

**ELABORAÇÃO DE BEBIDA ALCOÓLICA  
FERMENTADA DE CAGAITA (*Eugenia  
dysenterica*, DC) EMPREGANDO LEVEDURAS  
LIVRES E IMOBILIZADAS**

**MARA ELISA SOARES DE OLIVEIRA**

**2010**

**MARA ELISA SOARES DE OLIVEIRA**

**ELABORAÇÃO DE BEBIDA ALCOÓLICA FERMENTADA DE  
CAGAITA (*Eugenia dysenterica*, DC) EMPREGANDO LEVEDURAS  
LIVRES E IMOBILIZADAS**

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

Orientador

Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010

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

Oliveira, Mara Elisa Soares de.

Elaboração de bebida alcoólica fermentada de cagaita (*Eugenia dysenterica*, DC) empregando leveduras livres e imobilizadas / Mara Elisa Soares de Oliveira. – Lavras : UFLA, 2010.

75 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Disney Ribeiro Dias.

Bibliografia.

1. Cerrado. 2. Fermentação. 3. *Saccharomyces cerevisiae*. 4. Imobilização celular. 5. Microbiologia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 663.13

**MARA ELISA SOARES DE OLIVEIRA**

**ELABORAÇÃO DE BEBIDA ALCOÓLICA FERMENTADA DE  
CAGAITA (*Eugenia dysenterica*, DC) EMPREGANDO LEVEDURAS  
LIVRES E IMOBILIZADAS**

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

APROVADA em 24 de fevereiro de 2010

Profª. Dra. Lílian de Araújo Pantoja	UFVJM
Profª. Dra. Rosane Freitas Schwan	UFLA
Prof. Dr. Romildo da Silva	UFLA

Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias  
Unilavras  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

## **DEDICATÓRIA**

**Aos meus pais, Elysio e Silmara, os alicerces da minha vida, que sempre me deram suporte para conquistar esta vitória.**

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, por me iluminar, acompanhar todos os meus passos e por me conceder a força para vencer os obstáculos para conseguir mais esta vitória.

Aos meus pais, Silmara e Elysio, que são tudo para mim, por todo amor, dedicação e, principalmente, por estarem ao meu lado sempre.

A minha família, Elysio Filho, Alvaro, Taty, Angela, Eduarda, Geovana, Júlia e Alvaro Filho, que sempre foram o meu porto seguro, mesmo nas horas mais difíceis.

Ao José Bissolatti, por todo amor, incentivo, paciência, compreensão pelos longos períodos de ausência e, principalmente, por se fazer sempre presente, mesmo estando muito longe.

Aos meus orientadores, professores Disney e Rosane, por acreditarem e confiarem em mim, mas, em especial, por me orientarem com carinho e muita sabedoria.

Aos professores Eustáquio, Patrícia e Romildo, pela contribuição incondicional para a minha formação científica.

À professora Lilian, pelo seu apoio e contribuição de suma importância para a concretização deste trabalho.

Às amigas e estagiárias, Carol e Lívia, que foram fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa, sendo a minha mão direita no laboratório, pela confiança, apoio e amizade.

Aos amigos Ayesca, Carla, Luana, Cilene, Carlyle, Thiago, Sarita, Karina, Mariana, Jessé e Fabiana, pelo incentivo nas horas difíceis, pelo companheirismo e pelos momentos vividos juntos.

Aos amigos Rozimara, Rinaldo, Rafaela e Raquel, que se tornaram pessoas especiais e inesquecíveis, por todo carinho e amizade.

Aos amigos Fernando e Luzia, que sempre contribuíram com muito incentivo, apoio e amizade.

A Cidinha e Washley, pela relevante contribuição na realização das análises cromatográficas, pela paciência, dedicação e seriedade em seu trabalho.

Aos técnicos de laboratório Ivani, Paulinho, Eloisa e Douglas, por toda a paciência, amizade e dedicação.

À Vinícola Salton, em especial a técnica Andrea, por realizarem as análises químicas nas bebidas.

A todos os colegas de laboratório que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

A todos vocês, OBRIGADA por tudo!!!

Sem vocês eu não teria conseguido.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	i
ABSTRACT .....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	3
2.1 Cerrado .....	3
2.2 Cagaita .....	4
2.3 Fermentação alcoólica .....	12
2.3.1 Bioquímica da fermentação .....	13
2.3.2 Microbiologia da fermentação .....	14
2.4 Bebidas alcoólicas fermentadas de frutas .....	16
2.5 Imobilização de células.....	17
2.5.1 Vantagens e desvantagens .....	18
2.5.2 Técnicas de imobilização.....	19
2.5.3 Aplicações de biocatalisadores Imobilizados .....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	25
3.1 Coleta das frutas e preparação do mosto.....	25
3.2 Preparação do inóculo.....	29
3.2.1 Células livres.....	29
3.2.2 Células imobilizadas .....	29
3.3 Fermentação.....	31
3.4 Análises durante o processo de fermentação .....	32
3.4.1 Sólidos solúveis totais, pH e acidez titulável.....	32
3.4.2 Células viáveis em suspensão .....	32
3.4.3 Análises cromatográficas.....	32
3.5 Tráfega, clarificação e armazenamento .....	32



3.6 Análises na bebida .....	33
3.6.1 Análises químicas .....	33
3.6.1 Análise sensorial .....	34
3.7 Microscopia eletrônica.....	34
3.8 Análise estatística .....	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 Caracterização química da polpa .....	36
4.2 Concentrações do inóculo .....	39
4.2.1 Células livres.....	39
4.2.2 Células imobilizadas .....	40
4.3 Fermentação e análises durante o processo .....	47
4.4 Análises na bebida .....	55
4.4.1 Análises químicas .....	55
4.4.2 Análise sensorial .....	58
5 CONCLUSÕES .....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64

## RESUMO

OLIVEIRA, Mara Elisa Soares de. **Elaboração de bebida alcoólica fermentada de cagaita (*Eugenia dysenterica*, DC) empregando leveduras livres e imobilizadas**. 2010. 75p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras<sup>1</sup>

Entre as espécies de frutas comestíveis nativas do bioma cerrado está a *Eugenia dysenterica* DC, popularmente conhecida como cagaita. Seus frutos são altamente perecíveis e desperdiçados em quase toda a sua totalidade. Infere-se que o processo de fermentação é um meio viável de aproveitamento do fruto, transformando-o em bebida alcoólica fermentada. Este trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver metodologia para a elaboração da bebida alcoólica fermentada de cagaita, empregando-se células de *Saccharomyces cerevisiae* nas formas livre e imobilizada. Duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, UFLA CA11 e CAT1, foram utilizadas. A polpa de cagaita foi diluída em água, na proporção de 1:1 e chaptalizada a 20°Brix. Foi utilizado SO<sub>2</sub> como agente inibidor do crescimento bacteriano e como antioxidante. Quatro fermentações foram conduzidas em batelada simples, duas com leveduras livres e duas com leveduras imobilizadas em alginato de cálcio. Os processos foram monitorados diariamente por meio de análises de sólidos solúveis, pH, acidez titulável, etanol, sacarose, glicose e frutose, a cada 24 horas. Ao final da fermentação, as bebidas foram submetidas a análises químicas e sensoriais. O tempo de fermentação e a concentração de etanol variaram em função de as células estarem ou não imobilizadas, sendo o processo com células imobilizadas (4 dias e 8 dias para UFLA CA11 e CAT1, respectivamente) mais rápido que aquele com células livres (10 dias e 12 dias para UFLA CA11 e CAT1, respectivamente). A concentração de etanol (°GL) foi pouco superior na fermentação com células livres (11,99 e 12,03, para UFLA CA11 e CAT1, respectivamente) quando comparada com as bateladas com células imobilizadas (11,01 e 11,05, para UFLA CA11 e CAT1, respectivamente). Os dados de análise sensorial evidenciaram aceitabilidade maior que 70% para os quesitos cor, sabor e aroma.

---

Comitê Orientador: Disney Ribeiro Dias – Unilavras (Orientador); Rosane Freitas Schwan – DBI/UFLA e Lilian de Araújo Pantoja – UFVJM

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Mara Elisa Soares de. **Fruit wine from cagaita (*Eugenia dysenterica*, DC) in a free and immobilized yeast cells batches.** 2010. 75p. Dissertation (Master in Agricultural Microbiology) – Federal University of Lavras, Lavras.<sup>2</sup>

Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) is a native edible fruit from *cerrado* (Brazilian savannah). Cagaita's fruits are very fragile and perishable, being its natural production almost lost in totality after ripening. It is known that fermentation processes are a viable way to use several fruits, and alcoholic fermentation has been used to obtain fruit wines. The aims of this work were to adapt the methodology for elaboration of fruit wine from cagaita, to develop a process using immobilized yeast cell for cagaita pulp and to compare the fermentation conducted with free and with Ca-alginate immobilized yeast cells. To perform these work two strains of *Saccharomyces cerevisiae* (UFLA CA11 and CAT1) were used. To prepare cagaita's must, the fruit pulp was diluted (1:1) in sucrose solution until reached 20 °Brix, and sulfur dioxide was added (100 mg/L) to avoid bacterial contamination. Four fermentation batches were performed, being two with free cells and two with immobilized cells at 22 °C for until 336 hours. During all fermentative processes soluble solids, pH, titratable acidity, ethanol, sucrose, glucose, and fructose were analyzed every 24 hours. At the end of fermentation the beverages were submitted to chemical and sensorial analysis. Fermentation time and ethanol production was influenced by yeast strain and by cell state (free or immobilized), being immobilized cells faster (4 days and 8 days for UFLA CA11 and CAT1, respectively) than free cells (10 days and 12 days for UFLA CA11 and CAT1, respectively). pH value was slightly lower in the immobilized cell process (2.95 and 2.99 for UFLA CA11 and CAT1, respectively) than 3.23 and 3.28 for UFLA CA11 and CAT1 free cells, respectively, while ethanol amount (°GL) was slightly higher in the fermentation conducted with free cells (11.99 and 12.03 for UFLA CA11 and CAT1, than 11.01 and 11.05 for immobilized UFLA CA11 and CAT1, respectively). According to sensorial evaluation, the fruit wine acceptability was greater than 70% for all parameters color, flavor, and taste.

---

Guidance Committee: Disney Ribeiro Dias – Unilavras (Orientador); Rosane Freitas Schwan – DBI/UFLA e Lilian de Araújo Pantoja – UFVJM

## 1 INTRODUÇÃO

Sabe-se, há muito tempo, que os cerrados apresentam alguns dos piores solos tropicais conhecidos, quanto à composição química. Estes solos apresentam tolerância às queimadas naturais e àquelas provocadas pelo homem. Mesmo sob uma aparência de aridez e secura, o cerrado é capaz de surpreender quanto à diversidade e à riqueza de seus recursos naturais (Sano et al., 1998).

Entre as espécies de frutas comestíveis nativas do bioma cerrado, de grande aceitação pela população local e que são exploradas exclusivamente de forma extrativista, está a *Eugenia dysenterica* DC, popularmente conhecida como cagaita ou cagaiteira, que pertence à família *Myrtaceae*, cuja árvore frutífera pode chegar a 10 m de altura, de tronco e ramos tortuosos e casca grossa. O período de frutificação ocorre de outubro a dezembro. Os frutos do cerrado, mesmo oferecendo nutrientes e características sensoriais atrativas, como cor, sabor e aroma, ainda não são explorados comercialmente em grande escala. Com base nessas características, o emprego de frutas do cerrado na obtenção de sucos e bebidas fermentadas torna-se interessante para o desenvolvimento regional.

Imobilização é a restrição da mobilidade da célula em um espaço definido, provendo altas concentrações das mesmas (Nursevin et al., 2003), com preservação da atividade catalítica (Karel et al., 1985). A imobilização protege a célula e as enzimas das tensões ambientais, como pH, temperatura, sais, solventes, autodestruição e inibidores (Park et al., 1990). A imobilização de células oferece várias vantagens, como aumento da produtividade da fermentação, processo de produção contínuo, estabilidade celular, baixo custo e capacidade de reutilização (Margaritis et al., 1984).

Tem sido observado crescente aumento no desenvolvimento de bioprocessos empregando células imobilizadas, bem como grande número de publicações de trabalhos onde esta técnica é explorada, o que mostra a importância desta tecnologia e o interesse pela mesma (Carvalho et al., 2003).

Observa-se que a utilidade e a viabilidade econômica são fatores de forte influência na preservação de espécies vegetais do cerrado. Espécies como o pequi, o baru, a sucupira, o ipê, a aroeira, o jatobá e o buriti, entre muitas outras, têm sido preservadas, mesmo em situações de desmatamento para a exploração pecuária. A cagaita, ao contrário, quase sempre é eliminada por ser considerada uma invasora de pastagens, devido à sua abundância em algumas regiões do cerrado.

