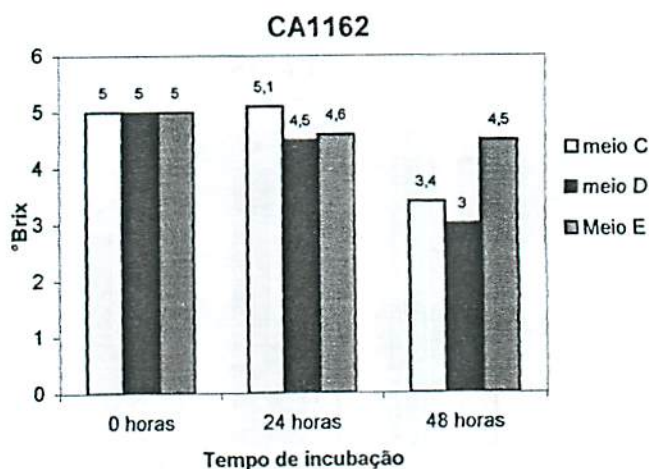
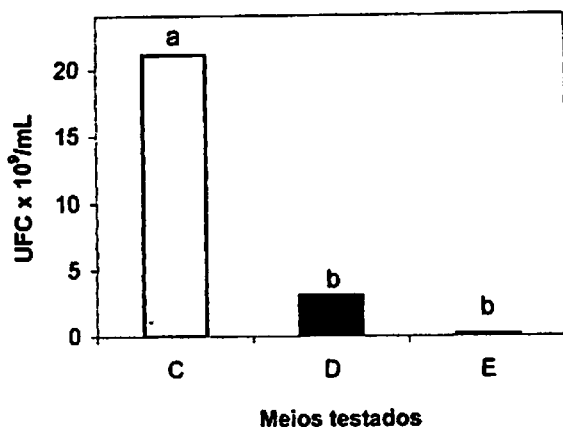


FIGURA 9 Teor de sólidos solúveis (°Brix) em polpa de jabuticaba submetida a diferentes tratamentos térmicos e adição de extrato de levedura, inoculada com o isolado CA1162 de *S. cerevisiae*



**FIGURA 10** Crescimento celular dos isolados de *S. cerevisiae* nos meio obtido de polpa jaboticaba submetida a diferentes tratamentos. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Carvalho et al. (2003), visando o desenvolvimento do inóculo de uma linhagem de *S. cerevisiae*, isolada de uma destilaria do Sul de Minas Gerais, avaliaram a eficiência de dois meios de cultivo na multiplicação do inóculo. Utilizou-se o meio sintético YEPG e caldo de cana 5°B, acrescido de 1% de extrato de levedura. A partir dos resultados obtidos, pôde-se concluir que o meio caldo de cana 5°B, acrescido de 1% de extrato de levedura, é tão eficiente para o crescimento desta linhagem de *S. cerevisiae* quanto o meio sintético YEPG. A utilização de caldo de cana suplementado com extrato de levedura na multiplicação de cepas selecionadas torna menos oneroso o processo de produção de inóculo em escala laboratorial.

### 5.3 Avaliação do crescimento dos isolados de *Saccharomyces cerevisiae* no meio de cultivo ideal previamente escolhido (Etapa 2)

Após inoculação de 1 mL de cada isolado que foi previamente adaptado, em polpa de jabuticaba 5 °Brix + 1% de extrato de levedura esterilizada a 121°C por 15 minutos, obteve-se a população inicial para os isolados CA1183, CA1174, CA1162 e CA116 de  $1,9 \times 10^7$  UFC/mL;  $1,4 \times 10^7$  UFC/mL;  $5,0 \times 10^7$  UFC/mL e  $0,73 \times 10^7$  UFC/mL, respectivamente.

Após 21 horas de incubação, a 28°C sob agitação, foi observado crescimento de todos os isolados no meio inoculado. O isolado CA1174 apresentou o melhor crescimento celular ( $152,98 \times 10^9$  UFC/mL), seguido dos isolados CA1183 ( $21,67 \times 10^9$  UFC/mL), CA1162 ( $12,95 \times 10^9$  UFC/mL) e CA116 ( $7,89 \times 10^9$  UFC/mL) (Figura 11). A população encontrada dos isolados CA1183, CA1162 e CA116 não foram significativamente diferentes.

Com relação ao consumo de açúcares redutores (Tabela 5 e Figura 12), nas primeiras 7 horas de incubação, o consumo foi muito pequeno para todos os isolados analisados. O maior decréscimo foi observado a partir das 7 horas de incubação, para os isolados CA1174 e CA1183, chegando, após 14 horas de incubação com respectivamente, 1,48 e 2,14 mg de AR/mL de mosto. Para os isolados CA116 e CA1162, após 14 horas, a quantidade de AR no mosto foi de respectivamente 22,98 e 43,85 mg/mL de mosto. O maior consumo de AR por parte dos isolados CA1174 e CA1183, nas primeiras 14 horas pode estar relacionado com o maior número de células destes ( $4,69 \times 10^9$  UFC/mL e  $2,75 \times 10^9$  UFC/mL, respectivamente) em relação aos isolados CA116 ( $0,15 \times 10^9$  UFC/mL) e CA1162 ( $0,55 \times 10^9$  UFC/mL). Estes resultados mostraram que a velocidade de crescimento foi diferente entre os isolados. Esta observação pode auxiliar na seleção de inóculos para vinificação ou outro processo fermentativo.

È importante ressaltar que o isolado CA1162 durante todo o período de incubação foi o que apresentou menor consumo de AR, apenas 12,43 mg durante as primeiras de 21 horas de incubação.

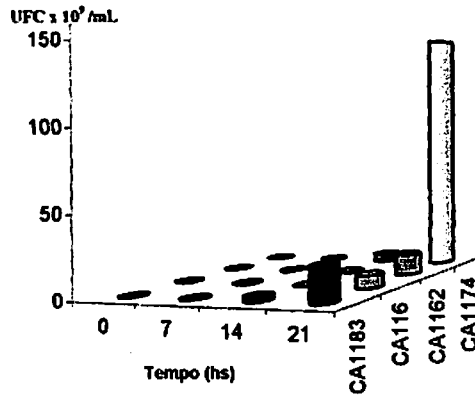
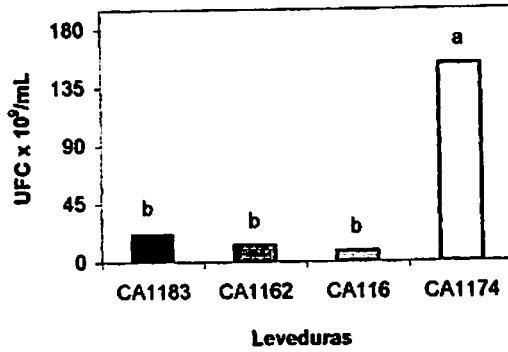


FIGURA 11 Crescimento celular dos isolados de *S. cerevisiae* em polpa de jabuticaba 5° Brix, + 1% de extrato de levedura autoclavada por 15 minutos a 121°C, durante 21 horas de incubação. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

TABELA 5 Valores de açúcares redutores (AR) em mg/mL presentes na polpa de jabuticaba 5°Brix, + 1% de extrato de levedura autoclavada por 15 minutos a 121°C, no período 21 horas, inoculada com os diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae*

Isolados	Valores de AR (mg/mL)			
	0 hora	7 horas	14 horas	21 horas
CA1183	49,87	47,07	2,14	1,34
CA1162	53,00	51,18	43,85	40,57
CA116	46,28	44,15	22,98	0,91
CA1174	48,93	42,70	1,48	1,81

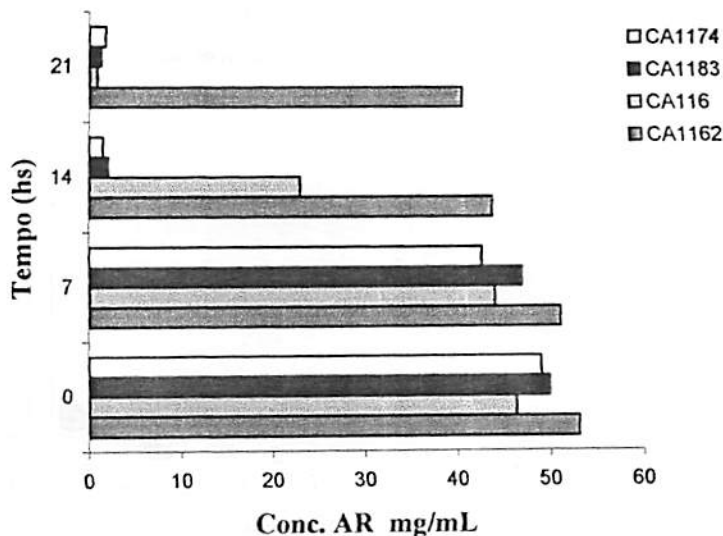


FIGURA 12 Açúcares redutores (AR), em mg/mL presentes na polpa de jabuticaba 5° Brix, + 1% de extrato de levedura autoclavada por 15 minutos a 121°C, no período 21 horas, inoculada com os diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae*.

A Figura 13 representa os valores de sólidos solúveis presentes na polpa de jabuticaba, após 21 horas de incubação. O isolado CA1162 consome mais lentamente os açúcares redutores, como foi observado na etapa anterior.

Com base no cálculo de rendimento obtido pela média da UFC/consumo total de AR, após 21 horas de incubação, observou-se que o isolado CA116 foi o que apresentou menor rendimento  $0,17 \times 10^9$  UFC/mg de AR ( $7,89 \times 10^9$  UFC/45,38 mg de AR). Portanto, este isolado foi descartado para a avaliação da capacidade fermentativa e obtenção da bebida final. O maior rendimento biomassa/AR foi obtido pelo isolado CA1174 ( $3,25 \times 10^9$  UFC/mg de AR), seguido dos isolados CA1162 ( $1,04 \times 10^9$  UFC/mg de AR) e A83 ( $0,45 \times 10^9$  UFC/mg de AR).

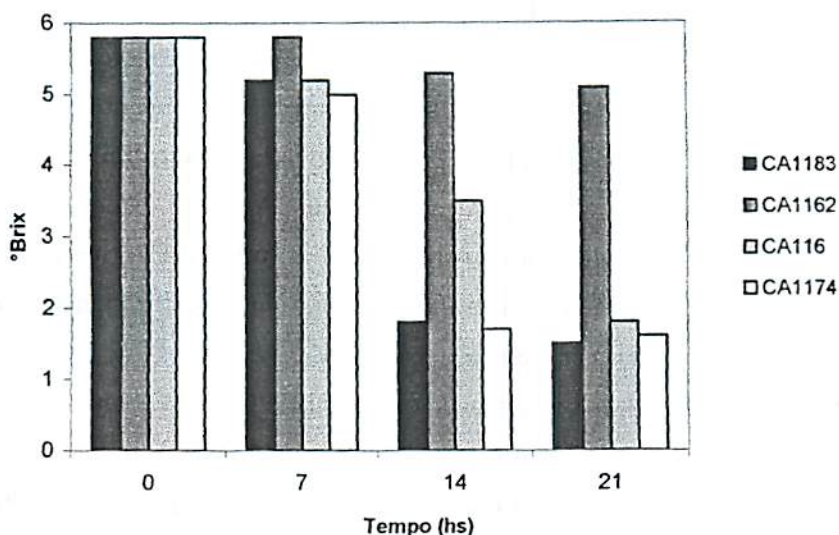


FIGURA 13 Valores de sólidos solúveis (°Brix) encontrados em polpa de jabuticaba 5°Brix, + 1% de extrato de levedura esterilizado por 15 minutos a 121°C, no período 21 horas de incubação, inoculada com isolados de *S. cerevisiae*.

### **5.3 Curva de crescimento dos isolados que apresentaram maiores rendimentos (UFC/ mg de açúcar redutor) (Etapa 3)**

Analizando-se a curva de crescimento dos isolados testados (Figuras 14 e 15), pode-se concluir que nenhuma das leveduras estudadas apresentou fase lag no tempo observado. Isto pode ser explicado pelo fato de os isolados terem passado por um período de adaptação, sendo inoculados na polpa de jabuticaba, incubada sob agitação a 28°C, 24 horas antes de se iniciar o experimento. As células já estavam adaptadas às condições nutricionais do meio e às condições físicas, como a temperatura de incubação e a velocidade de agitação (28 rpm).

As curvas de crescimento diferiram no tempo (hs) das fases log e estacionária. Os isolados CA1174 e CA1183 apresentaram uma fase log de 22 horas; a partir desse período, começaram a apresentar a fase de desaceleração do crescimento, provavelmente entrando na fase estacionária. Esses dados podem ser explicados pela análise dos valores de açúcares redutores presentes na polpa, durante o período de 48 horas. Observa-se pela Figura 16 e Tabela 5, que às 22 horas, a quantidade de açúcares redutores presentes na polpa foi de 0,95 mg/mL para o isolado CA1174 e 0,94 mg/mL para CA1183. Devido à presença de pouca quantidade de açúcares redutores, as células não mais cresceram, mantendo, com isso, o número de células, o que é característico da fase estacionária. Apesar dos isolados mencionados chegarem às 22 horas no fim da fase logarítmica, deve ser ressaltado que o isolado CA1174 apresentou um maior número de células/mL de polpa que o isolado CA1183. Este iniciou a fase de desaceleração do crescimento às 22 horas, com 12,62 log do nº de células e às 29 e 48 horas, apresentou 13,10 e 13,48 log do nº de células, respectivamente e o isolado CA1183, às 48 horas, possuía 11,83 log do nº de células/mL de polpa (Tabela 6).



Analisando-se a curva para o isolado CA1162, verifica-se que não foi possível observar a fase estacionária, durante as 48 horas de incubação. O crescimento desse isolado foi mais lento que os demais e, até 48 horas, apresentou um crescimento ainda crescente (Tabela 6). Às 22 horas foi observado um aumento do número de células,  $4,5 \times 10^8$  (8,65 log do nº de células) para  $7,36 \times 10^{11}$  UFC/mL (11,87 log do nº de células), coincidindo com a queda no consumo de açúcares redutores, de 35,59 para 3,05 mg/mL, o que favoreceu que o isolado CA1162 continuasse crescendo (Figura 16 e Tabela 5).

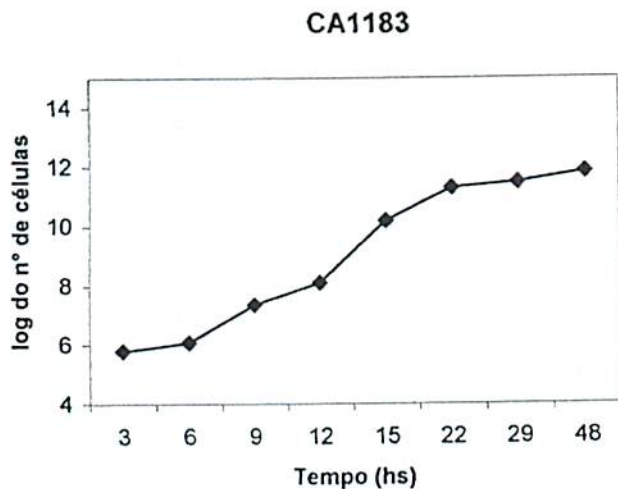
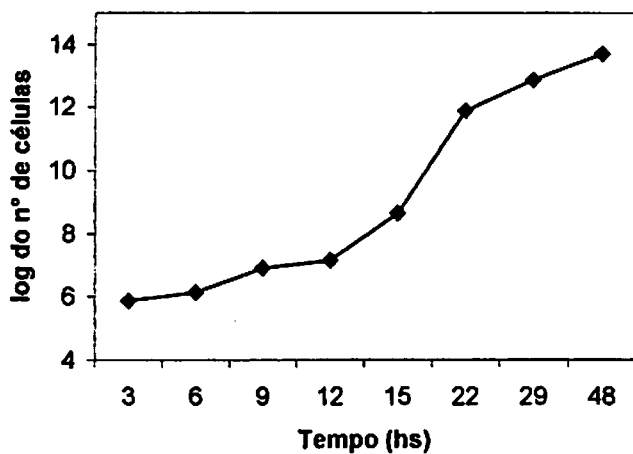


FIGURA 14 Curva de crescimento do isolado CA1183 de *S. cerevisiae* inoculado em polpa de jabuticaba

CA1162



CA1174

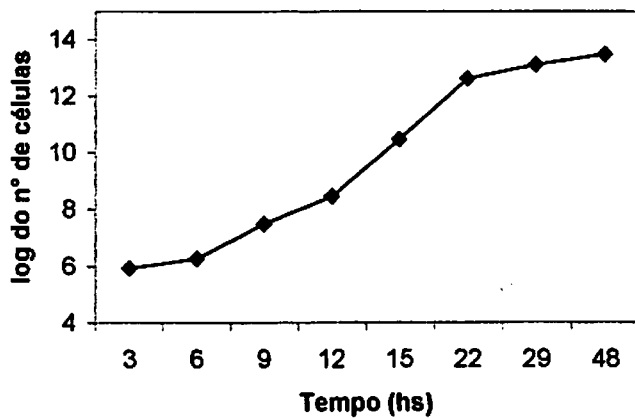


FIGURA 15 Curva de crescimento de isolados de *S. cerevisiae* (CA1174, CA1162) em polpa de jabuticaba.

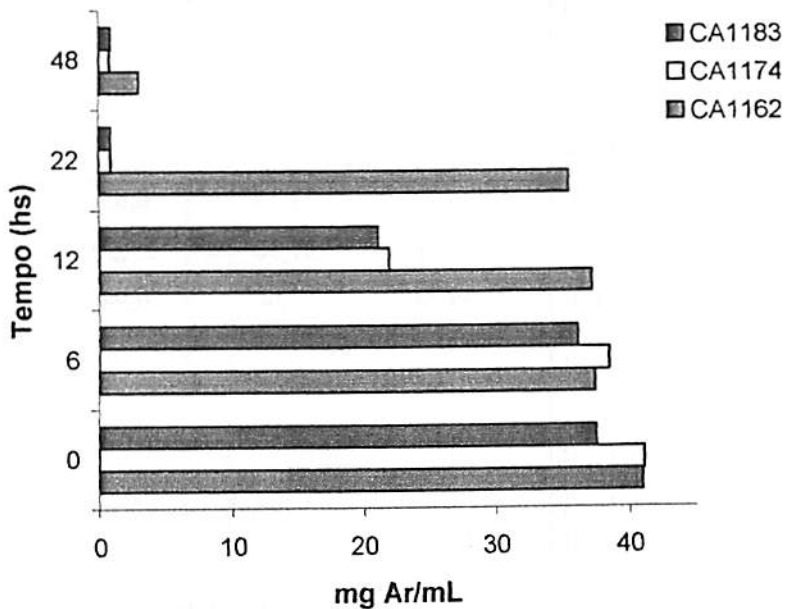


FIGURA 16 Açúcares redutores (AR) em mg/mL, presentes na polpa de jaboticaba 5° Brix, + 1% de extrato de levedura autoclavada por 15 minutos a 121°C, no período 21 horas, inoculada com os diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae*

**TABELA 5 Açúcares redutores (AR), em mg/mL, presentes na polpa jabuticaba 5°Brix, + 1% de extrato de levedura autoclavada por 15 minutos a 121°C, no período 21 horas, inoculada com os diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae***

Isolado	Açúcares redutores (mg/mL)				
	0 hora	6 horas	12 horas	22 horas	48 horas
CA1183	37,50	36,22	21,18	0,95	0,91
CA1162	40,97	37,48	37,30	35,59	3,05
CA1174	41,07	38,54	22,00	0,94	0,83

**TABELA 6 Log do nº de células (UFC) dos diferentes isolados (CA1183, CA1162 e CA1174) inoculados em polpa de jabuticaba 5°Brix, + 1% de extrato de levedura autoclavada por 15 minutos a 121°C, no período de 48 horas**

Isolados	Log do nº de células			
	3 horas	6 horas	9 horas	12 horas
CA1183	5,79	6,07	7,36	8,10
CA1162	5,88	6,13	6,91	7,15
CA1174	5,95	6,28	7,48	8,47
Isolados	15 horas	22 horas	29 horas	48 horas
CA1183	10,20	11,30	11,48	11,83
CA1162	8,65	11,87	12,86	13,70
CA1174	10,70	12,62	13,10	13,48

Martin et al. (1998), com objetivo de obter linhagens de leveduras com características de importância (floculação e não produção de H<sub>2</sub>S) para a indústria vinícola, empregaram a técnica de fusão de protoplasto. Visto que a obtenção de protoplastos em *S. cerevisiae*, bem como em outros gêneros de leveduras ou até mesmo fungos filamentosos, requer o uso das culturas na fase exponencial de crescimento, foi necessário estabelecer a curva de crescimento para as linhagens de *S. cerevisiae* avaliadas (ABXR.11B e IZ 987). Observou-se, por meio da análise da curva de crescimento que, para a linhagem ABXR.11B, o tempo necessário para que a cultura atinja a metade da fase log foi de 15 horas, enquanto que para as linhagens IZ 987 o tempo necessário foi de 21 horas. Esses tempos foram utilizados para a obtenção das células protoplastilizadas.