Mediante estas observações, infere-se que o processo de fermentação é um meio viável de aproveitamento e estocagem do fruto, transformando-o em bebida alcoólica fermentada.

Devido às vantagens oferecidas pelo sistema de imobilização de células e aos poucos estudos deste sistema em processos de obtenção de bebidas fermentada de frutas, o desenvolvimento de metodologia para a utilização de células imobilizadas na elaboração de bebidas fermentadas é uma inovação tecnológica que merece ser estudada.

Sendo assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver metodologia para a elaboração da bebida alcoólica fermentada de cagaita empregando-se células de *Saccharomyces cerevisiae* nas formas livre e imobilizada.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Cerrado

Cerrado é o nome regional dado às savanas brasileiras. Localiza-se, basicamente, no planalto central do Brasil e é o segundo maior bioma do país em área, superado apenas pela Floresta Amazônica. Ele ocupa mais de 2.036.448 km<sup>2</sup>, o que representa, aproximadamente, 24% do território brasileiro (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2010). Abrange, como área contínua, os estados de Goiás, Tocantins, Distrito Federal e parte da Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rondônia e São Paulo, também ocorrendo em áreas disjuntas no norte do país, nos estados do Amapá, Amazonas, Pará e Roraima (Eiten, 1994).

O cerrado caracteriza-se pela presença de solos geralmente muito antigos, ácidos e de baixa fertilidade (Goedert, 1986). O clima típico da região é tropical chuvoso, quente, semiúmido e notadamente sazonal, com verão chuvoso e inverno seco. A pluviosidade anual fica em torno de 800 a 1.600 mm. A estação chuvosa é praticamente concentrada entre os meses de outubro a março e a temperatura média do mês mais frio é superior a 18°C (Nimer, 1989).

As árvores do cerrado são muito peculiares, com troncos tortos, cobertos por cortiça grossa, folhas geralmente grandes e rígidas. Muitas plantas herbáceas têm órgãos subterrâneos para armazenar água e nutrientes. Cortiça grossa e estruturas subterrâneas podem ser interpretadas como algumas das muitas adaptações desse tipo de vegetação às queimadas periódicas a que é submetida, protegendo as plantas da destruição e capacitando-as para rebrotar após o fogo (Rodrigues & Carvalho, 2001).

A grande variabilidade de habitats nos diversos tipos de cerrado, que vão desde o cerradão com árvores altas, passando pelo cerrado com árvores baixas e

esparsas até o campo cerrado, com progressiva redução da densidade arbórea, abriga muitas comunidades de mamíferos e de invertebrados, além de uma importante diversidade de microrganismos, tais como fungos associados às plantas da região (Ratter et al., 2000).

## **2.2 Cagaita**

A distribuição de *Eugenia dysenterica* DC, conhecida popularmente como cagaita, no cerrado, é bastante ampla (FIGURA 1), ocorrendo nos estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, São Paulo, Tocantins e também no Distrito Federal. É uma espécie adaptada a solos relativamente pobres (Oliveira Júnior et al., 1997; Silva, 1999), encontrada, frequentemente, em Cerradão e Cerrado (Almeida et al., 1998).

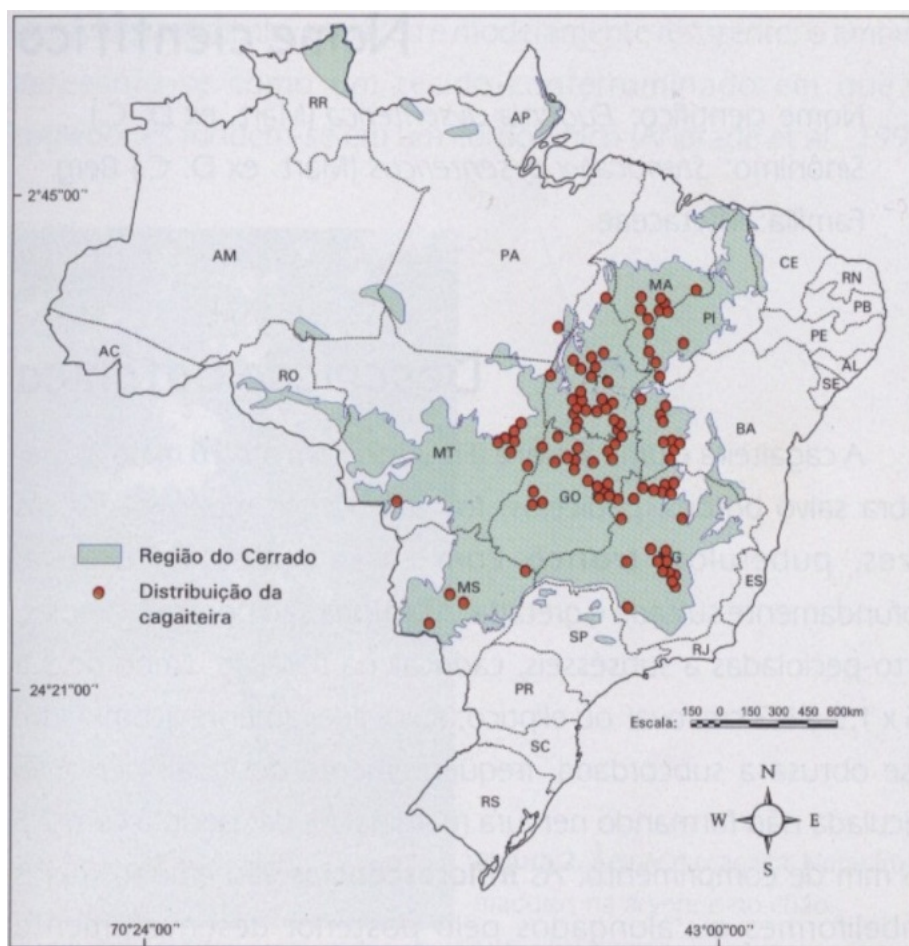


FIGURA 1 Distribuição da cagaita na região do cerrado. FONTE: (Brito et al., 2003)

A distribuição de plantas da cagaita no cerrado varia entre 4 a 162 indivíduos/ha. Seu potencial de produção varia de 500 a 2.000 frutos por árvore (Silva et al., 1997). Cada fruto varia entre 14 g e 20 g (Rizzini, 1971; Ribeiro et al., 1986; Naves et al., 1995).



A cagaiteira é pouco exigente em relação à fertilidade de solo, acumula pouca quantidade de nutrientes nas folhas e a variação da quantidade de elementos no solo não provoca alteração nos teores foliares dos mesmos elementos (Oliveira Júnior et al., 1997; Silva, 1999).

Embora a cagaita seja adaptada a solos pobres do cerrado (Oliveira Júnior et al., 1997; Silva, 1999), em condições naturais, os indivíduos de maior porte são encontrados em solos de melhor fertilidade (Naves, 1999). A cagaiteira tem hábito arbóreo arbustivo, que varia de 8 a 10 m de altura, dotada de copa alongada e densa, com tronco tortuoso e cilíndrico, de 25 a 35 cm de diâmetro, com casca grossa, suberosa e profundamente sulcada no sentido vertical e horizontal (FIGURA 2).



FIGURA 2 Cagaiteira adulta. (Foto: Figueirópolis, TO, 2007, Mara Elisa Soares de Oliveira)

As folhas são opostas, simples, curto-pecioladas a subsésseis, caducas na floração e aromáticas. As inflorescências são em racêmulos umbeliformes, com 4 flores, raramente com 2 ou 6. As flores (FIGURA 3) são andróginas, actinomorfas; apresentam cálice com 4 sépalas livres; corola com 4 pétalas livres, brancas e perfumadas; androceu polistêmone, com anteras rimosas; gineceu com ovário ínfero, bilocular, globoso, com 2 a 4 óvulos por lóculo; estilete único e filiforme e estigma único e simples.



FIGURA 3 Flores de cagaita. (Foto: Figueirópolis, TO, 2007, Mara Elisa Soares de Oliveira)

A floração das cagaiteiras é maciça (FIGURA 4), dura cerca de duas a três semanas (Proença & Gibbs, 1994) e acontece no meio da estação da seca, em meados de julho a princípio de agosto, destacando-as dentre as outras árvores do ambiente. A floração de uma única planta dura, em média, de 3 a 5 dias. O florescimento é simultâneo ao surgimento das folhas novas. Nessa ocasião, a planta exibe belo aspecto, devido à abundância de flores alvas e folhas novas cúpreas. Após a floração, a cagaiteira entra rapidamente em frutificação (Rizzini, 1970). A época da maturação dos frutos varia de outubro a dezembro, conforme o ano e o local. Na região sul do Tocantins, a maturação ocorre entre meados de outubro a meados de novembro.





FIGURA 4 Cagaiteira em floração. (Foto: Figueirópolis, TO, 2007, Mara Elisa Soares de Oliveira)



FIGURA 5 Fruto maduro de cagaita. (Foto: Figueirópolis, TO, 2007, Mara Elisa Soares de Oliveira)

O fruto (FIGURA 5) é uma baga globulosa de 3 a 4 cm de diâmetro, com polpa amarela, carnosa, comestível, geralmente com 1 a 4 sementes. As sementes têm cerca de 1 a 1,5 cm de comprimento, coloração creme, ovais (Almeida et al., 1998) ou de formato globoso e não apresentam dormências prolongadas (Farias Neto et al., 1991).

Os frutos estão disponíveis para a colheita em um curto período de, aproximadamente, 15 dias e devem ser coletados maduros, no chão, ou de vez, sacudindo-se levemente os ramos da árvore. O ideal é a utilização de redes de

náilon colocadas em volta das árvores para a coleta de frutos maduros, sem que estes caiam no solo. Os frutos são saborosos, ricos em vitamina C e têm grande aceitação regional. Podem ser consumidos *in natura* e sua polpa é empregada na fabricação de doces, geleias, sorvetes e sucos (Almeida et al., 1987).

Na fauna do cerrado, a cagaita é parte da cadeia alimentar de muitos animais, como jabuti, veado e caititu, entre outros, constituindo um dos poucos alimentos disponíveis durante o período de estiagem e, em muitos casos, sendo a única fonte de líquido disponível.

O rendimento da cagaita para a produção de polpa depende da qualidade do fruto. Com frutos de boa qualidade, pode-se obter rendimento de 72% de polpa. No consumo *in natura*, devem ser tomadas algumas precauções em relação à quantidade ingerida, pois pode ter efeito laxativo (Brito et al., 2003). Este efeito, todavia, desaparece no processamento, possibilitando o consumo de cagaita de várias formas. Vinagre e álcool podem ser produzidos a partir da fermentação dos frutos (Olga & Fonseca, 1994).

As folhas da cagaita têm propriedades adstringentes e são utilizadas popularmente como anticonstipantes, sob forma de chá (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, 1985) e, quando preparadas em forma de “garrafada”, produzem efeito antidiarreico, sendo também utilizada para combater problemas cardíacos (Ferreira, 1980), diabetes e icterícia (Silva, 1999).

### **2.3 Fermentação alcóolica**

A fermentação tem sido realizada durante muitos séculos, pois historiadores acreditam que há 10.000 anos a.C. já se elaborava vinho (Ward, 1991).

O processo fermentativo é considerado um dos mais antigos métodos de preservação de alimentos. Tem-se registro, no período de 2000 a 4000 a.C., do

desenvolvimento da fermentação alcoólica pelos povos egípcios e sumérios, com emprego na fabricação de vinhos e cervejas (Ward, 1991; Ross et al., 2002).

Embora, por muitos anos, a fermentação tenha sido explorada como método de preservação de alimentos e bebidas, apenas em um passado mais recente é que Louis Pasteur identificou microrganismos como os responsáveis pelo processo. Em 1850, ele concluiu que a transformação do açúcar a etanol dependia da existência de células vivas, as leveduras (Pereira Júnior, 1999).

### **2.3.1 Bioquímica da fermentação**

A fermentação alcoólica é um processo anaeróbico que ocorre com a transformação de açúcares em etanol e  $\text{CO}_2$ , catalisado por enzimas. Esse processo é realizado, principalmente, por leveduras, no citoplasma, com o objetivo de obter energia, a qual será empregada na realização de suas atividades fisiológicas e, ainda, para seu crescimento e reprodução, sendo o etanol tão somente um subproduto desse processo (Lima et al., 2001).