Os isolados CA1174 e CA1183, como já foi mencionado anteriormente, não apresentaram fase lag, devido à prévia adaptação destes, e o meio da fase log foi de 11 horas para ambos. O que diferenciou em relação às curvas de crescimento, foi que o isolado CA1174 apresentou, durante todo o crescimento, um maior número de células em relação ao isolado CA1183.

## 6 CONCLUSÕES

- O meio de cultivo C (polpa de jabuticaba diluída a 5°Brix acrescida de 1% de extrato de levedura e autoclavada por 15 minutos a 121°C) foi indicado para a produção de inóculo na fabricação do fermentado de jabuticaba em função da maior população celular. A autoclavagem da polpa de jabuticaba não interferiu no crescimento celular dos isolados, apesar de promover pequenas alterações nas características físico-químicas da mesma.
- O isolado CA1174 apresentou o melhor crescimento em polpa de jabuticaba (polpa de jabuticaba 5°Brix, + 1% de extrato de levedura esterilizada a 121°C por 15 minutos).
- O isolado CA116, em comparação com os outros isolados testados, apresentou o menor rendimento em produção de biomassa ou células viáveis.
- O isolado CA1162 mostrou-se mais eficiente ao apresentar um menor consumo de AR (12,92 mg) em relação aos outros isolados (>40mg), para a multiplicação celular, num período de 21 horas.
- A adaptação prévia das células dos isolados de *S. cerevisiae* favoreceu a inexistência da fase lag, confirmando os dados da literatura.
- O isolados CA1174 e CA1183 apresentaram o mesmo tempo de fase log, na análise da curva de crescimento, mas o primeiro possuiu um melhor crescimento celular em polpa de jabuticaba, como foi mencionado acima.
- Devido ao crescimento lento do isolado CA1162, não foi possível visualizar toda a fase log de crescimento.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OFFICIAL OF ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association Official of Analytical Chemists. 9. ed.** Washington, 1960. p. 111.

ASSOCIATION OFFICIAL OF ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association Official of Analytical Chemists. 10. ed.** Washington, 1965. p. 744-745.

ASSOCIATION OFFICIAL OF ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association Official of Analytical Chemists. 15. ed.** Washington, 1990. v. 2, cap. 37, p. 915 e 922.

CALDWELL, D. R. **Microbial physiology e metabolism.** Philadelphia: William C. Brown Publishers, 1995. 353 p.

CARVALHO, F. P.; AMARAL, A. K.; VALLE, R. H. P.; SCHWAN, R. F. Avaliação de meios de cultivos para a produção de inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* para produção de cachaça. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, Florianópolis, SC. *Anais...* Florianópolis, 2003.

CORAZZA, M. L.; RODRIGUES, D. G.; NOZAKI, J. Preparação e caracterização do vinho de laranja. *Química Nova*, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 449-452, July/Aug. 2001

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; LIMA, L. C. O. Metodologia para elaboração de fermentado de cajá (*Spondias mombin* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 23, n. 3, p. 342-350, set./dez. 2003

FERREIRA, D. F. *Sisvar 4.3 - Sistema de análises estatísticas.* Lavras: UFLA, 1999.

FIALHO, C. J. **Identificação de *Saccharomyces cerevisiae* por técnicas moleculares (PCR e PFGE) em uma fermentação de caldo de cana-de-açúcar.** 2000. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FLEET, G. H. Wine. In: DOYLE, M. P., BEAUCHAT, L. R., MONTVILLE, T. J. **Food microbiology fundamentals and frontiers.** 1997. 768 p.

HENNEMBERG, G. Landw Vers. Sta., 6: 1864. In: Winton, A. L. & Winton, K. V. **Analysis de alimentos**. Buenos Aires, Hispano Americana, 1947. p. 76.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolf Lutz: métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. 3. ed. São Paulo, 1985. v. 1, p. 27.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behaviour of peroxidase isoenzymes in sweet potato root issue injured by cutting black root. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 13, n. 6, p. 1091-1101, 1972.

MCCREADY, R. M.; MCCOMB, E. A. Extration and determination total pectin material in fruits. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 24, n. 12, p. 1586-1588, Dec. 1952.

MARTINS, C. V. B.; HORII, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Fusão de protoplasto de *Saccharomyces cerevisiae* avaliada por floculação e produção de H<sub>2</sub>S. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, n. 1, p. 64-72, jan./abr. 1998.

MENDONÇA, A. T.; SCHWAN, R. F.; SANCHES, N. M.; DIAS, D.; WHEALS, A. E. Avaliação Fisiologia da Leveduras Fermentativas de Caldo de cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA SALVADOR, 20., 1999, Salvador, BA. **Resumos...** Salvador, 1999. 269 p.

**MICROBIOLOGY MANUAL**, MERCK, 2001. 407 p.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

PELCZAR Jr.; J. M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. 1996. v. 1, 524 p.

PRESSEY, R.; AVANTS, J. K. Separation and characterization of the endopolygalacturonase and exopolygalacturonase from peaches. **Plant Physiology**, Rockville, v. 52, n. 3, p. 252-256, Sept. 1973.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 2001. 279 p.



SCHWAN, R. F.; CASTRO, H. A. Fermentação alcoólica. In: CARDOSO, M. das G. (Ed.). **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. Lavras: UFLA, 2001. p. 89-96.

STROHECKER, R.; HENNING, H. M. **Vitamins assay: tested methods**. Stuttgart: Verlag. 1965. p. 427-251.

WISSEMAN, K. W.; LEE, C. Y. Polyphenoloxidase activity during grape maturation and wine production **American Journal of Enology And Viticulture**, Davis, v. 31, n. 3, p. 206-211, 1980.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, London, v. 57, n. 3, p. 508-514, 1954.

## **CAPÍTULO 3**

### **AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FERMENTATIVA DE ISOLADOS DE *Saccharomyces cerevisiae* EM POLPA DE JABUTICABA (*Myrciaria jaboticaba*) E ANÁLISE DA BEBIDA FINAL**

## 1 RESUMO

AMARAL, Aramália Karam **Avaliação da capacidade fermentativa de isolados de *Saccharomyces cerevisiae* em polpa de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) e análise da bebida final.** 2004. 128 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

As jaboticabeiras são originárias do Brasil e apresentam dispersão natural, sendo comumente encontradas nos quintas de casas, sítios e fazendas. Tornar o vinho de jaboticaba, cuja fabricação é extremamente caseira e oriunda da fermentação espontânea, uma atividade comercial por meio de adaptações do processo de fabricação de vinhos, seria de extrema importância para evitar desperdícios da fruta, gerar lucros e valorizar a fruticultura do nosso país, além de preservar a espécie. O objetivo deste trabalho foi à avaliação de isolados de *Saccharomyces cerevisiae* com base nas propriedades fermentativas, bem como a obtenção da bebida e sua análise química e sensorial para posterior definição do processo de produção e indicação de uma levedura selecionada para a fabricação da bebida fermentada de jaboticaba. As frutas foram coletadas na Fazenda Bocaina no município de Brumadinho, MG. Os isolados de *Saccharomyces cerevisiae*, codificados como CA1162, CA1183, e CA1174, pertencentes à coleção do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos da Universidade Federal de Lavras/DBI, foram inoculados nos frascos contendo meio de polpa de jaboticaba diluída a 10°Brix e esterilizada por 15 minutos a 121°C, de maneira que se obtivessem 10<sup>8</sup> células/mL. Todo o processo fermentativo foi realizado 24°C. O crescimento celular foi avaliado por meio do plaqueamento das diluições seriadas em meio YW, o teor de sólidos solúveis (°Brix) foi obtido com auxílio do refratômetro digital e os açúcares redutores (AR) pelo método do Ácido dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959). As análises de acidez total e volátil e teor alcoólico foram realizadas no Laboratório de Enologia e Viticultura (Fazenda Experimental da EPAMIG, Caldas, MG, Brasil). A aceitação da bebida foi feita por 46 provadores não treinados, utilizando-se escala hedônica de 9 pontos, sendo os dados avaliados pelo teste Chernoff, não paramétrico, utilizando o programa Statistica. As bebidas produzidas apresentaram um baixo teor alcoólico, teor de açúcar e acidez. Por cromatografia gasosa (CG), foi detectado concentrações de álcool isoamílico e traços de metanol, nas bebidas. A análise sensorial indicou ser a bebida produzida pelo isolado CA1174 a de melhor aceitação, sendo este, portanto, indicado para a fabricação da bebida fermentada de jaboticaba.

## 2 ABSTRACT

AMARAL, Aramália Karam. **Evaluation of the fermentative capacity of *Saccharomyces cerevisiae* isolates on jaboticaba pulp (*Myrciaria jaboticaba*) and analysis of the final beverage.** 2004. 128 p. Dissertation (Master in Agricultural Microbiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.

Jaboticaba trees are native to Brazil and present natural spread. These fruits are commonly found in the house backyards, small estates and farms. There is a home-made jaboticaba wine being produced in small towns in Brazil which are originated from the spontaneous fermentation, through out an adaptation of the wine-making process. The study of better fermentation process would be of extreme importance to avoid wastage of the fruit, to generate profits and value the fruit growing of country, in addition to preserving the species. The objective of this process was the evaluation of the *Saccharomyces cerevisiae* isolates on the basis of the fermentative properties as well as the obtaining of the beverage and its chemical and sensorial analysis for the posterior definition of the manufacturing process and indication of a yeast selected for the manufacture of the fermented jaboticaba beverage. The *Saccharomyces cerevisiae* isolates, codified as CA116, CA1174, CA1183 and CA1162 belonged to the collection of the Microbial Physiology Laboratory of the Federal University of Lavras/DBI were inoculated into the flasks containing jaboticaba pulp medium diluted at 10° Brix and sterilized at 15 minutes at 121 °C in such a way that 10<sup>8</sup> cells/ml could be obtained. All the fermentative process was performed at 24 °C. The cell growth was evaluated through the plating of the serial dilutions in YW medium, the total soluble solids content (°Brix) was measured with the aid of the digital refractometer and reducing sugars (RS) through the dinitrosalicilic acid (DNS) method (Miller, 1959). The analyses of total and volatile acidity and alcohol content were done in the Enology and Viticulture Laboratory (Experiment Farm of the EPAMIG, Caldas-MG, Brazil). The acceptance of the beverage was done by 46 untrained tasters by utilizing the 9-score hedonic scale, the data being evaluated by the Chernoff test, non-parametrical, utilizing the Statística program. The beverages produced presented a low alcohol content, sugar content and acidity. The Gas Chromatography analysis indicated high concentrations of isoamyl alcohol and traces elements of methanol in the final beverages. The sensorial analysis indicated the isolate CA1174-produced beverage to be the one of best acceptance, this being, therefore, indicated for the manufacture of the fermented jaboticaba beverage.



### 3 INTRODUÇÃO

A história mostra que o vinho surgiu da necessidade de conservar a uva no período pós-safra, sendo resultado da transformação da matéria vegetal viva por microrganismos (Pato, 1982). Segundo Esteve-Zarzoso et al. (2000), a fermentação para obtenção do vinho é um processo complexo que envolve a transformação do mosto por ação de diferentes leveduras presentes nas uvas e equipamentos vinários.

No Brasil, o uso de leveduras selecionadas tem contribuído para a melhoria na qualidade dos vinhos. No entanto, a inexistência de leveduras nacionais selecionadas para este fim implica a necessidade de importação, o que nem sempre leva o produto ao padrão de qualidade esperado e dificulta a adoção da tecnologia para pequenos e médios produtores. O uso de leveduras selecionadas a partir da microbiota nativa tem maiores probabilidades de apresentar melhores resultados por estarem adaptadas às condições climáticas e práticas culturais específicas da região (Silva & Silva, 1987).

As jabuticabeiras são originárias do Brasil e apresentam dispersão natural, sendo comumente encontradas nos quintais de casas, sítios e fazendas. Tornar o vinho de jabuticaba, cuja fabricação é extremamente caseira, oriunda da fermentação espontânea, uma atividade comercial, por meio de adaptações do processo de fabricação de vinhos, seria de extrema importância para evitar desperdícios da fruta, gerar lucros e valorizar a fruticultura do nosso país, além de preservar a espécie.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi a avaliação de isolados de *Saccharomyces cerevisiae* com base nas propriedades fermentativas, bem como a obtenção da bebida e sua análise química e sensorial.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Leveduras utilizadas

Quatro cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, codificadas como CA116, CA1162, CA1183 e CA1174, pertencentes à coleção de leveduras do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do DBI/UFLA, foram utilizadas para a avaliação do crescimento em polpa de jabuticaba submetida a diferentes tratamentos e meios sintéticos YW (em g.l<sup>-1</sup>; extrato de levedura, 3,0; extrato de malte, 3,0; peptona universal, 5,0 e glicose, 10,0) e YEPG (em g.l<sup>-1</sup>; extrato de levedura, 3,0; peptona bacteriológica, 10,0; e glicose, 20,0). As cepas foram isoladas e identificadas por Mendonça (1999) e Fialho (2000).

As leveduras foram primeiramente certificadas quanto a pureza. Partiu-se de uma alíquota da cultura pura, estocada em glicerol a 20%, a -20°C, em congelador, que foi ressuspendida em 2,0 mL de meio YW líquido (em g.l<sup>-1</sup>; extrato de levedura, 3,0; extrato de malte, 3,0; peptona universal, 5,0 e glicose, 10,0). Depois de incubada a 28°C por 24 horas, uma alçada de cada levedura foi transferida para placas de petri, por meio de estrias compostas, com meio YW a pH 3,5 acrescido de ampicilina 30 ppm (30 µL .L<sup>-1</sup>) como agente bactericida. Foram feitas lâminas de cada isolado e observadas em microscópio óptico comum.

Depois de verificada a pureza dos isolados, preparou-se uma cultura estoque de YW líquido (100 mL), que foi mantida sob refrigeração e utilizada no decorrer de todo o experimento.

#### 4.2 Coleta das frutas e obtenção do mosto

Os frutos de jaboticaba sabará (*Myrciaria jaboticaba*) foram coletados na Fazenda Bocaina, no município de Brumadinho, MG, no mês de novembro de 2002. Após a coleta, as frutas foram lavadas, secas e prensadas manualmente, obtendo-se a polpa, que foi filtrada em peneiras simples com tela de alumínio, acondicionadas em sacos plásticos e congeladas em freezer.

No decorrer do experimento, as polpas eram descongeladas sob refrigeração e uma amostra era coletada para verificar a quantidade de sólidos solúveis (°Brix) em refratômetro digital (PALETE PR-32) a 20°C.

#### 4.3 Preparo do mosto

A polpa de jaboticaba foi diluída a 10 °Brix e autoclavada por 15 minutos a 121°C. foram feitas três repetições para cada tratamento, utilizando-se 1600mL de polpa por frasco,

#### 4.4 Inoculação

Cada frasco foi inoculado com 100 mL dos isolados de *S. cerevisiae* (CA1162, CA1183 e CA1174) previamente adaptados de maneira que se obtivessem no mínimo, 10<sup>8</sup> células/mL no volume total 1.600 mL (1.500 mL de polpa + 100 mL de inóculo) e foram incubados a 24°C em câmara de incubação B. O. D. MOD 347 CD.

#### 4.5 Coleta das amostras

No primeiro dia de fermentação foram feitas 4 coletas com intervalos de 6 horas para todos os isolados, do 2º ao 4º dia de fermentação coletaram-se amostras de 12 em 12 horas; a partir do 5º dia de 24 em 24 horas, até a estabilização do °brix. Para a verificação da viabilidade celular foram feitos o plaqueamento por espalhamento em meio YW (em g.l<sup>-1</sup>; extrato de levedura, 3,0; extrato de malte, 3,0; peptona universal, 5,0 e glicose, 10,0), a aferição do Brix

em refratômetro digital (PALETE PR-32) a 20°C, pH em pHgâmetro Micronal B 474, e o monitoramento do consumo de açúcares redutores pelo método do ácido do dinitrossalicílico (DNS) (Anexo 3A) (Miller, 1959). As amostras para cromatografia foram centrifugadas e armazenadas em freezer para posteriores análises.

#### **4.6 Obtenção da bebida**

Após a estabilização do brix (índice do fim da fermentação), os vinhos foram transferidos para recipientes limpos, eliminando o excesso da borra formada. Estes foram submetidos ao processo de colagem, trasfega e filtração.

##### **4.6.1 Colagem**

Preparou-se uma solução a 10% em água, pulverizando o pó de bentonite sobre água para que se obtivesse uma solução cremosa e homogênea, (Rosier, 1995) (para evitar a formação de grumos recomenda-se agitar permanentemente com auxílio de um liquidificador, segundo (Rizzon et al., 1986) deixando-a em repouso por 24 horas para que ocorresse a expansão do volume (Rosier, 1995). Hashizume (2001), recomenda o intumescimento da bentonite em água quente (50°C) e ir colocando o pó ou os grânulos de bentonite, pouco a pouco, na superfície do líquido em agitação, e nunca ao contrário – a água no produto, para evitar a formação de grumos.

A bentonite foi adicionada ao mosto na concentração de  $1\text{g.L}^{-1}$  (Vogt et al., 1984).



## **Trasfega**

O vinho após a adição da bentonite, foi colocado à temperatura de 10°C para facilitar a sedimentação do material sólido. Depois de 10 dias sob esta temperatura, foi feita uma trasfega na bebida com aeração (oxigênio), o qual possui efeitos benéficos para favorecer a completa fermentação do açúcar e desprender o excesso de gás carbônico e o ácido sulfúrico que estiver presente (Rizzon et al., 1986). Após esta primeira trasfega, a bebida foi recolocada à temperatura de 10°C por mais 30 dias e foi realizada uma segunda trasfega sem aeração. A bebida ficou mais 10 dias sob temperatura de 10°C (Dias, 2001).

## **Filtração**

Após os 10 últimos dias à temperatura de 10°C, as bebidas foram filtradas sob vácuo em frasco tipo Kitassato, de 4 litros de volume, ao qual foi acoplado um funil tipo Büchner, utilizando filtro de celulose (Dias, 2001).

Parte das bebidas filtradas foi armazenada em tonéis de carvalho com capacidade para 2 litros, para o envelhecimento e posterior análise sensorial e química. Segundo Pato (1982), o vinho, com a idade, evolui no sentido de sua valorização; ele afina no aspecto e no gosto, tornando-se mais suave e macio, mais aromático e delicado, ou seja, o vinho sofre o amadurecimento, ocorrendo uma mudança progressiva da cor.