Do ponto de vista bioquímico, a fermentação é um processo catabólico anaeróbico que não envolve cadeia respiratória ou citocromos. O processo da fermentação alcoólica caracteriza-se como uma via catabólica, na qual há a degradação de moléculas de açúcar (glicose ou frutose), no interior da célula de microrganismos (levedura ou bactéria), até a formação de etanol e  $\text{CO}_2$ , havendo liberação de energia química e térmica (Lehninger et al., 1995).

A glicólise é a via central do catabolismo da glicose, sendo o piruvato o produto final desse processo, o qual pode seguir diferentes vias metabólicas: fermentação alcoólica, fermentação láctica e respiração, através do ciclo de Krebs e cadeia respiratória. Na fermentação alcoólica, o piruvato é descarboxilado, formando acetaldeído, que, posteriormente, é reduzido a etanol (Lehninger et al., 1995).



De forma global, pode-se representar a fermentação alcoólica pela Equação de Gay-Lussac, na qual se observa que 1 mol de glicose (180 g) produz 2 moles de etanol (92 g) e 2 moles de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (88 g) e 57 kcal de energia (Lehninger et al., 1995; Kolb, 2002).



Durante a fermentação alcoólica são formados, além do etanol, importantes componentes em menor quantidade. Dentre estes, podem-se citar os alcoóis superiores, glicerol, aldeídos, ésteres e acetatos, compostos importantes para a formação do aroma de bebidas alcoólicas fermentadas, como o vinho (Lurton et al., 1995; Dias, 1996; Marques & Pastore, 1999).

### **2.3.2 Microbiologia da fermentação**

A fermentação é realizada, principalmente, por leveduras, embora alguns tipos de bactérias possam produzir álcool. As leveduras são fungos unicelulares, com tamanho médio de 5 a 8 μm de diâmetro (Pacheco et al., 2002), formadas por membrana plasmática, espaço periplasmático e parede celular, a qual é constituída, principalmente, por polissacarídeos e pequenas quantidades de peptídeos, apresentando uma estrutura semirrígida e permeável (Ward, 1991).

Dentre as leveduras existem linhagens responsáveis pela fermentação de grãos e frutas, sendo estas empregadas na indústria de vinhos e destilados, assim como na fermentação de massas para a fabricação de pães (Frazier et al., 1988; Menezes, 1997). De acordo com Roehr (1996) e Pacheco et al. (2002), geralmente, leveduras são hábeis para crescer e eficientes na produção de etanol em valores de pH de 3,5-6,0 e temperaturas de 28°-35°C. Entretanto, com a taxa inicial de produção de etanol, ocorre um aumento da temperatura (~40°C), o que ocasiona um decréscimo da produtividade global da fermentação. Esse

decréscimo está associado aos efeitos que a levedura sofre pela formação do produto, uma vez que esta é bastante susceptível a inibições pelo etanol. Concentrações de 1%–2% (p/v) de etanol são suficientes para retardar o crescimento da maioria das espécies de leveduras e, em concentrações em torno de 10% (p/v) de etanol, a taxa de crescimento é quase nula.

O progresso na tecnologia de bebidas levou à necessidade de seleção de linhagens de leveduras com características desejáveis ao processo e ao produto (Ribeiro et al., 1999). Segundo Laluce (1991), Hammond (1995), Pereira Júnior (1999), Ribeiro et al. (1999) e Sanches-Perses et al. (2000), características como alta produtividade, eficiência do processo, tolerância ao etanol e temperatura, resistência a altas concentrações de substrato, habilidade de flocular e de produzir ou não componentes do aroma são parâmetros de grande interesse na produção de bebidas.

O gênero *Saccharomyces* constitui o grupo de leveduras de maior importância industrial, sendo *S. cerevisiae* a mais utilizada na indústria de alimentos. No Brasil, são comumente utilizadas como agentes de bioprocessos na panificação, na elaboração de bebidas, como cerveja, vinho, cachaça e na produção de bioetanol (Macedo, 1993; Ogawa et al., 2000; Pacheco et al., 2002).

Ressalta-se que as leveduras têm sido empregadas em bioprocessos há mais de 8.000 anos e podem fermentar apenas mono e oligossacarídeos (glicose, maltose, sacarose), em função da ausência da informação genética que codifica enzimas hidrolíticas necessárias à fermentação de carboidratos de maior complexidade estrutural (Santos et al., 1997).

As leveduras *Saccharomyces rouxii*, *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *S. uvarum* e espécies do gênero *Torulopsis*, *Pichia*, *Hansenula* e *Candida* são as mais utilizadas na produção de bebidas alcoólicas fermentadas, devido à sua capacidade de converter fontes de açúcares em álcool, sobreviver a altas concentrações de etanol, conferir às bebidas sabor e aroma agradáveis e não

produzirem compostos voláteis prejudiciais às características das bebidas (Frazier et al., 1988).

#### **2.4 Bebidas alcoólicas fermentadas de frutas**

A uva é a matéria-prima utilizada na produção do vinho, uma bebida alcoólica fermentada das mais antigas e de consumo mundial (Lima et al., 2001). De acordo com a Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, a denominação vinho é privativa da uva, sendo vedada sua utilização para produtos obtidos de quaisquer outras matérias-primas (Brasil, 1988).

Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA, Decreto Nº 6.871, de 4 de junho de 2009, bebida fermentada de fruta é aquela com graduação alcoólica de 4% a 14% em volume a 20°C, obtida da fermentação alcoólica do mosto de fruta sã, fresca e madura. Esse fermentado pode ser adicionado de açúcares, água e outras substâncias previstas em ato administrativo complementar, para cada tipo de fruta (Brasil, 2009).

Como não existem parâmetros para a caracterização química na legislação vigente para bebidas alcoólicas de frutas, normalmente, elas são caracterizadas com base na legislação estabelecida para vinhos.

Em geral, as operações do processo de fabricação de bebida alcoólica fermentada são: extração e preparo do mosto; fermentação alcoólica; trasfega; clarificação, maturação e armazenamento. Em escala industrial, essas operações são aplicadas na produção do vinho, mas também podem ser empregadas para outras frutas (Corazza et al., 2001). Teoricamente, qualquer fruto ou vegetal que contenha umidade, açúcar e nutrientes para as leveduras pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de bebidas alcoólicas fermentadas (Martinelli Filho, 1983).

Além da uva, bebidas alcoólicas fermentadas de frutos como maçã (*Pyrus malus* L.), pera (*Pyrus communis* L.), cereja (*Prunus cerasus* L.),

morango (*Fragaria xananassa Duch.*), framboesa (*Rubus idaeus L.*), laranja (*Citrus sinensis L.*), groselha (*Ribes rubrum L.*) e outros, são também produzidas e consumidas em vários países (Vogt & Jakob, 1986; Kolb, 2002). No Brasil, Muniz et al. (2002), Dias et al. (2003, 2007) e Duarte et al. (2009) realizaram estudos com diferentes espécies de frutos tropicais e do cerrado, como siriguela, graviola, cajá, cacau e gabioba, alcançando resultados promissores, demonstrando dessa forma mais uma opção para o aproveitamento destes frutos tropicais.

As bebidas fermentadas apresentam-se como alternativa para a obtenção de produtos derivados de frutas tropicais, oferecendo-lhe maior valor agregado, além de contribuírem para a redução de perdas pós-colheita de frutos perecíveis (Sandhu et al., 1995).

## **2.5 Imobilização de células**

Biocatalisadores imobilizados, enzimas ou células, são catalisadores fisicamente confinados ou localizados em uma região definida do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas e que podem ser utilizados repetida ou continuamente (Katchalski-Katzir & Kraemer, 2000).

Bekers et al. (2001) imobilizaram células de *S. cerevisiae* em esferas de aço inox modificado, para a produção de etanol. Os autores relataram que a imobilização aumentava a estabilidade das células e, também, a produção de etanol. As células imobilizadas foram utilizadas durante cinco ciclos de fermentação, sem perda de estabilidade. Kubal et al. (2004) utilizaram células de *S. cerevisiae* contendo a enzima catalase e imobilizadas em casca de ovo, para a remoção de peróxido de hidrogênio em leite. Os autores relataram que as células imobilizadas foram capazes de degradar todo o peróxido de hidrogênio durante dez reutilizações, sem perda de eficiência. Kubal et al. (2004) também relataram aumento da termoestabilidade enzimática após a imobilização. Sluis et al. (2001)

imobilizaram células da levedura halo-tolerante *Candida versatilis* e *Zygosaccharomyces rouxii*, em gel de óxido de polietileno para a produção de sabor e aroma em molho de soja. Os autores relataram que a imobilização diminuía consideravelmente o tempo requerido para o desenvolvimento destes atributos.

### **2.5.1 Vantagens e desvantagens**

O uso de sistemas com células imobilizadas tem sido considerado como uma alternativa viável para aumentar a produtividade em razão das elevadas densidades celulares normalmente obtidas (Rama-Krishna & Prakasham, 1999).

A imobilização eleva a atividade fermentativa da levedura, promovendo a adaptação das células ao meio e eliminando a fase lag em bateladas sucessivas de fermentação (Duran et al., 1986). Em sistemas com células imobilizadas consegue-se maior massa de células por unidade de volume de trabalho do que em sistemas descontínuos, contínuos e de recuperação de células trabalhando com células livres (Williams et al., 1981; Pilkington et al., 1998).

Outras vantagens do uso de células imobilizadas em relação ao uso de células em suspensão no meio de fermentação são: a facilidade de reutilização dos biocatalisadores, o aumento da estabilidade destes biocatalisadores e a redução de custos operacionais (Pilkington et al., 1998; Rama-krishna et al., 1999; Carvalho et al., 2006). O sistema que utiliza células livres de leveduras em modo contínuo de fermentação é limitado, uma vez que podem ocorrer perdas de células no fermentador. Além disso, as células imobilizadas são mais resistentes a condições adversas, uma vez que a matriz de imobilização, geralmente, resulta em maior proteção a estas células. Por este motivo, procura-se produzir etanol com células imobilizadas (Lee et al., 1983).

Os reatores com células imobilizadas permitem alto desempenho porque trabalham com altas densidades de células fixadas nos suportes. Uma

desvantagem é que o estado fisiológico dos organismos não pode ser controlado (Borenstein, 2003). Isso é particularmente prejudicial nos sistemas em que o metabólito secundário é o produto principal, pois é produzido na fase estacionária ou de decréscimo de atividade (Hamdy et al., 1990).

Resumidamente, há três motivos básicos para utilizar a imobilização de células: 1. reutilizar o biocatalisador por mais de um ciclo fermentativo; 2. utilizar um processo contínuo sem reciclo celular e 3. aumentar a estabilidade do biocatalisador em relação às variações de pH, temperatura, concentração de nutrientes ou do meio de fermentação (Hamdy et al., 1990).

É interessante lembrar que um fator importante para o sucesso do uso de biocatalisadores imobilizados é a adequada escolha do suporte e da técnica de imobilização (Brodelius et al., 1987).

### **2.5.2 Técnicas de imobilização**

Segundo Pilkington et al. (1998), as técnicas de imobilização podem ser divididas em quatro categorias principais, baseadas nos mecanismos físicos empregados: fixação ou adsorção em suporte sólido, aprisionamento em matriz porosa, agregação por meio de floculação natural ou artificial e retenção de célula atrás de barreiras (FIGURA 6).

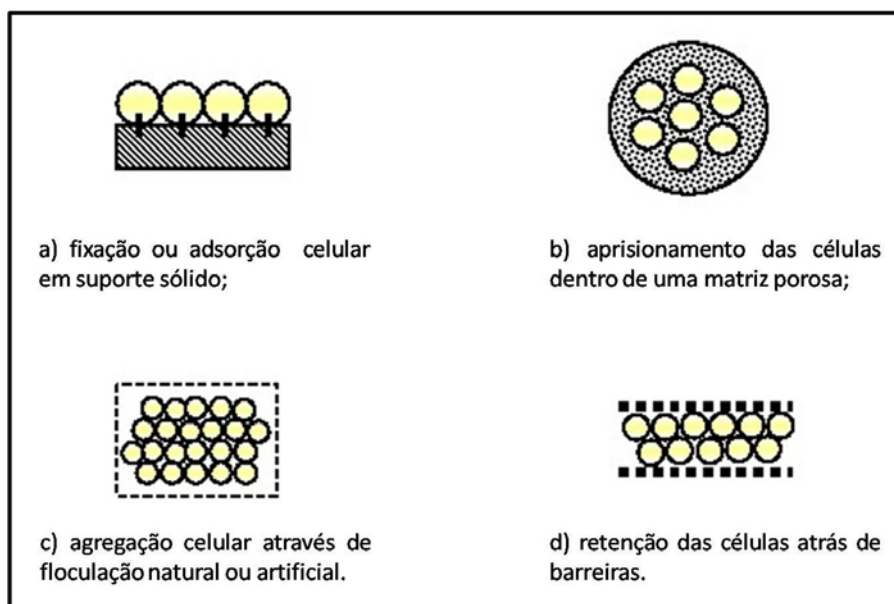


FIGURA 6 Técnicas básicas de imobilização.