Para as análises químicas, um litro das bebidas foi armazenado em garrafas, sob refrigeração (12°C).

#### **4.7 Análise da bebida final**

As bebidas foram analisadas à temperatura ambiente, após terem sido retiradas do refrigerador com, pelo menos, 24 horas de antecedência. As análises de acidez total e volátil e teor alcoólico (Brasil, 1985) foram realizadas no Laboratório de Enologia e Viticultura (Fazenda Experimental da EPAMIG, Caldas, MG, Brasil). As análises de tanino (AOAC, 1960), pectina total e solúvel (McCreedy & McComb, 1952), de sólidos solúveis (AOAC, 1990), de pH e acidez titulável (Instituto Adolfo Lutz, 1985), de açúcares redutores (Miller, 1959) e de açúcares totais (Yemm & Willis, 1954) foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

##### ***Acidez total***

A concentração total de ácidos (fixos e voláteis) das bebidas foi determinada por titulometria, pela qual um volume definido de amostra foi titulado com hidróxido de sódio 0,1N, tendo como indicador de ponto final de titulação a solução alcoólica de fenolftaleína a 1%, segundo metodologia descrita por Brasil (1985). Os resultados foram expressos em miliequivalentes de ácido acético por litro de bebida ( $\text{meq}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

##### ***Acidez volátil***

Um volume de amostra foi destilado por arraste de vapor e foram recolhidos dez vezes o volume de destilado num frasco tipo Erlenmyer. O destilado foi, então, titulado com solução de hidróxido de sódio 0,1N em solução alcoólica de fenolftaleína 1% como indicadora, segundo metodologia descrita por Brasil (1985). Os resultados foram expressos em miliequivalentes de ácido acético por litro de bebida ( $\text{meq}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

### ***Teor alcoólico***

O teor alcoólico, ou grau alcoólico foi obtido seguindo-se a metodologia proposta por Brasil (1985), segundo a qual um volume da amostra é destilado e três quartos do volume são recuperados e recompostos ao volume tomado para análise. Este volume foi resfriado a 20°C e o grau alcoólico foi determinado usando-se um alcoômetro de Gay-Lussac, cuja escala variava de 0°GL a 30 °GL, aferido àquela temperatura (Dias, 2002).

### ***Análises cromatográficas***

As análises cromatográficas foram realizadas no cromatógrafo gasoso (CG), pertencente ao Laboratório de Aguardente do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras. Foi avaliada a presença de metanol e quantificação de álcoois superiores (Isobutanol, Butanol, isoamílico, amílico e hexanol) nas amostras das bebidas. O cromatógrafo utilizado foi da marca Shimadzu, modelo 17A, equipado com detector de chama ionizada. As amostras de vinho, previamente filtradas em filtro milipore 0,22 µm, foram injetadas (1 µL) nas seguintes condições de operação: detector e injetor operando a 130°C e 150°C, respectivamente; coluna capilar (DB-WAX, 30 m, 0,25 mm de diâmetro, fase estacionária polietileno glicol) operando em gradiente de temperatura (60 °C por 2,5 minutos; elevação de 2,0 °C. min<sup>-1</sup> até chegar a 80°C e permanecendo a 80°C por 2 minutos). O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio com fluxo de 1,6123 mL/min, a pressão foi de 17,0 psi e o split foi de 1:30. A concentração dos álcoois superiores foi determinada pela de curva padrão do método do padrão externo.

#### **4.8 Análise sensorial da bebida**

Para os testes de aceitabilidade da bebida foram selecionados 46 provadores não treinados que gostavam de bebidas secas (teor de açúcar inferior

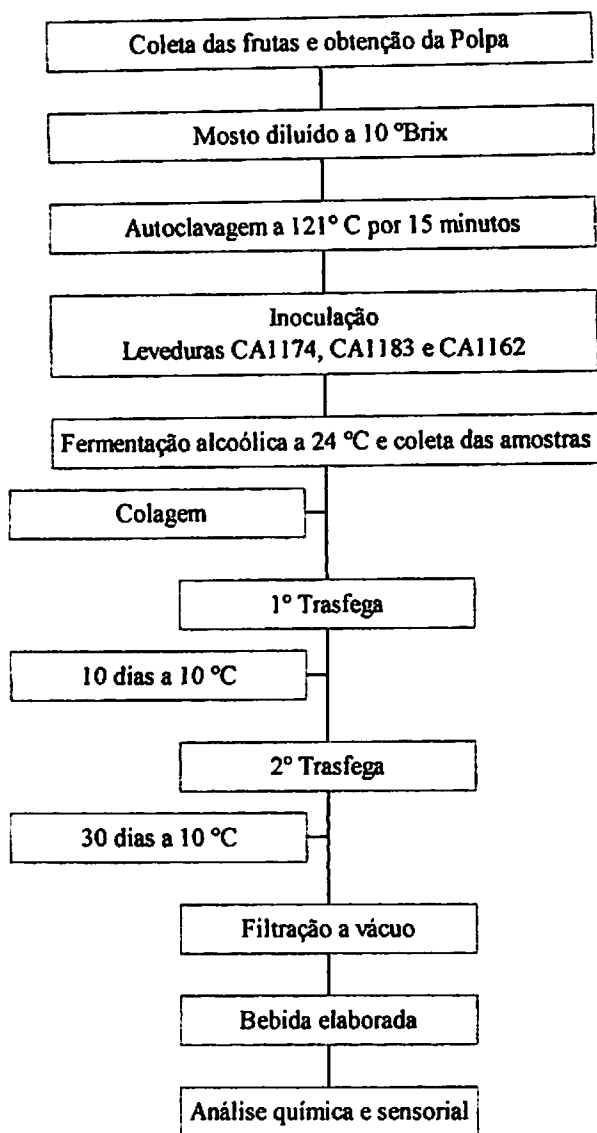
a 5g/L). O corpo de provadores constitui-se de alunos, professores e funcionários da Universidade Federal de Lavras, com faixa etária entre 18 anos e 60 anos, de ambos os sexos.

Cada um dos provadores experimentou 20 mL de cada uma das bebidas que foram codificadas como 1, 2 e 3 para a bebida produzida com o isolado CA1174, CA1183 e CA1162 respectivamente. As amostras foram servidas, separadamente, à temperatura de 10°C, em copos plásticos descartáveis. Foi solicitado que os provadores tomassem água entre uma amostra e outra. Para cada uma das amostras, os provadores preencheram uma ficha de avaliação na forma de escala hedônica de 9 pontos (Moraes, 1993). Em um primeiro julgamento, os provadores avaliaram os atributos separadamente (aroma, aparência e sabor) (Anexo, 1A). O segundo julgamento foi em relação à aceitação global da bebida (Anexo, 1B).

#### **4.8.1 Análise estatística**

As análises estatísticas da aceitação das bebidas produzidas foram feitas a partir do teste de Chernoff (não paramétrico) e o teste de escala hedônica, utilizando-se os softwares Statistica (StasoftInc, 1995) e SISVAR 4.3 (Ferreira, 1999), respectivamente.

A Figura 1 representa o fluxograma do processo de elaboração da bebida fermentada de jabuticaba.



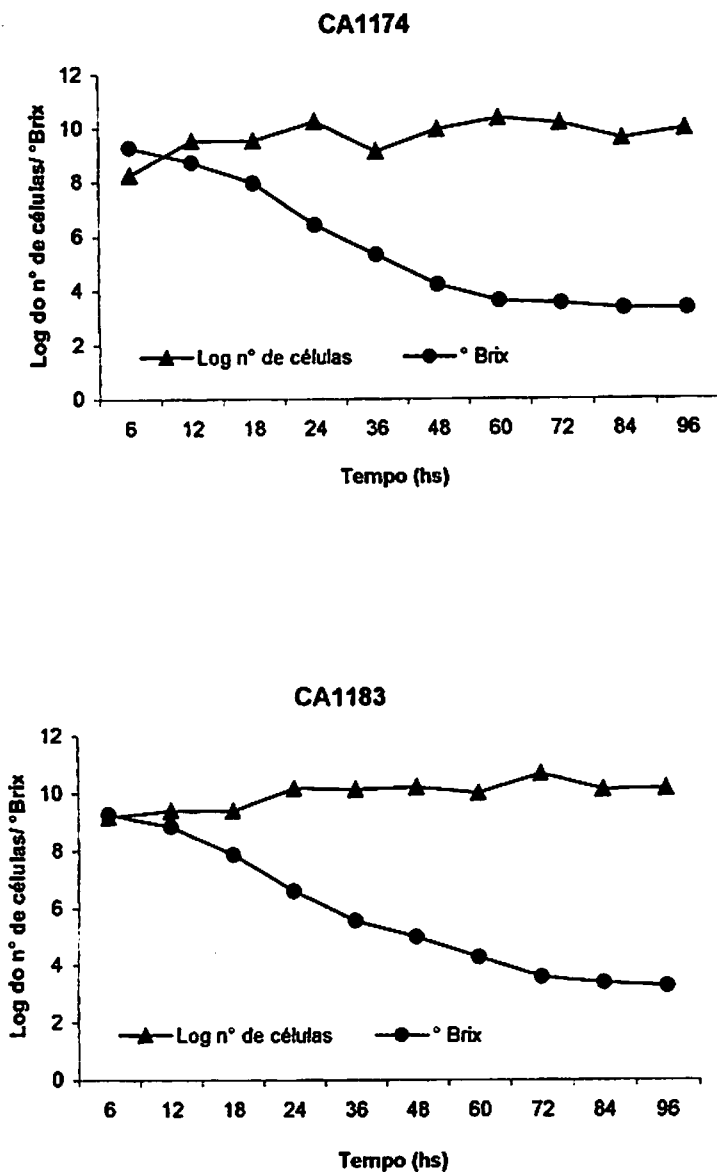
**FIGURA 1** Fluxograma do processo de elaboração da bebida fermentada de jaboticaba

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação da capacidade fermentativa dos isolados

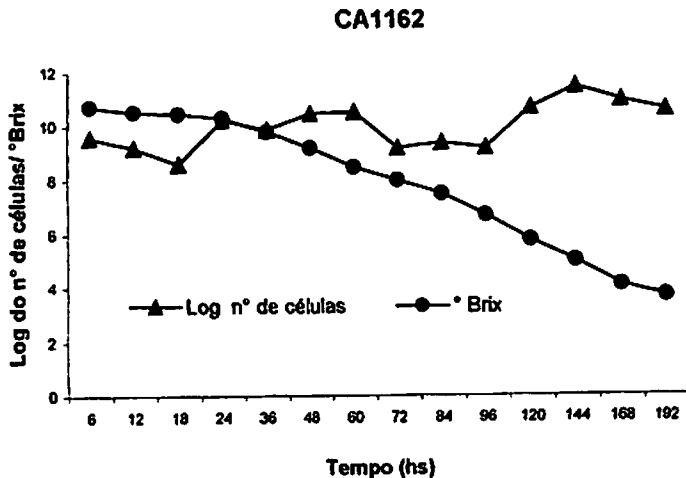
Todos os isolados testados foram capazes de fermentar a polpa de jaboticaba diluída a 10 °Brix e autoclavada por 15 minutos a 121°C. Os gráficos (Figura 2 e 3) abaixo mostram o comportamento em relação ao número de células e o consumo de açúcares (°Brix) dos isolados em função das horas de fermentação a 24°C. Os dados apresentados são médias de três repetições. Os isolados CA1183 e CA1174 tiveram o °Brix estabilizado após 4 dias de fermentação (96 horas). O isolado CA1162, entretanto, apresentou o valor de Brix estável após 8 dias de fermentação (192 horas). Segundo Ough (1992), é considerado, após a estabilização do ° Brix, o fim do processo fermentativo.

A população inicial para cada isolado foi de  $1,59 \times 10^9$ ,  $1,29 \times 10^9$ ,  $3,38 \times 10^9$  UFC/ml para CA1162, CA1183 e CA1174, respectivamente. Na Figura 2 observa-se o que número de células para os isolados CA1183 e CA1174 manteve-se praticamente constante durante todo o processo fermentativo. O valor de °Brix para os dois isolados foi constante nas primeiras 6 horas de fermentação, e depois das 18 horas apresentou um decréscimo acelerado, estabilizando em torno de 3,5 (CA1183) e 3,6 (CA1174), a partir das últimas três leituras (cerca de 72 horas após a incubação).



**FIGURA 2** Comportamento dos isolados CA1183 e CA1174 de *S. cerevisiae* em relação ao número de células e o consumo de sólidos solúveis (°Brix), em polpa de jabuticaba, em função do tempo de fermentação.

A Figura 3 apresenta o desempenho do isolado CA1162 durante 8 dias de fermentação (192 horas). O °Brix permaneceu praticamente constante nas primeiras 24 horas de fermentação; após este tempo, apresentou um decréscimo e estabilização em torno de 3,6, a partir de 168 horas (7º dia), sugerindo uma menor capacidade fermentativa deste isolado em relação aos outros avaliados (estabilização do °Brix após 72 horas do início da fermentação). O número de células apresentou uma variação durante o experimento, o que pode estar relacionado com diferenças nas aliquotas coletadas para plaqueamento, visto que este isolado apresentou a formação de agregados celulares ou floculação, como já observado por Dias (2002) e Campos (2003).



**FIGURA 3** Comportamento do isolado em relação ao número de células e o consumo de sólidos solúveis (°Brix), pelo isolado CA1183 de *S. cerevisiae* em polpa de jabuticaba, em função do tempo de fermentação.



Resultados semelhantes foram encontrados quando se avaliou o consumo de açúcares redutores durante o período de fermentação pelos isolados testados. Na Figura 4 observa-se que os isolados CA1174 e CA1183, nas primeiras 24 horas de incubação, apresentaram um comportamento semelhante, apresentando um rápido consumo de AR, o que pode estar relacionado com a fermentação tumultuosa, período de alta atividade dos microrganismos. Após este período de 24 horas, o isolado CA1174 apresentou um consumo mais rápido de AR em relação ao isolado CA1183 (Tabela 1). É interessante observar que no final do processo fermentativo, a quantidade de AR para os dois isolados não apresentou diferença significativa (1,63 e 1,43 mg/mL para CA1183 e CA1174, respectivamente). Este fato pode estar relacionado a maior capacidade fermentativa do isolado CA1174, que consumiu mais rapidamente os açúcares do que o isolado CA1183. Já o isolado CA1162 apresenta um consumo mais lento de AR, apresentando, após 192 horas de fermentação, 1,84 mg de AR/mL.

Segundo Ough (1996), algumas leveduras requerem menos nutrientes e há algumas que fermentam mais rapidamente que as outras. A velocidade de fermentação depende do número de células que, por sua vez, é influenciado pelos nutrientes do mosto, da concentração de açúcar e álcool, do pH, da temperatura e da agitação.

Campos et al. (2002), avaliando o potencial de polpa de jabuticaba para a produção de bebida fermentada com o uso de dois isolados de *S. cerevisiae* (RL11 e C9), realizaram-se análises para a avaliação do número de células, aferição do °Brix e aferição do pH durante o período fermentativo, que foi de 7 dias para ambos os isolados. A levedura codificada como C9 apresentou-se mais populosa durante todo o experimento, com estabilização do °Brix cerca de 24 horas antes do isolado RL11, apresentando assim maior capacidade fermentativa.

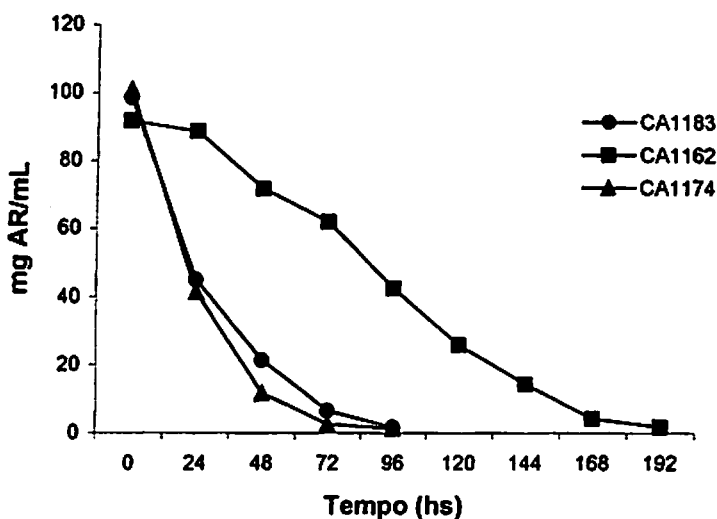


FIGURA 4 Açúcares redutores presentes no mosto de jabuticaba, inoculado com os isolados de *S. cerevisiae*, durante o processo fermentativo.

TABELA 1 Açúcares redutores presentes no mosto de jabuticaba, inoculado com os isolados *S. cerevisiae*, durante o processo fermentativo.

Tempo (hs)	Teores de açúcares redutores (AR) (mg/mL)		
	Isolados		
	CA1183	CA1162	CA1174
0	98,63	91,78	100,88
24	45,12	88,9	41,56
48	21,34	71,87	11,62
72	6,57	62,36	2,58
96	1,63	42,83	1,43
120	-	25,99	-
144	-	14,38	-
168	-	4,30	-
192	-	1,84	-

Oliveira et al. (2003), observaram durante a fabricação da bebida alcoólica de Pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth), um maior consumo de açúcares nas primeiras 24 horas do processo, diminuindo posteriormente devido às altas concentrações de etanol e à escassez de nutrientes.

Corraza et al. (2001), observaram um rápido consumo de açúcares do mosto, nas primeiras 28-30 horas de fermentação, na fabricação caseira de vinho de laranja utilizando frutos que de laranja que não apresentam demanda comercial, representando assim a fase tumultuosa e alta atividade dos microrganismos. O fim do processo fermentativo foi após 153 horas, e o vinho obtido apresentou sabor e qualidade sensorial comparável com o vinho de uva.

O pH, durante todo o período de fermentação, para todos os isolados testados, manteve-se entre 3,0-3,5. Este valor coincidiu com o pH da polpa de jabuticaba utilizada no experimento, não havendo, portanto, influência dos isolados no pH da bebida produzida. É importante ressaltar que valores de pH entre 3 e 4 dificultam futuras contaminações do vinho com bactérias (Aquarone et al., 2001).

## 5.2 Análises química das bebidas

O teor alcoólico encontrado nas bebidas em valores de 4,0% e 5,0 % (Tabela 2) foi considerado baixo em relação ao que geralmente é obtido em vinificação. Entretanto, neste estudo o teor de °Brix inicial foi de 10, portanto, a bebida produzida foi caracterizada dentro da legislação de bebidas fermentadas. Estes resultados indicaram que os isolados de *S. cerevisiae* avaliados foram eficientes na conversão dos açúcares presentes em etanol.

**TABELA 2** Análises físico-químicas das bebidas obtidas com os diferentes isolados de *S. cerevisiae* (CA1183, CA1174 e CA1162)

<b>Análises</b>	<b>Bebida 1 (CA1174)</b>	<b>Bebida 2 (CA1183)</b>	<b>Bebida 3 (CA1162)</b>
Álcool etílico (°GL)	4	4	5
Acidez volátil (meq/L)	2,5	3,25	4
Acidez total (meq/L)	100,25	107,25	97,75
PH	3,61	3,55	3,63
Acidez titulável (% de ácido cítrico)	0,448	0,52	0,64
Sólidos solúveis (%)	2,4	2,9	3,63
Açúcares redutores (Glicose) (%)	0,41	0,67	1,17
Açúcares não redutores (Sacarose) (%)	0,55	0,98	1,31
Açúcares totais (%)	1,71	0,99	2,56
Pectina total (mg/100g)	461,98	458,32	263,95
Pectina solúvel (mg/100g)	248,76	327	141,78
Tanino (%)	0,91	1,03	1,25
Proteína (%)	0,085	0,095	0,095

As bebidas obtidas, devido ao baixo teor de açúcar, podem ser consideradas secas. O vinho é considerado seco quando os açúcares presentes estão na concentração de 1-2 g/L (Ough, 1996).