A imobilização de célula em um suporte sólido ocorre por adsorção física devido a forças eletrostáticas ou por ligação covalente entre o suporte e a membrana da célula.

Sistemas nos quais são utilizadas células imobilizadas em uma superfície sólida são bastante populares, devido à facilidade relativa da realização desse tipo de imobilização. Como exemplo de suportes sólidos utilizados nesse tipo de imobilização, podem-se citar materiais derivados de celulose (DEAE-celulose, madeira, serragem, serragem deslignificada) e materiais inorgânicos (porcelana porosa, vidro poroso). Materiais como vidro ou celulose também podem ser tratados com polications, quitosan ou outras substâncias químicas (pré-formadores de suportes), para aumentar sua capacidade de adsorção (Navarro et al., 1977; Norton et al., 1994).

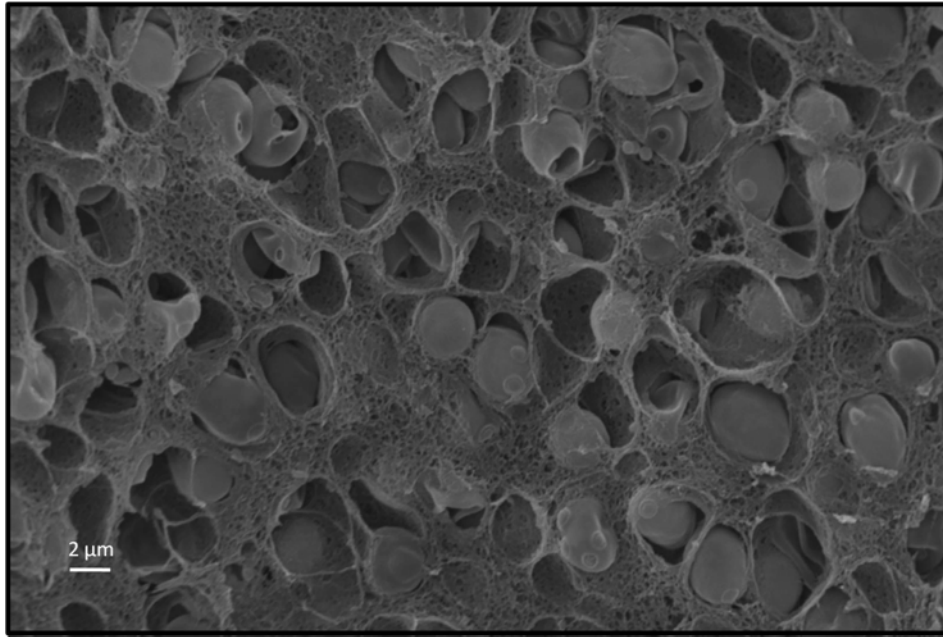


FIGURA 7 Imobilização celular por aprisionamento dentro de uma matriz porosa. Microscopia eletrônica de varredura em bioesfera de alginato de cálcio. (Foto: Mara Elisa Soares de Oliveira)

A imobilização por aprisionamento dentro de uma matriz porosa é baseada na inclusão de células dentro de uma rede rígida, impedindo que as células se difundam no meio circunvizinho, enquanto permitem ainda a transferência de nutrientes e metabólitos (FIGURA 7).

Exemplos característicos deste tipo de imobilização é o aprisionamento em géis de polissacarídeos, como alginato, ágar, chitosan e ácido poligalacturônico ou outras matrizes poliméricas, como gelatina, colágeno e álcool de polivinil (Norton et al., 1994; Park et al., 2000).



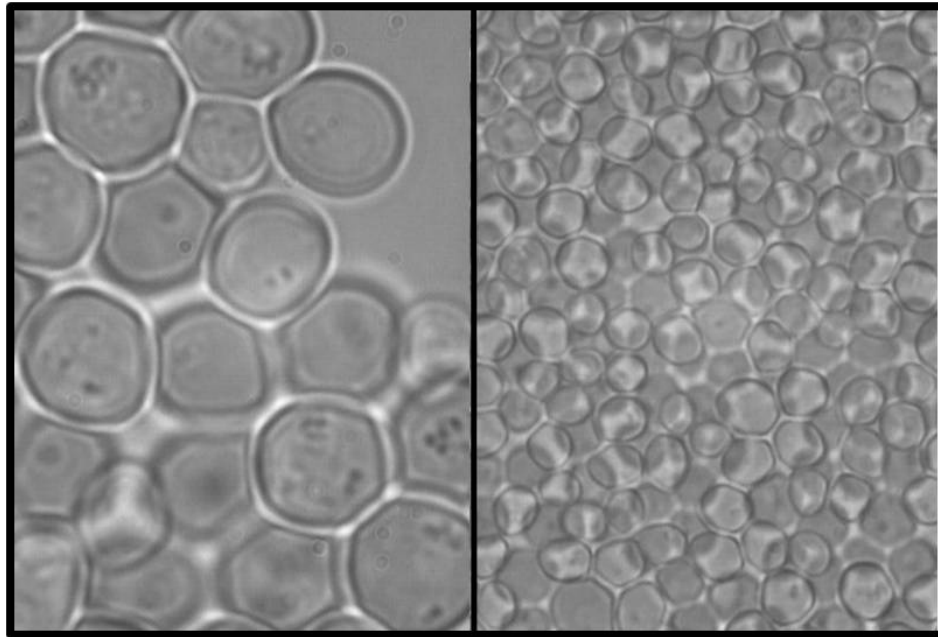


FIGURA 8 Imobilização celular por floculação. Microscópio ótico, aumento de 400 x, esquerda e 100x, direita. (Fotos: Disney R. Dias)

Floculação de células tem sido definida, por muitos autores, como a agregação de células que formam uma unidade maior ou a propriedade das células em suspensões de aderirem em grupo e sedimentar rapidamente (FIGURA 8).

Floculação pode ser considerada como uma técnica de imobilização com uso potencial em reatores, devido ao grande tamanho dos agregados formados. A capacidade de formar agregados é principalmente observada em fungos e células de plantas. A floculação de leveduras é uma propriedade de grande importância para a indústria de cerveja e para a cachaça produzida em Minas Gerais, afetando a produtividade e a qualidade, além da remoção e da

reutilização das leveduras. A floculação é afetada por muitos fatores, inclusive composição da parede celular, pH, oxigênio dissolvido e composição do meio (Jin et al., 1998).

Retenção de células por barreira pode ser obtida pelo uso de membrana de microporos, por aprisionamento das células em microcápsula ou pela imobilização da célula em uma superfície de interação com dois líquidos imiscíveis. As desvantagens principais da imobilização de células em membranas de microporos são: limitações de transferência de massa (Lebeau et al., 1998) e possível obstrução de membrana causada pelo crescimento das células (Gryta, 2002).

### **2.5.3 Aplicações de biocatalisadores Imobilizados**

Biocatalisadores, enzimas ou células têm sido amplamente utilizadas em diversos processos, seja em escala laboratorial ou industrial. Há muitos anos, esforços intensivos têm sido empreendidos não somente no desenvolvimento de biocatalisadores com propriedades superiores, mas também na elucidação de técnicas que permitam o seu uso repetido ou em processos contínuos (Gerbsch et al., 1995). Provavelmente, o mais antigo dos processos que faz uso das células imobilizadas remonta ao século passado e se constitui na fermentação acética de uma corrente de vinho, que é reciclada por meio de um leito fixo formado de suporte, o qual abriga uma população nativa de microrganismos acidogênicos (Scott, 1987).

Apesar dos estudos sobre imobilização de células, a aplicação desta tecnologia em escala industrial é ainda limitada (Gerbsch et al., 1995). Como exemplos de sua aplicação, podem ser citados:

- produção de antibióticos (Jack et al., 1977; Fukui et al., 1982): a imobilização é utilizada na síntese do antibiótico thienamicina, por

células de *Streptomyces cattleya*, segundo a metodologia descrita por Arcuri et al. (1983);

- tratamento de resíduos, em que populações de bactérias não definidas formam um filme de biomassa sobre superfícies sólidas que ficam retidas dentro de leitos fixos ou fluidizados. Essas bactérias agem nos resíduos, por meio de processos de nitrificação, denitrificação e produção de metanol (Scott, 1987; Boucquey et al., 1995);

- produção de acrilamida a partir de acrilonitrila por células não viáveis de *Rhodococcus rhodochrous*, pela Nitto Chemical Industries, Japão (Katchalski et al., 2000);

- a produção de biossensores é também uma área na qual técnicas de imobilização têm sido aplicadas com sucesso. De acordo com Dong & Chen (2002), esses equipamentos, baseados na incorporação de elementos biológicos (enzimas ou células) em uma camada sensível intimamente conectada com um transdutor, têm sido amplamente aplicados em diversos campos, como monitoramento de processos industriais, testes de detecção clínicos e controle ambiental, entre outros;

- elaboração de bebidas alcoólicas fermentadas. Pantoja et al. (2005) elaboraram bebida alcoólica fermentada de graviola utilizando levedura *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em alginato de cálcio.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Coleta das frutas e preparação do mosto**

A coleta dos frutos foi realizada na região sul do Tocantins, no município de Figueirópolis, em outubro de 2008. Os frutos maduros, de caducidade espontânea, foram coletados no chão, manualmente (FIGURA 9).



FIGURA 9 Frutos da cagaita maduros caídos no chão. (Foto: Figueirópolis, TO, 2007, Mara Elisa Soares de Oliveira)

Para o preparo do mosto e realização do experimento foram selecionados somente frutos maduros de bom aspecto (sem injúria física, podridão ou contaminação visível). Após a seleção, os frutos foram lavados em água clorada, a 5 ppm, por 30 minutos, para eliminar possíveis microrganismos existentes, e enxaguados em água corrente.

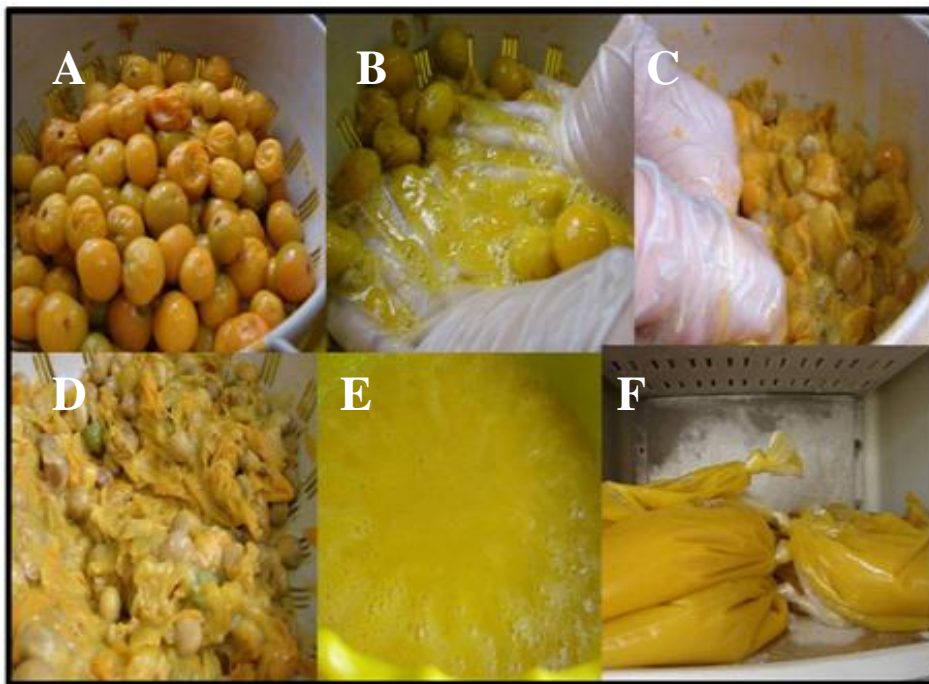


FIGURA 10 Obtenção da polpa. (a) Frutos de cagaita inteiros; (b/c) despulpamento manual; (d) cascas e sementes; (e) polpa; (f) polpa embalada em sacos plásticos. (Fotos: 2008, Mara Elisa Soares de Oliveira)

A polpa foi obtida por meio do despulpamento manual, seguida de passagem em peneira, para a remoção das sementes, e coada para a separação do bagaço. A polpa foi embalada em sacos plásticos com capacidade para 2 litros e congelada sem aditivo químico (FIGURA 10). Retirou-se uma amostra de 500 mL da polpa para a sua caracterização química.