O mosto fermentado com o isolado CA1162, no final do processo fermentativo, apresentou uma maior quantidade de açúcares, menor teor de pectina total e solúvel e maior teor de tanino que as outras bebidas obtidas com os outros isolados. Considerando que o mosto após a autoclavagem apresentou 294,89 mg/100g de pectina e, após a fermentação, para o isolado CA1162, a bebida continha 141,78 mg/100g, pode-se sugerir uma maior produção de pectinase por este isolado em relação aos outros (Tabela 2).

O pH das bebidas é o mesmo da polpa de jabuticaba antes da fermentação.

Os resultados de teor alcoólico obtido podem ser comparados com os obtidos por Oliveira et al. (2003) e Dias et al. (2003), que encontraram um valor de 12% v/v, trabalhando com o °Brix inicial de 24 na produção de bebida fermentada de pupunha e cajá, respectivamente. Já Corraza et al. (2001), trabalhando com o ° Brix inicial de 26,5 na fabricação caseira de vinho de laranja, obtiveram um teor alcoólico de 10,6% v/v.

Acidez volátil mede o grau de avinagração, causado pela presença de bactérias acéticas, devido à produção do ácido acético. Para o vinho de mesa, segundo o Ministério da Agricultura (1988), o valor máximo admitido é de 20 meq/l, devendo ser o mais baixo possível. No caso dos vinhos produzidos a acidez volátil apresentou-se baixa, o que mostra ausência de bactérias acéticas, o que é esperado pelo fato do mosto ter sido autoclavado e a coleta das amostras ter sido realizadas em condições assépticas.

A acidez total encontrada para os vinhos, está dentro dos padrões estabelecidos (130 meq/l o valor máximo). Comparando os resultados obtidos com a acidez volátil encontrada por Dias (2003) no fermentado de cajá (29

meq/L) os valores para o fermentado de jabuticaba mostraram-se maiores, o que pode estar relacionado com a presença de algum ácido encontrado na jabuticaba, que ainda não sabemos qual.

Com relação às análises cromatográficas, dos álcoois superiores analisados, detectou-se a presença nos vinhos, apenas do álcool isoamílico, nas concentrações 180,84mg/L, 147,3 mg/L e 139,65 mg/L, respectivamente para as bebidas produzidas com os isolados CA1174, CA1183 e CA1162. Foi detectado elementos traços de metanol nas bebidas, o que pode estar relacionado com a produção de pectinases pelos isolados e quebra da pectina, que está presente no mosto autoclavado na concentração 294,89 mg/100g (Pectina total) e 564,300 mg/100g (Pectina solúvel).

### **5.3 Análise sensorial das bebidas**

Após as análises químicas, as bebidas elaboradas foram submetidas à análise sensorial para verificar a aceitação junto ao público. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, observa-se que a bebida fermentada com o isolado CA1183 (Bebida 3) apresentou a melhor aparência, o que pode ser justificado pela limpidez e cor da bebida; entretanto, não foi observada diferença ( $p > 0,05$ ) nesse atributo entre as bebidas 2 e 1. Com relação aos demais atributos avaliados, não foram verificadas diferenças entre as bebidas.

A Tabela 4 apresenta a percentagem de aceite e recusa das bebidas em relação aos atributos analisados. Considerando os aspectos gerais, a bebida produzida com o isolado CA1174 (Bebida 1), foi a que apresentou, em relação às demais bebidas, a maior percentagem de aceite, indicando assim a sua melhor aceitação pelos provadores.

**TABELA 3** Valores médios das notas para cada atributo de análise sensorial avaliado.

Bebidas	Atributos			
	Aparência	Aroma	Sabor	Aspectos gerais
b1 (CA1174)	6,26 ab	6,84 a	5,58 a	5,82 a
b2 (CA1183)	7,04 a	6,47 a	5,54 a	5,71 a
b3 (CA1162)	5,39 b	6,32 a	5,21 a	5,13 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

**TABELA 4** Porcentagem de aceite (6-9) e recusa (1-4) das bebidas conforme análise de escala hedônica de 9 pontos respondida por 46 provadores não treinados

Bebidas	Bebida 1 (CA1174)		Bebida 2 (CA1183)		Bebida 3 (CA1162)	
	(1-4)	(6-9)	(1-4)	(6-9)	(1-4)	(6-9)
Aparência	15,2%	78,30%	8,7%	82,60%	37,0%	47,80%
Aroma	10,9%	83,60%	15,2%	73,00%	10,9%	69,90%
Sabor	28,3%	67,40%	32,6%	54,30%	17,4%	60,90%
Aspectos gerais	26,1%	65,20%	26,1%	58,70%	41,30%	43,50%
	(1-4) Recusa			(6-9) Aceitação		

Por meio do teste não paramétrico Faces de Chernoff, que utiliza um reconhecimento visual, não numérico, pode-se constatar a aprovação da bebida pelos provadores (Figura 5). Nas faces representadas para as três bebidas produzidas, a diferença maior está na largura das faces, que indica o atributo aspectos gerais que, entre as médias ponderadas (Tabela 3), foi o que mais se diferenciou. O comprimento do nariz, representando o aroma, encontra-se maior

na bebida produzida pelo isolado CA1174, seguida pela bebida produzida por CA1183 e CA1162. O atributo aparência é representado pela altura dos olhos e o sabor pela curvatura da boca; ambos não apresentaram diferenças visuais significativas.

A Figura 6 apresenta a bebida elaborada após o processo fermentativo.

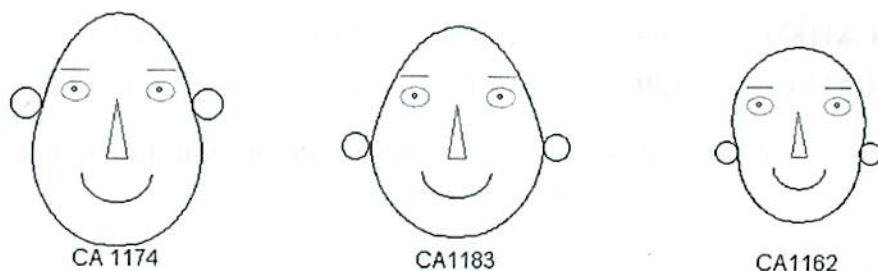


FIGURA 5 Representação da aceitação das bebidas, em relação aos diferentes isolados testados, por meio de faces de Chernoff, em que Aspectos gerais: largura da face; Aroma: comprimento do nariz; sabor: curvatura da boca e aparência: altura dos olhos.



FIGURA 6 Bebida final obtida da fermentação do mosto de jabuticaba.



Para realização do experimento foram coletados 400 litros de jabuticaba. Após o esmagamento dos frutos foram obtidos aproximadamente 80 litros de polpa, ou seja, rendimento em torno de 20 a 30%. No final do processo de vinificação o rendimento foi de 80%. Este rendimento foi calculado em função dos litros de polpa gastos e a quantidade de vinho produzida. Para obtenção de um litro de polpa jabuticaba gastou-se em média R\$ 2,00 (dependendo da região). Para o cálculo do custo total de produção deve-se levar em conta o gasto com mão de obra, o preço do inóculo utilizado, custo com filtragem, engarrafamento, etc, que é variável entre as diversas regiões.

## **RECEITA DO PROCESSO DE FABRICAÇÃO DA BEBIDA FERMENTADA DE JABUTICABA**

- Colheita dos frutos
- Seleção, lavagem (deixar os frutos imersos por 15 minutos no hipoclorito de sódio - água sanitária - e, após passá-las em água limpa e proceder à secagem)
- Obtenção da polpa (prensagem).
- Aferição do teor de açúcar com auxílio de sacarímetro ou refratômetro
- Chaptalização (se necessário) em função do teor Alcoólico desejado (2 °Brix depois de fermentado, produzem aproximadamente, 1% de álcool e 15 g de sacarose produz 1° Brix).
- Fervura por 10 minutos e adição de 200mg/L de metabissulfito de potássio ou autoclavagem da polpa por 15 minutos a 121°C
- Acondicionar a polpa em frascos previamente fervidos ou esterelizados
- Adição do inóculo selecionado de *Saccharomyces cerevisiae* ( $10^7$  cel/ml ou aproximadamente 20g/hL). Tampar os frascos com panos limpos
- Fermentação controlada a 22°C ou em local fresco e arejado por aproximadamente 10 dias (com auxílio do sacarímetro, conferir o °Brix; este mantendo-se estável, considera-se o fim do processo fermentativo)
- Filtrar a bebida fermentada
- Acondicionar em garrafas limpas e previamente fervidas; se possível adicionar bentonite para favorecer o processo de clarificação; e manter sob temperatura de 10°C ou em geladeira por um período de 10 dias e realizar a primeira trasfega. Levar novamente para a temperatura de 10°C, por mais 30 dias, após filtrar e acondicionar em garrafas tampadas com rolhas de cortiça.

## 6 CONCLUSÕES

- Todos os isolados avaliados foram capazes de fermentar a polpa de jaboticaba, consumindo todos os açúcares fermentescíveis presentes no mosto.
- O isolado CA1174 apresentou maior capacidade fermentativa, ao consumir mais rápido os açúcares redutores presentes na polpa, seguido pelo isolados CA1183 e CA1162, respectivamente.
- As bebidas fermentadas obtidas apresentaram um teor alcoólico dentro dos padrões estabelecidos para bebidas fermentadas.
- Todos os isolados apresentaram uma alta capacidade de converter glicose em etanol, em função do teor alcoólico obtido e °Brix utilizado.
- O teor de açúcar presente no mosto ao final do processo fermentativo classificou as bebidas produzidas como secas.
- Dos álcoois superiores analisados foi detectada a presença do álcool isoamílico e traços de metanol para as bebidas produzidas.
- A análise sensorial mostrou ser a bebida produzida pelo CA1174 a de melhor aceitação pública.
- O isolado CA1174 (dentre os outros analisados) pode ser indicado para fabricação da bebida fermentada de jaboticaba. .