A polpa congelada foi acondicionada em caixas térmicas e encaminhada para o Laboratório de Microbiologia, no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

A caracterização química da polpa foi conduzida no Laboratório de Análise de Alimentos, no Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA, em Lavras, MG, Brasil, onde as seguintes análises foram realizadas:

- açúcares totais (Official Method of Analysis - AOAC, 2000);
- açúcares redutores (Yemm & Willis, 1954);
- amido total (AOAC, 2000);
- pectina total e pectina solúvel (McCreedy & McComb, 1952; Bitter & Muir, 1962);
- vitamina C (Strohecker & Henning, 1965);
- fenólicos solúveis em água, fenólicos solúveis em metanol e fenólicos solúveis em metanol 50% (Reicher et al., 1981);
- pectinametilesterase ( Buescher & Furmanski, 1978; Hultin et al., 1966; Ratner et al., 1969);
- poligalacturonase (Buescher & Furmanski, 1978; Markovic et al., 1975).

As análises de pH, acidez titulável e sólidos solúveis totais foram realizadas pelos métodos físico-químicos para análise de alimentos, do Instituto Adolfo Lutz (2005) e realizadas no Laboratório de Microbiologia, no Departamento de Biologia da UFLA.

Para o preparo do mosto, a polpa foi descongelada, por 24 horas, à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

A correção de açúcar do mosto (chaptalização) foi feita com solução de sacarose até o °Brix final de 20.

A sulfitação foi realizada adicionando-se metabissulfito de potássio, na proporção de 0,1g/L. O metabissulfito foi diluído em 500 mL de mosto e adicionado uma única vez no fermentador, antes da adição do inóculo.

### **3.2 Preparação do inóculo**

#### **3.2.1 Células livres**

Duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, codificadas como UFLA CA11 e CAT1 liofilizadas, foram utilizadas como inóculos. Visando atingir população celular de  $10^7$ /mL, utilizaram-se 8 g da levedura UFLA CA11, reidratada em 80 ml de água destilada estéril, a 38°C, por 30 minutos e 10g da CAT1, reidratada em 100 mL de água destilada estéril, a 38°C, por 30 minutos.

#### **3.2.2 Células imobilizadas**

As células das duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* previamente citadas foram imobilizadas em alginato de cálcio, conforme metodologia proposta por Pantoja et al. (2005). As leveduras liofilizadas foram reidratadas em água destilada estéril, a 38°C, por 24 horas.



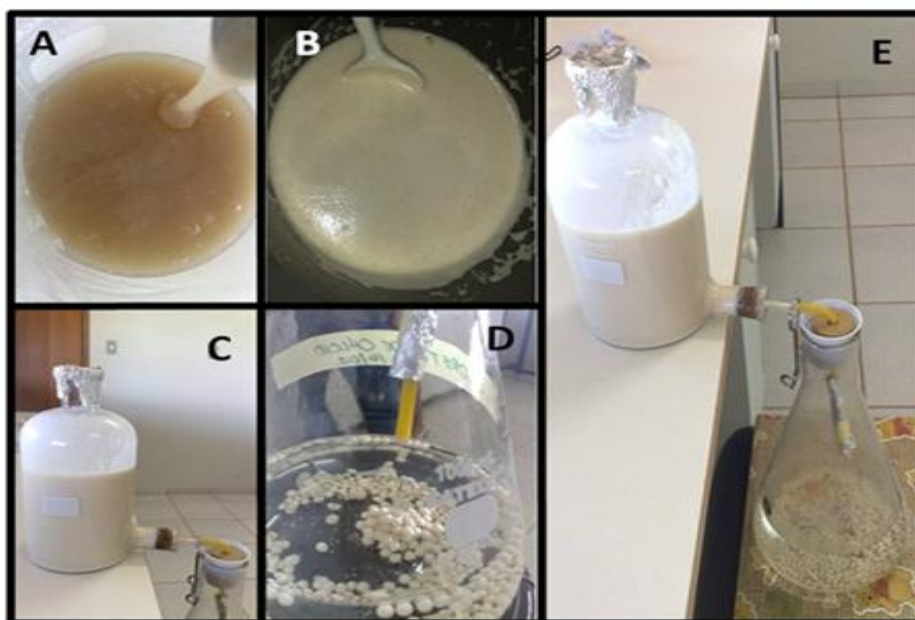


FIGURA 11 Processo de imobilização celular das leveduras UFLACA11 e CAT1. (A) Alginato de sódio hidratado; (B) células hidratadas; (C) suspensão celular em alginato de sódio; (D) suspensão celular em alginato de sódio gotejando em solução cloreto de cálcio, formando as bioesferas; (E) visão geral do sistema de imobilização. (Fotos: Mara Elisa Soares de Oliveira)

Para a obtenção das células imobilizadas (bioesferas) (FIGURA 11), prepararam-se 1,0 L de suspensão de células de *S. cerevisiae* UFLA CA11 e outra suspensão de CAT1, na concentração de 141g/L, adicionadas de 20 g de alginato de sódio (concentração final de 2% de alginato). Essa mistura foi vertida em frasco de Mariotte e, após homogeneização, procedeu-se ao gotejamento em solução de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M, sendo formadas as bioesferas de alginato de cálcio contendo células de leveduras aprisionadas em seu interior.

Alguns parâmetros do sistema de imobilização foram avaliados, entre eles o tempo gasto e o número de gotas para se obter 5 mL da suspensão e

contagem das células viáveis na suspensão. Com base nesses dados, foram obtidos os seguintes parâmetros: volume de cada bioesfera, números de bioesferas formadas por minuto e concentração celular em cada bioesfera.

Os mostos foram inoculados com 6.000 bioesferas. Após o processo fermentativo, uma amostra representativa de bioesferas de cada levedura foi macerada em 0,9 mL de água peptonada 1% e, após diluição seriada, foi realizada a contagem de células em câmara de Neubauer com azul de metileno. Esse procedimento foi realizado para se obter o número médio de células por bioesfera ao final do processo fermentativo.

### **3.3 Fermentação**

Quatro processos fermentativos em batelada simples foram realizados. A diferença entre eles foi as duas linhagens da levedura e a forma de inóculo, com células livres ou células imobilizadas.

Após a correção do °Brix para 20 e a adição de metabissulfito de potássio, foram colocados 4 L de mosto em cada fermentador. Cada fermentador recebeu uma forma de inóculo. Para as fermentações com células livres, os inóculos foram: suspensão celular da levedura UFLA CA11 e suspensão celular da levedura CAT1. Para as fermentações com células imobilizadas, os inóculos foram: 6.000 bioesferas da levedura UFLA CA11 e 6.000 bioesferas da CAT1.

Os fermentadores foram mantidos em temperatura de 22°C. A cada 8 horas, monitoravam-se acidez titulável, pH, sólidos solúveis totais (°Brix) e células viáveis em suspensão, além da coleta de amostra (2 mL), que foi congelada para posteriormente ser submetida a análises cromatográficas.

### **3.4 Análises durante o processo de fermentação**

#### **3.4.1 Sólidos solúveis totais, pH e acidez titulável**

As análises de pH, acidez titulável e sólidos solúveis totais foram realizadas por meio dos métodos físico-químicos para análise de alimentos, do Instituto Adolfo Lutz (2005).

#### **3.4.2 Células viáveis em suspensão**

Para a determinação de células viáveis em suspensão no mosto em fermentação, utilizou-se a técnica de contagem do número de células viáveis em câmara de Neubauer com coloração com azul de metileno.

#### **3.4.3 Análises cromatográficas**

As amostras coletadas a cada 8 horas dos processos fermentativos foram submetidas a análises cromatográficas para a determinação dos compostos alcoóis (etanol, metanol e glicerol) e carboidratos (sacarose, glicose e frutose).

As análises foram realizadas em cromatógrafo de fase líquida Shimadzu, modelo LC-10Ai, equipado com detectores de índice de refração, modelo RID-10A, e de ultravioleta, modelo SPD-10Ai. A coluna utilizada foi de troca catiônica (poliestireno divinil-benzeno), modelo Shim-pack SCR-101H de 30 cm de comprimento e 7,9 mm de diâmetro e cromatógrafo de fase gasosa Shimadzu, modelo 17A, equipado com detector de chama ionizada (FID). As análises foram realizadas segundo a metodologia de Duarte et al. (2009).

### **3.5 Trásfega, clarificação e armazenamento**

Ao final da fermentação, foi feita uma trásfega na bebida, com aeração (Rizzon et al., 1996).

A clarificação da bebida foi realizada pela adição de bentonite, na concentração de 1g/L da bebida, segundo Vogt et al. (1986), a partir de uma solução estoque de 10 % em água destilada preparada de acordo com Dias et al. (2007).

Após adicionar-se a bentonite à bebida, ela foi mantida em repouso sob refrigeração a 8°C, por 30 dias, para favorecer a decantação do material sólido presente. Depois, foi realizada uma nova trasfega e a bebida límpida foi, então, acondicionada em garrafas de vidro com capacidade para 750 mL e estas fechadas com rolhas. A bebida foi mantida sob refrigeração, a 8°C. Um volume de 500 mL, não engarrafado, foi reservado para as análises químicas posteriores.

### **3.6 Análises na bebida**

#### **3.6.1 Análises químicas**

É importante a caracterização química da bebida para observar se há concordância entre os limites estabelecidos por lei e a concentração dos analitos na bebida obtida.

As análises de pH, acidez titulável e sólidos solúveis totais foram determinados pelos métodos físico-químicos para análise de alimentos, do Instituto Adolfo Lutz (2005), e realizadas no Laboratório de Microbiologia (UFLA/DBI, Lavras-MG, Brasil).

As análises de açúcares totais (AOAC, 2000), açúcares redutores (glicose, frutose) (Yemm & Willis, 1954), açúcares não redutores (sacarose), vitamina C total (Strohecker & Henning, 1965) e fenólicos solúveis em água (Reicher et al., 1981), foram realizadas no Laboratório de Análises de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA, em Lavras, MG, Brasil.

As análises de acidez total, acidez volátil, dióxido de enxofre total e dióxido de enxofre livre foram realizadas no Laboratório de Enologia (Vinícola

Salton, Bento Gonçalves/RS, Brasil), segundo metodologia proposta pelo Ministério da Agricultura, Brasil (1985).

As análises de alcoóis (etanol, metanol e glicerol), carboidratos (sacarose, glicose e frutose) foram realizadas no Laboratório de Microbiologia (UFLA/DBI, Lavras, MG, Brasil) por cromatografia (Duarte et al., 2009), conforme descrito anteriormente no item 3.4.3.

### **3.6.1 Análise sensorial**

Para a análise sensorial das bebidas, foram selecionados 50 provadores não treinados, constituídos de alunos e professores da Universidade Federal de Lavras (UFLA), com faixa etária superior a 18 anos, de ambos os sexos, sendo todos consumidores de algum tipo de bebida alcoólica fermentada. Cada um dos provadores provou 20 mL de cada uma das quatro bebidas. As amostras foram servidas, separadamente, em taças descartáveis transparentes, à temperatura de aproximadamente 10°C. Para as avaliações sensoriais de aceitabilidade com relação aos atributos aparência, aroma e sabor e quanto à aceitação global de cada uma das bebidas, os provadores preencheram uma ficha de avaliação na forma de escala hedônica de nove pontos, adaptada de Moraes (1993), que varia de (1) desgostei extremamente até (9) gostei extremamente.

### **3.7 Microscopia eletrônica**

Foi realizada microscopia eletrônica de varredura nas bioesferas, antes e após serem utilizadas na fermentação, para a visualização das estruturas e suas possíveis modificações em decorrência do processo fermentativo. Utilizou-se microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40, de acordo com o protocolo para microscopia eletrônica de varredura (MEV), descrito por Bossola & Russell (1998).

### **3.8 Análise estatística**

Os dados das análises químicas das bebidas fermentadas de cagaita foram analisados por análise de variância (ANOVA), utilizando delineamento inteiramente casualizado. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando software de estatística Sisvar 4.3 (Ferreira, 2000).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização química da polpa

A polpa foi quimicamente caracterizada antes de iniciar o processo de fermentação. A média dos resultados, obtida em triplicata, encontra-se na TABELA 1.

A polpa de cagaita apresentou valor médio de pH de 3,21, o que a caracterizou como uma fruta ácida. Brito et al. (2003) encontraram valores de pH de 2,12 e 2,30, para frutos de cagaita maduros e imaturos, respectivamente. As concentrações encontradas de sólidos solúveis totais de 8,3°Brix, acidez titulável de 0,5% e relação de sólidos solúveis totais/acidez titulável de 16,6, garante a polpa boas qualidades gustativas (Oliveira Júnior et al., 1997).