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. **Biotecnologia - alimentos e bebidas produzidas por fermentação**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. 230 p.

ASSOCIATION OFFICIAL OF ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association Official of the Analytical Chemists**. 9. ed. Washington, 1960. p. 111.

ASSOCIATION OFFICIAL OF ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association Official of the Analytical Chemists**. 15. ed. Washington, 1990. v. 2, cap. 37, p. 915 e 922.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretária Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Vegetal. **Metodologias de análise de bebidas e vinagres**, Brasília, 1985. n. p.

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

CAMPOS, C. R.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; VIDAL, J. V. Avaliação do processo fermentativo da bebida alcoólica de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17., 2002. Anais.... 2002.

CORAZZA, M. L.; RODRIGUES, D. G.; NOZAKI, J. Preparação e caracterização do vinho de laranja. *Química Nova*, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 449-452, jul./ago. 2001.

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

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; LIMA, L. C. O. Metodologia para elaboração de fermentado de cajá (*Spondias mombin* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 23, n. 3, p. 342-350, set./dez. 2003.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; GOSTINCAR, A.; ROBERT, R.; URUBURU, F.; QUEROL, A. Selection and molecular characterization of wine yeast isolated

from the 'El Penedès' area (Spain). *Food Microbiology*, London, v. 17, n. 5, p. 558-562, Oct. 2000.

FERREIRA, D. F. **Sisvar 4.3 - Sistema de análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 1999.

FIALHO, C. J. **Identificação de *Saccharomyces cerevisiae* por técnicas moleculares (PCR e PFGE) em uma fermentação de caldo de cana-de-açúcar**. 2000. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FLEET, G. H. Wine. In: DOYLE, M. P.; BEAUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food microbiology fundamentals and frontiers**. 1997. 768 p.

HASHIZUME, T. Tecnologia do vinho. In: AQUARONE, E.; BORZANE, W.; SCHEMEDELL, W.; LIMA, U. de A. **Biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. 523 p. (Série Biotecnologia industrial, v. 4).

INSTITUTO ADOLF LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolf Lutz: Métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. 3. ed. São Paulo, 1985. v. 1.

MCCREADY, R. M.; MCCOMB, E. A. Extration and determination total pectin material in fruits. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 24, n. 12, p. 1586-1588, Dec. 1952

MENDONÇA, A. T.; SCHWAN, R. F.; SANCHES, N. M.; DIAS, D.; WHEALS, A. E. Avaliação Fisiologia da Leveduras Fermentativas de Caldo de cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA SALVADOR, 20., 1999, Salvador, BA. Resumos... Salvador, 1999. 269 p.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Portaria n. 229, de 25 de outubro de 1988. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, p. 20948-20950, 31 maio 1988

MORAES, M. A. C. **Métodos para avaliação sensorial dos alimentos**. 8. ed. Campinas: Unicamp, 1993. 93 p. (Série Manuais).

OLIVEIRA, L. P.; MAEDA, R.; ANDRADE, J. de S.; PEREIRA JÚNIOR, N.; CARVALHO, S. M. da S.; ASTOLFI FILHO, S. Processo fermentativo para produção de bebida alcoólica de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). **Biociência**, Uberlândia, v. 3, n. 19, p. 50-45, 2003.

OUGH, C. S. **Tratado básico de enología**. Tradução de Concepción Llaguno Marchena e Maria Dolores Cabezudo Ibañes. Zaragoza: Acribia, 1996. 294 p. Tradução de: *Winemaking basics*. New York: Haworth Press, 1992.

PATO, O. **O vinho: sua preparação e conservação**. 7. ed. Lisboa: Livraria Clássica Editora, 1982. 433 p. (Coleção Técnica Agrária)

POZO-BAYÓN, M. A.; PUEYO, E.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, A.; POLP, M. C. Influence of yeast strain, bentonite addition, and aging time on volatile compounds of sparkling wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 54, n. 4, p. 273-278, 2003.

RIZZON, L. A.; ZANUS, M. C.; MANFREDINI, S. **Como elaborar vinho de qualidade na pequena propriedade**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 1986. 24 p. (EMBRAPA Uva e Vinho. Documentos, 21).

ROSIER, J. P. **Manual de elaboração de vinho para pequenas cantinas**. 2. ed. Florianópolis: EPAGRI, 1995. 72 p.

SILVA, M. A. A. de; SILVA, G. A. da. **Leveduras selecionadas para elaboração de vinho**. Bento Gonçalves, RS: EMBRAPA-CNPVU: Centro de pesquisa de uva e vinho, 1987. 19 p.

STATSOFTINC. **Statistica for windows (computer program manual)** Tulsa, OK. Statsoft, 1995.

VOGT, E.; JAKOB, L.; LEMPERLE, E.; WEISS, E. **El vino: obtención, elaboración y análisis**. Tradução de Jaime Esain Escobar. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1986. 294 p. Tradução de: *Der Wein: bereitung behandlung, untersuchung* 9ed. Stuttgart: Eugen Ulmer, 1984.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, London, v. 57, n. 3, p. 508-514, 1954.

## ANEXOS

<b>ANEXO A</b>	<b>Página</b>
<b>FIGURA 1A</b>	<b>Ficha modelo para avaliação sensorial de aceitação da bebida alcoólica de frutas tropicais em relação ao Aroma, ao Sabor e à Aparência da bebida..... 117</b>
<b>FIGURA 2A</b>	<b>Ficha modelo para avaliação sensorial da aceitação global da bebida alcoólica fermentada de frutas tropicais..... 73</b>
<b>FIGURA 3A</b>	<b>Metodologia de Determinação de açúcares redutores pelo método do ácido Dinitrosalicílico (DNS). ..... 74</b>

Nome: \_\_\_\_\_  
 Idade: \_\_\_\_\_ anos  
 Sexo: M ( ) ; F ( )  
 Data:     /     /  
 Nº da amostra: \_\_\_\_\_

Você vai provar 1 (uma) amostra da bebida da fruta tropical. Assinale, na escala abaixo, o quanto você gostou ou desgostou do produto, em relação aos seguintes atributos:

<i>APARÊNCIA</i>	<i>AROMA</i>	<i>SABOR</i>
( ) Gostei extremamente	( ) Gostei extremamente	( ) Gostei extremamente
( ) Gostei muito	( ) Gostei muito	( ) Gostei muito
( ) Gostei moderadamente	( ) Gostei moderadamente	( ) Gostei moderadamente
( ) Gostei ligeiramente	( ) Gostei ligeiramente	( ) Gostei ligeiramente
( ) Não gostei, nem desgostei	( ) Não gostei, nem desgostei	( ) Não gostei, nem desgostei
( ) Desgostei ligeiramente	( ) Desgostei ligeiramente	( ) Desgostei ligeiramente
( ) Desgostei moderadamente	( ) Desgostei moderadamente	( ) Desgostei moderadamente
( ) Desgostei muito	( ) Desgostei muito	( ) Desgostei muito
( ) Desgostei extremamente	( ) Desgostei extremamente	( ) Desgostei extremamente

Descreva o que você mais gostou e o que você menos gostou na amostra:

Mais gostei:

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Menos gostei:

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

FIGURA 1 A Ficha modelo para avaliação sensorial de aceitação da bebida alcoólica de frutas tropicais em relação ao Aroma, ao Sabor e à Aparência da bebida.



Nome: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ anos.

Sexo: M ( ) ; F ( ).

Data:     /     /

Nº da amostra: \_\_\_\_\_

Por favor, prove a amostra codificada da bebida alcoólica fermentada de fruta tropical e indique, na escala abaixo, o quanto você gostou ou desgostou da amostra.

- ( ) Gostei extremamente
- ( ) Gostei muito
- ( ) Gostei moderadamente
- ( ) Gostei ligeiramente
- ( ) Não gostei, nem desgostei
- ( ) Desgostei ligeiramente
- ( ) Desgostei moderadamente
- ( ) Desgostei muito
- ( ) Desgostei extremamente

Descreva o que você mais gostou e o que você menos gostou na amostra:

Mais gostei:

---

---

---

Menos gostei:

---

---

---

FIGURA 2 A Ficha modelo para avaliação sensorial da aceitação global da bebida alcoólica fermentada de frutas tropicais.

## DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES PELO MÉTODO DO ÁCIDO DINITROSALICÍLICO (DNS)

### Preparo dos reagentes:

A – Pesar 2,5g de ácido dinitrosalicílico (DNS) e colocar em um béquer de 500 mL. Reservar.

C- Preparar 50 mL de solução de NaOH 2N. Reservar.

B - Dissolver 75g de Tartarato duplo de Sódio e Potássio (Sal de Rochelle) em 125 mL de água destilada sob aquecimento e agitação.

Posteriormente, adicionar (ao mesmo tempo) sob o DNS, a solução de NaOH e o tartarato duplo de Sódio e Potássio misturando-o sob aquecimento e agitação até dissolver completamente. Depois de resfriada, completar o volume da solução para 250ml.

### Procedimento para obtenção da curva padrão de açúcares redutores (AR) a partir de uma solução de glicose (10mM):

- pode ser utilizada uma mistura de frutose e glicose desde que dêem a mesma concentração final.

Tabela 3. Procedimento para obtenção da curva padrão de açúcares redutores

Tubos	Glicose (10mM) (ml)	Água (ml)	$\mu$ moles de AR	DNA (A+B) (ml)
01	0,0	1,5	0,0	1,0
02	0,2	1,3	2,0	1,0
03	0,4	1,1	4,0	1,0
04	0,6	0,9	6,0	1,0

Após adicionar o reagente de DNS, agitar a mistura e levar os tubos para banho-maria à 100°C por 5 minutos. Deixar esfriar à temperatura ambiente e completar volume para 10ml com água destilada ou não (conforme o caso). Fazer a leitura a 540nm.

FIGURA 3 A Ficha modelo para avaliação sensorial da aceitação global da bebida alcoólica fermentada de frutas tropicais.