O conteúdo de pectina verificado na polpa de cagaita foi de 0,95%, próximo ao da mangaba (0,81%), conforme Brito et al. (2003).

TABELA 1 Caracterização da polpa de cagaita.

<b>Características</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
Sólidos Solúveis Totais(°Brix)	8,3	± 0,20
Acidez total titulável (% ácido cítrico)	0,5	± 0,00
Relação Brix/Acidez	16,6	± 0,40
pH	3,21	± 0,01
Amido (%)	0,66	± 0,02
Açúcares redutores (%)	5,18	± 0,06
Açúcares totais (%)	6	± 0,17
Fenólicos Solúveis em água (%)	1,4	± 3,64
Fenólicos Solúveis em metanol (%)	1,64	± 3,30
Fenólicos Solúveis em metanol 50% (%)	2,07	± 4,57
Pectina total (%)	0,95	± 2,11
Pectina Solúvel (%)	0,5	± 0,03
Poligalacturonase (unidade/g.min)	66,51	± 0,93
Pectinametilsterase (unidade/g.min)	500	± 0,00
Vitamina C (mg/100g)	40,11	± 1,59

#### 4.2 Chaptalização e sulfitação do mosto

A chaptalização é uma prática enológica permitida, na qual o teor de açúcar do mosto a fermentar pode ser corrigido para que um determinado grau alcoólico na bebida final seja alcançado (Brasil, 1988).

A chaptalização foi realizada baseando-se no °Brix do mosto. O teor de sólidos solúveis totais observado na polpa de cagaita foi de 8,3°Brix, mas, após a diluição, o mosto apresentou 4,15 °Brix. Na TABELA 2 são apresentadas as correções com sacarose feitas no mosto.



TABELA 2 Utilização de sacarose para chaptalização do mosto de cagaita.

<b>°Brix da polpa</b>	<b>°Brix inicial do mosto</b>	<b>Sacarose adicionada (g/L)</b>	<b>°Brix do mosto após correção</b>	<b>Grau alcoólico médio das bebidas (°GL)</b>
8,3	4,15	197	20	11,52

A chaptalização realizada no mosto de cagaita elevou o °Brix para 20, o que era esperado, de acordo com Corazza et al. (2001). Notou-se, porém, ligeira diferença quando comparados os valores de grau alcoólico final da bebida em função do °Brix inicial, tendo sido observado rendimento de 57% em etanol em função do teor de sólidos solúveis (°Brix), contra valores teóricos de 60%, descritos por Cataluña (1988) e Hashizume (1997), a partir de mostos de uva e de 50% descrito por Dias et al. (2003), a partir de mosto de cajá.

Como a determinação do °Brix refratométrico indica sólidos solúveis, não necessariamente constituídos de açúcares na sua totalidade, os valores obtidos para a polpa de cagaita inferem que, no grau Brix inicial, são substâncias não fermentescíveis, as quais podem ter diminuído o rendimento alcoólico final da bebida (Dias et al., 2003, 2007).

O mosto de cagaita foi sulfitado com a adição de metabissulfito de potássio cristalino. A concentração utilizada foi de 0,1 g.L<sup>-1</sup> de mosto (Rizzon, 1996). Nessa concentração, o SO<sub>2</sub> mostrou ser eficiente no controle microbiano. Durante a contagem de células no processo fermentativo, não foi observada a presença de bactérias.

## 4.2 Concentrações do inóculo

### 4.2.1 Células livres

As duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* codificadas como UFLA CA11 e CAT1 produziram um bom inóculo na forma em que foram preparadas. Iniciando a fermentação, ambas com  $10^7$  cel.mL<sup>-1</sup>, concentração ideal para iniciar a fermentação de mostos de frutas (Dias et al., 2003). Durante o processo fermentativo, a concentração celular foi mantida entre  $10^6$  e  $10^8$  cel.mL<sup>-1</sup> (FIGURA 12), para as duas leveduras, mostrando sua boa adaptação ao meio de fermentação.

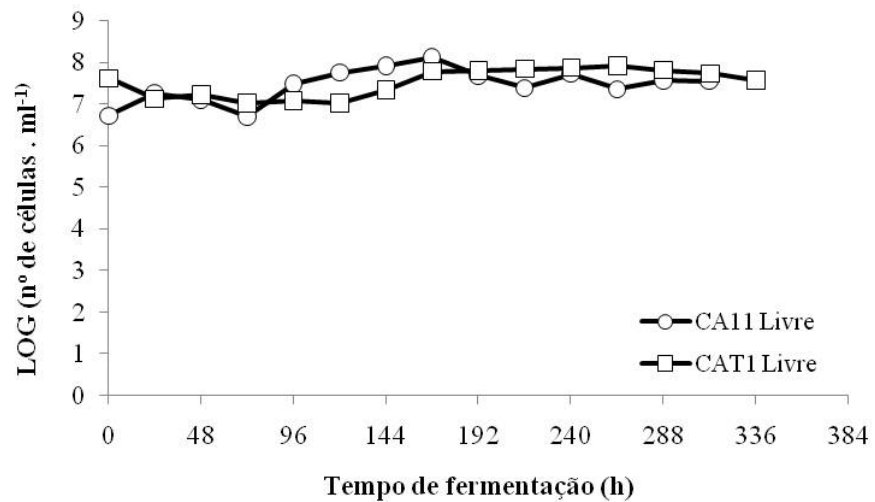


FIGURA 12 Concentração de células viáveis em suspensão durante os processos fermentativos para a obtenção de bebidas alcoólicas fermentadas de cagaita com as leveduras livres UFLA CA11 e CAT1.

#### 4.2.2 Células imobilizadas

As duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA11 e CAT1 foram imobilizadas em alginato de cálcio (FIGURA 13).



FIGURA 13 Bioesferas de alginato de cálcio.

TABELA 3 Parâmetros observados durante o processo de imobilização celular.

<b>Levedura</b>	<b>Volume médio das bioesferas (ml)</b>	<b>Número de bioesferas produzidas por minuto</b>	<b>Concentração celular (cel/bioesfera)</b>
CAT1	0,075	67	$4,34 \times 10^8$
UFLA CA11	0,07	14	$3,03 \times 10^8$

Os parâmetros observados durante o processo de imobilização celular encontram-se na TABELA 3.

O processo de imobilização da levedura UFLA CA11 demandou maior tempo devido ao fato de a suspensão celular se apresentar mais viscosa que a suspensão da levedura CAT1. Este fato pode ser observado pela diferença do número de bioesferas produzidas por minuto para cada levedura e pode ser justificado pela característica floculante da levedura UFLA CA11.

Como inóculo, utilizaram-se 6.000 bioesferas para cada processo fermentativo. A concentração celular no início dos processos fermentativos com leveduras imobilizadas foi de, aproximadamente,  $2,6 \times 10^9$  cel.mL<sup>-1</sup> e  $1,8 \times 10^9$  cel.mL<sup>-1</sup>, para CAT e UFLA CA11, respectivamente.

Esperava-se que as bioesferas apresentassem estabilidade mecânica e biológica, de acordo com Pantoja (2005). Entretanto, foram observadas perdas de células da matriz (suporte) para o meio fermentativo e rompimentos em algumas bioesferas na recuperação (FIGURA 14).



FIGURA 14 Aspectos das bioesferas rompidas ao final do processo fermentativo.

Os processos fermentativos iniciaram com  $0 \text{ cel.mL}^{-1}$  livres em suspensão. Após 24 horas, essa concentração aumentou para cerca de  $10^3 \text{ cel.mL}^{-1}$  livres nos processos fermentativos com células imobilizadas de UFLA CA11 e CAT1 (FIGURA 15), indicando haver desprendimento celular e consequente instabilidade mecânica do suporte.

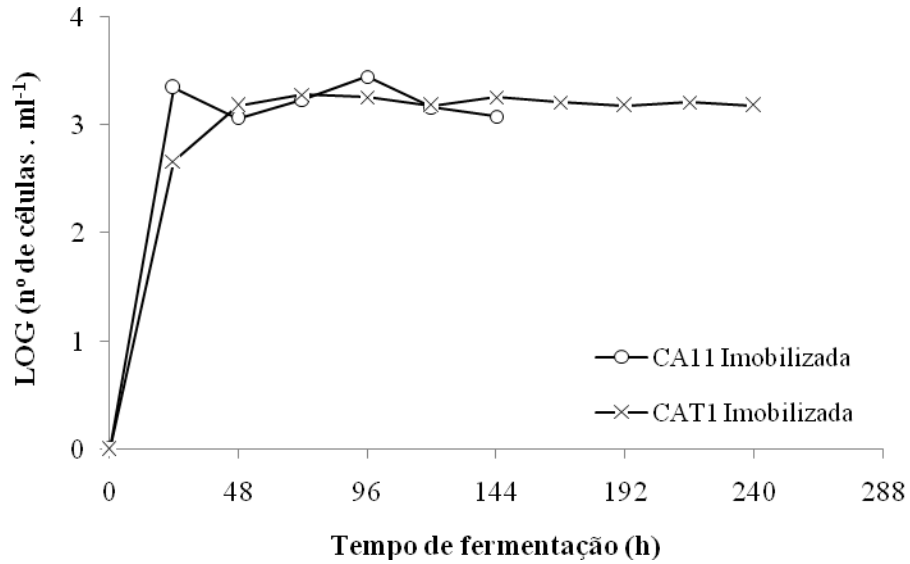


FIGURA 15 Concentração de células viáveis em suspensão, durante os processos fermentativos, para a obtenção de bebidas alcoólicas fermentadas de cagaita com as leveduras imobilizadas UFLA CA11 e CAT1.

Foi observado também aumento na concentração celular na bioesfera após o processo fermentativo (TABELA 4). Esse aumento de massa celular pode ter saturado a capacidade do suporte, o que levou ao rompimento de algumas bioesferas e à consequente liberação de células para o meio (FIGURA 15).

TABELA 4 Concentração celular nas bioesferas antes e após o processo fermentativo.

<b>Levedura</b>	<b>Concentração celular antes da fermentação (cel/bioesfera)</b>	<b>Concentração celular após a fermentação (cel/bioesfera)</b>
CAT1	$1,24 \times 10^8$	$2,45 \times 10^9$
UFLA CA11	$1,3 \times 10^8$	$1,67 \times 10^9$

O aumento da massa celular nas bioesferas pode ser observado comparando-se as micrografias eletrônicas de varredura das FIGURAS 16 e 17. Na FIGURA 16 observam-se as células da levedura CAT1 e, na FIGURA 17, as células da levedura UFLACA11, ambas imobilizadas em alginato de cálcio. As micrografias *a*, *b*, e *f* foram realizadas nas bioesferas, antes de passarem pelo processo fermentativo; já *c*, *d*, *g* e *h* foram realizadas nas bioesferas, após a fermentação. As micrografias *a*, *b*, *c* e *d* mostram a superfície das bioesferas, enquanto *e*, *f*, *g* e *h* apresentam o interior das bioesferas.

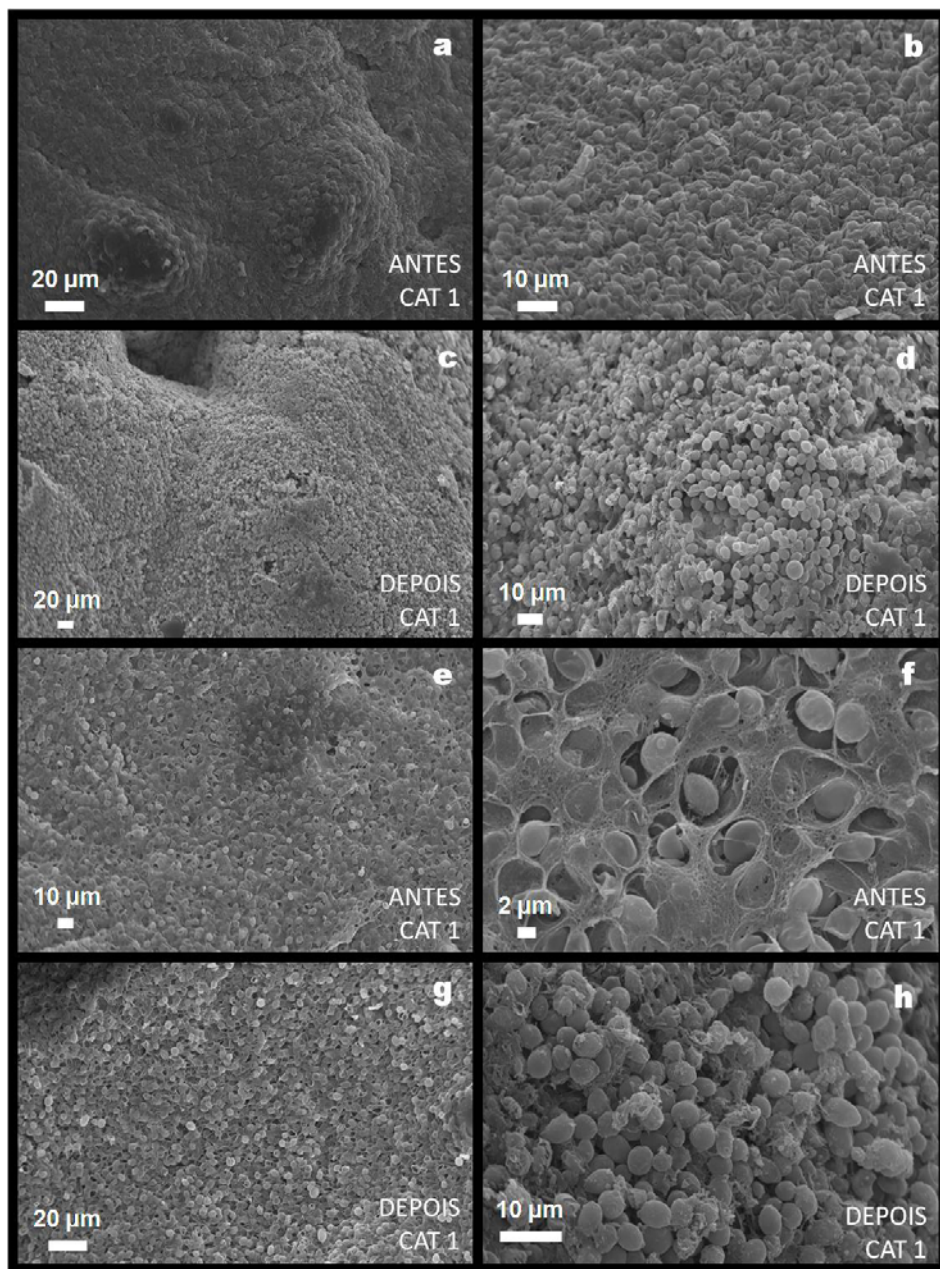


FIGURA 16 Micrografias eletrônicas de varredura realizadas na superfície (a, b, c, d) e no interior (e, f, g, h) das bioesferas de alginato de cálcio (levedura CAT1), antes (a, b, e, f) e após (c, d, g, h) a fermentação.



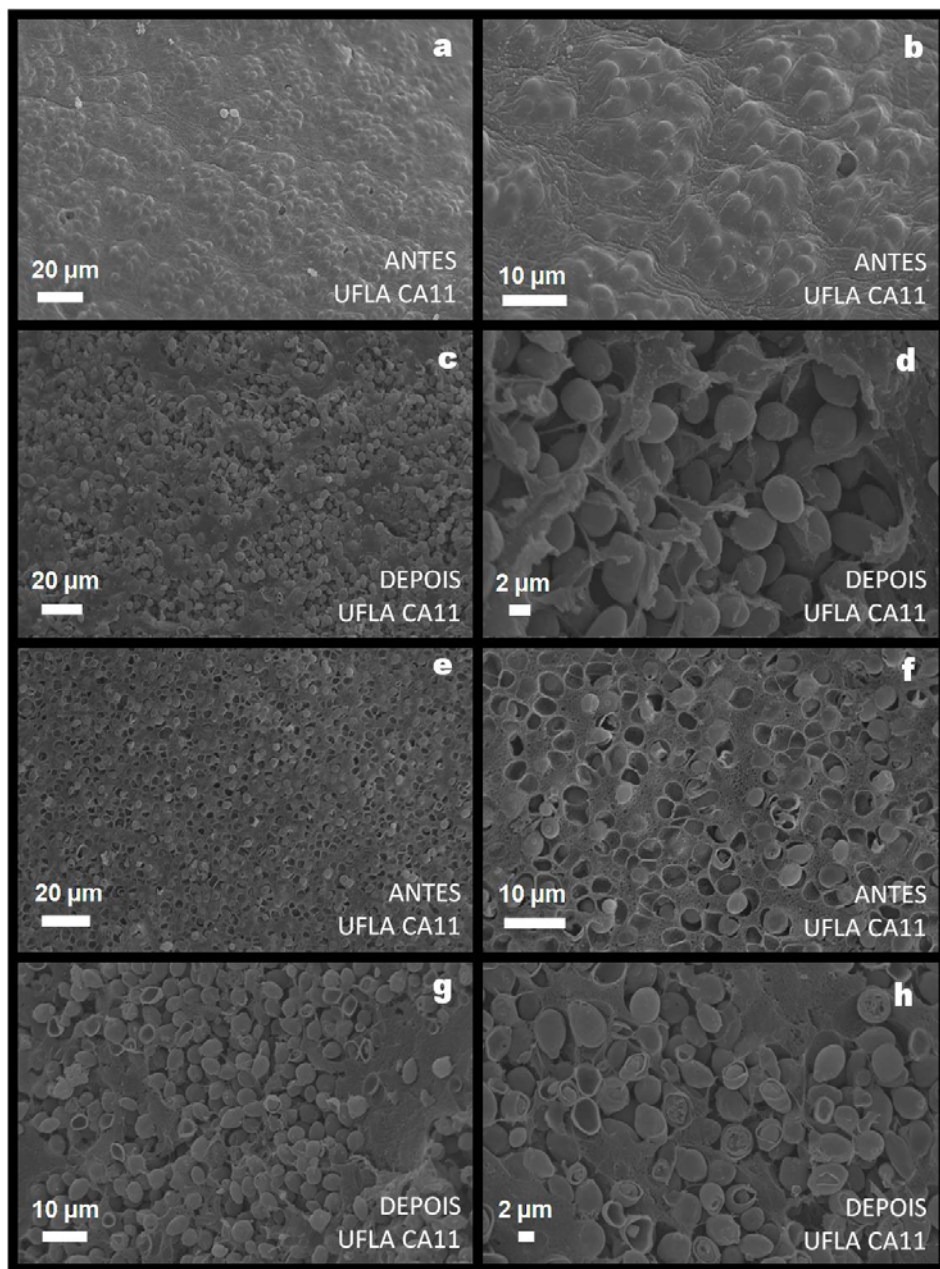


FIGURA 17 Micrografias eletrônicas de varredura realizadas na superfície (a, b, c, d) e no interior (e, f, g, h) das bioesferas de alginato de cálcio (levedura UFLA CA11), antes (a, b, e, f) e após (c, d, g, h) a fermentação.

O maior número de células em cada bioesfera após a fermentação deve-se à boa adaptação celular ao meio fermentativo e à consequente multiplicação celular.

### **4.3 Fermentação e análises durante o processo**

A duração da fermentação variou de 4 a 8 dias, para os processos conduzidos com as leveduras imobilizadas UFLA CA11 e CAT1, respectivamente, e de 10 a 12 dias para as bebidas fermentadas com as leveduras livres UFLA CA11 e CAT1, respectivamente. Durante os primeiros dias da fermentação, foram observadas diferenças quanto ao consumo de sólidos solúveis totais entre os mostos de cagaita (FIGURA 18).

O consumo dos açúcares foi mais rápido nos mostos inoculados com leveduras imobilizadas em relação à fermentação com células livres, sendo melhor a performance da UFLA CA11, que encerrou o processo em tempo inferior à CAT1 (FIGURA 18 e 19). No entanto, os quatro processos apresentaram, no final da fermentação, resultados próximos quanto aos teores de sólidos solúveis totais, que foram de 5,7; 5,7; 6,0 e 5,9°Brix para os processos fermentativos inoculados com as leveduras imobilizadas UFLA CA11 e CAT1 e leveduras livres UFLA CA11 e CAT1, respectivamente.

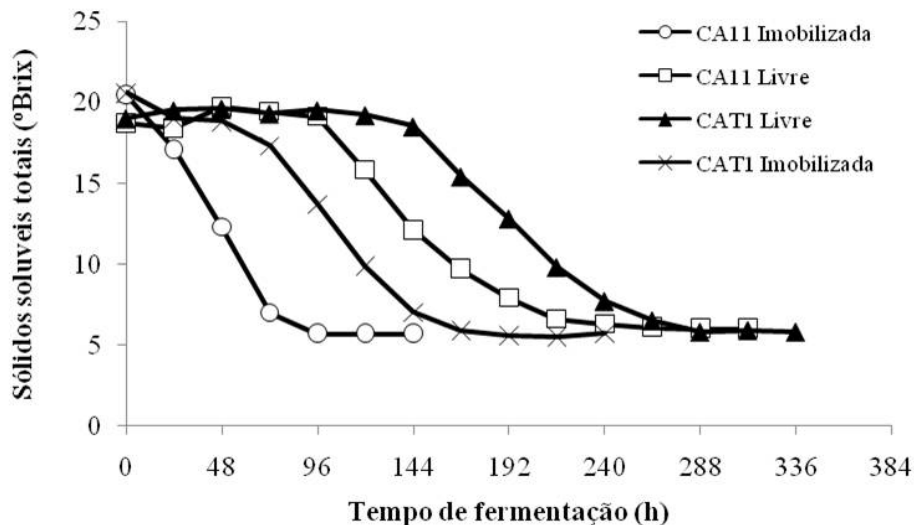


FIGURA 18 Consumo de sólidos solúveis durante os processos fermentativos para a obtenção de bebidas alcoólicas fermentadas de cagaita, empregando-se as leveduras UFLA CA11 e CAT1, nas formas livre e imobilizada.

O menor tempo de fermentação do mosto pelas leveduras imobilizadas nas primeiras horas de fermentação, provavelmente, devem-se à maior concentração celular no início do processo e à facilidade de adaptação ao meio, já que estão mais protegidas das variações de pH, acidez, temperatura e concentração de nutrientes em relação às células livres (Hamdy et al., 1990). Ao contrário, a menor taxa de consumo de substratos nos processos conduzidos com as leveduras livres pode estar relacionada às dificuldades adaptativas destas leveduras às condições nutricionais, de pH, acidez e temperatura sob as quais o processo fermentativo foi conduzido (Lebeau et al., 1998).

Na FIGURA 19 são apresentados os valores da concentração dos principais açúcares (sacarose, glicose e frutose) presentes no mosto de cagaita, durante os processos fermentativos deste experimento.

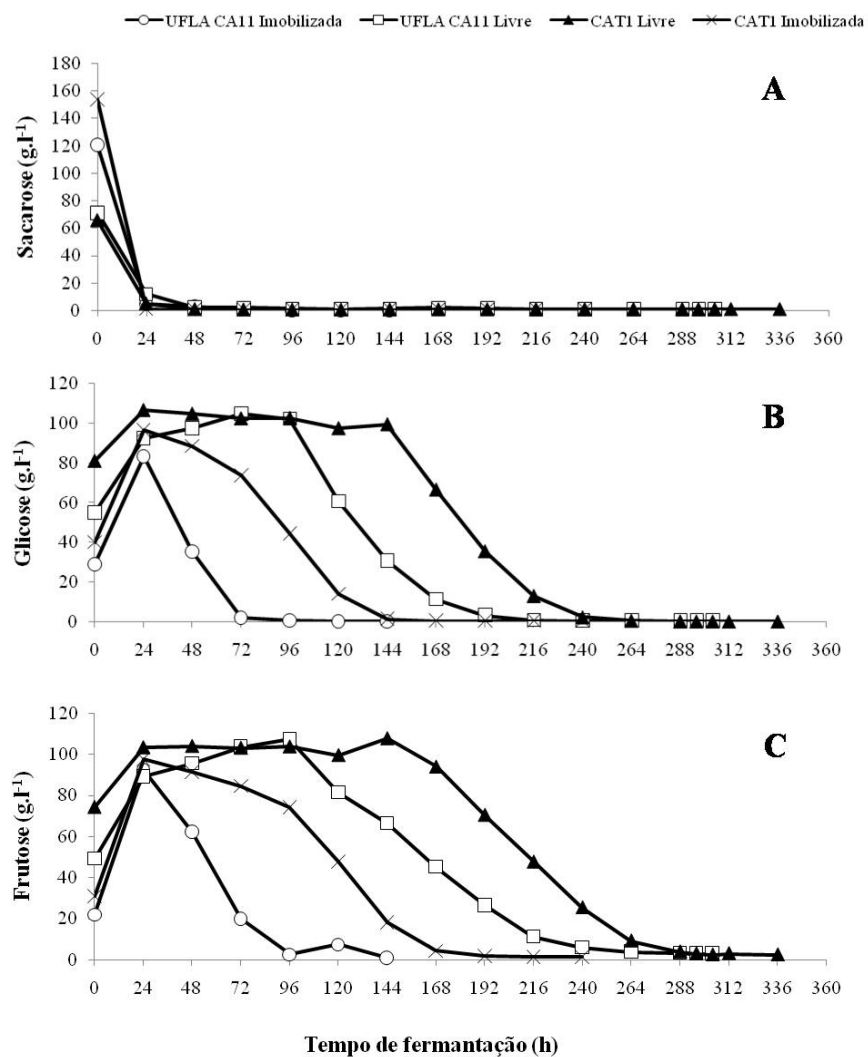


FIGURA 19 Conversão de sacarose (A), glicose (B) e frutose (C), durante os processos fermentativos, para a obtenção de bebidas alcoólicas fermentadas de cagaita, empregando-se as leveduras UFLA CA11 e CAT1, nas formas livre e imobilizada.

Observou-se que os processos fermentativos conduzidos com as leveduras imobilizadas, quando comparados aos processos conduzidos com as leveduras livres, iniciaram o consumo de sacarose, glicose e frutose mais rapidamente (FIGURAS 19A, 19B e 19C).

Os consumos da sacarose nas primeiras 24 horas de fermentação (FIGURA 19A) foram de 99,31% (CAT1 imobilizada), 96,15% (UFLA CA11 imobilizada), 92,31% (CAT1 livre) e 83,34% (UFLA CA11 livre), o que evidencia uma rápida conversão da sacarose em seus monossacarídeos fermentescíveis, glicose e frutose.

Os teores residuais de glicose (FIGURA 19B), no último dia de fermentação dos mostos de cagaita inoculados com as leveduras imobilizadas UFLA CA11 e CAT1 e leveduras livres CA11 e CAT1, foram de 0,08 g.L<sup>-1</sup>, 0,31 g.L<sup>-1</sup>, 0,3 g.L<sup>-1</sup> e 0,14 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Pode-se notar que os valores de glicose ao final da fermentação encontraram-se próximos de zero, indicando elevado consumo do substrato. Entretanto, essa observação não é válida para os teores de frutose nos processos fermentativos analisados. Observou-se que a glicose foi consumida preferencialmente, em relação à frutose. De acordo com os resultados obtidos (FIGURA 19C), verifica-se que os mostos inoculados com as leveduras imobilizadas UFLA CA11 e CAT1 e leveduras livres UFLA CA11 e CAT1 apresentaram valores residuais de frutose de 0,82 g.L<sup>-1</sup>, 1,35 g.L<sup>-1</sup>, 2,90 g.L<sup>-1</sup> e 2,39 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, no último dia de fermentação.

Comparando-se os resultados obtidos para a concentração de etanol (FIGURA 20) produzida durante o processo fermentativo do mosto de cagaita, observa-se que as leveduras imobilizadas converteram mais rapidamente os substratos em etanol.

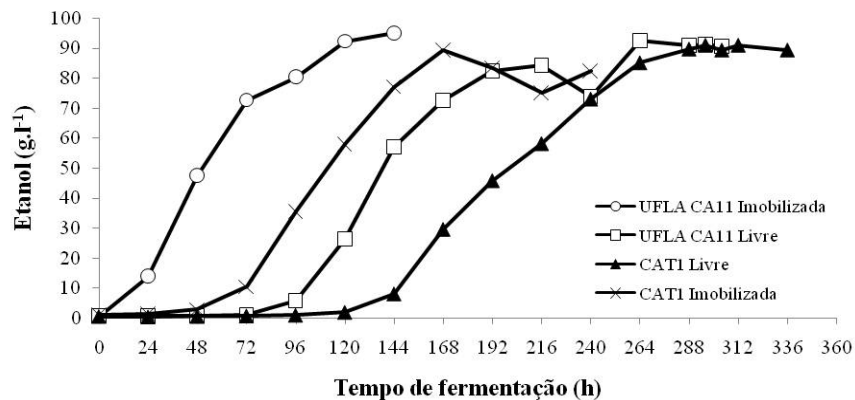


FIGURA 20 Concentração de etanol obtida, durante os processos fermentativos, para a obtenção de bebidas alcoólicas fermentadas de cagaita, empregando-se as leveduras UFLA CA11 e CAT1 nas formas livre e imobilizada.

A menor taxa de consumo de substrato pode estar atrelada às dificuldades adaptativas da levedura ao meio (Lebeau et al., 1998). Segundo Ough (1996), algumas leveduras requerem menos nutrientes e há algumas que fermentam mais rapidamente que outras. A velocidade de fermentação depende do número de células, o qual, por sua vez, é influenciado pelos nutrientes do mosto, da concentração de açúcar e álcool, do pH.

Ward (1991) mencionou que o glicerol é um importante componente presente em quase todas as bebidas alcoólicas. Em vinhos, se encontra em concentrações de até 10 g.L<sup>-1</sup> e conferindo corpo à bebida.

Na FIGURA 21 estão ilustrados os valores de glicerol obtidos durante os processos fermentativos do mosto da cagaita.

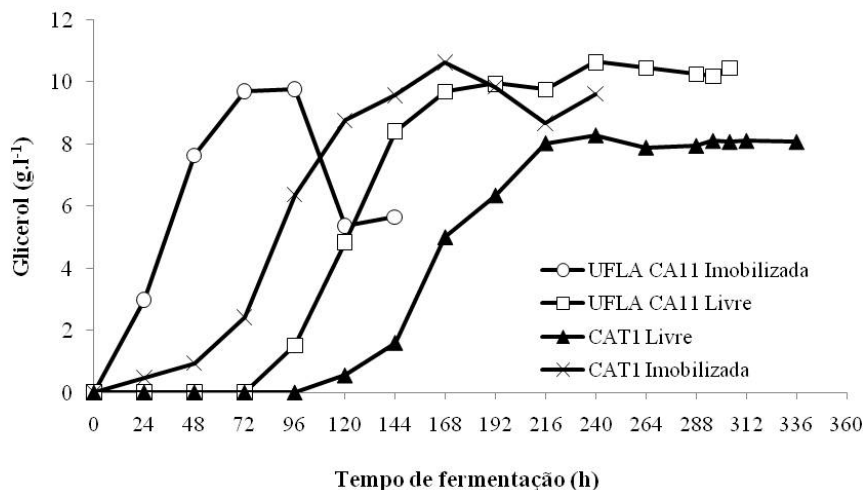


FIGURA 21 Concentração de glicerol obtida, durante os processos fermentativos, para a obtenção de bebidas alcoólicas fermentadas de cagaita, empregando-se as leveduras UFLA CA11 e CAT1, nas formas livre e imobilizada.

Observou-se que, durante a fermentação, houve aumento da concentração de glicerol. As concentrações finais deste composto foram de 5,65, 9,62, 10,46 e 8,06 g.L<sup>-1</sup> para as leveduras UFLA CA11 e CAT1 imobilizadas e UFLA CA11 e CAT1 livres, respectivamente. De acordo com Balli et al. (2003), para cada 100 g de etanol formado são produzidos, aproximadamente, 8 g de glicerol, dependendo da levedura utilizada.

A acidez titulável diferiu entre os processos fermentativos a partir do primeiro dia de fermentação (FIGURA 22). A variação na acidez, durante a fermentação, tem grande influência na estabilidade e na coloração das bebidas fermentadas (Rizzon et al., 1996).

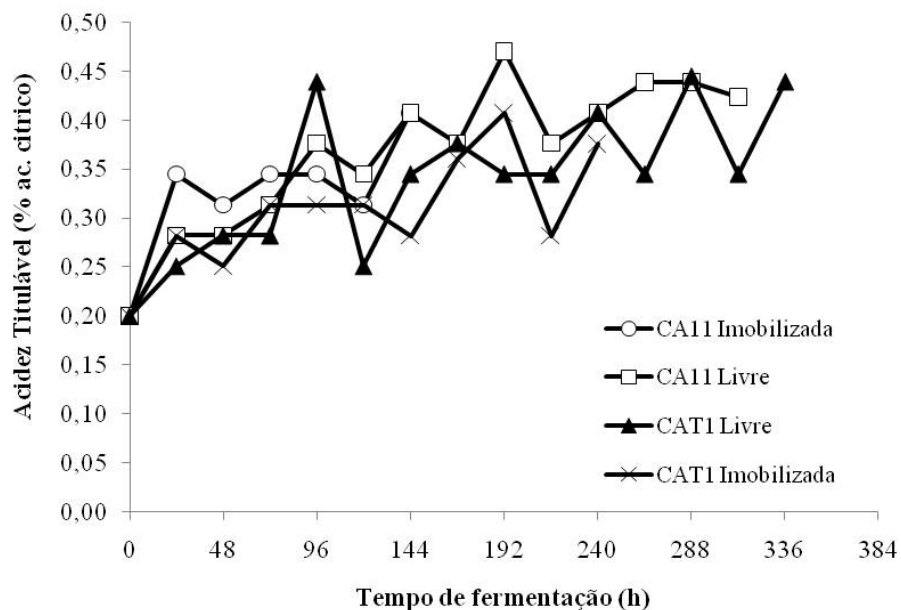


FIGURA 22 Valores de acidez titulável (% ácido cítrico), durante os processos fermentativos, para a obtenção de bebidas alcoólicas fermentadas de cagaita, empregando-se as leveduras UFLA CA11 e CAT1, nas formas livres e imobilizadas.

Em todos os processos, a acidez titulável apresentou aumento ao longo do período de fermentação. O aumento da acidez e, conseqüentemente, a redução no valor de pH ao longo do processo fermentativo são decorrentes da produção de ácidos orgânicos, como ácido láctico, acético e succínico (Borzani et al., 1983). O valor de acidez titulável no início do processo fermentativo era de 0,2 e aumentou para 0,41, 0,38, 0,42 e 0,44 (% ácido cítrico), para as bebidas fermentadas obtidas por meio das fermentações inoculadas com as leveduras imobilizadas UFLA CA11 e CAT1 e com leveduras livres UFLA CA11 e CAT1, respectivamente.



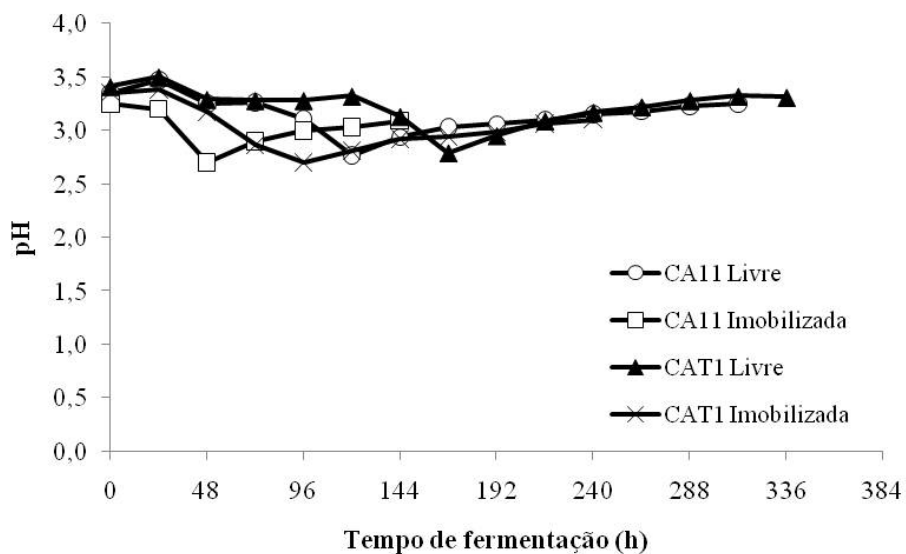


FIGURA 23 Valores de pH, durante os processos fermentativos, para a obtenção de bebidas alcoólicas fermentadas de cagaita, empregando-se as leveduras UFLA CA11 e CAT1, nas formas livres e imobilizadas.

Diferentes valores de pH foram encontrados neste estudo, chegando a 3,13 e de 3,1, para fermentações com leveduras imobilizadas UFLA CA11 e CAT1, respectivamente, e a 3,32 e 3,31, para fermentações com leveduras livres UFLA CA11 e CAT1, respectivamente (FIGURA 23).

De acordo com Araujo et al. (2009), o pH final de bebidas alcoólicas fermentadas situa-se, normalmente, entre 2,0 e 4,0. Valores de pH acima de 4,0 tornam as bebidas sujeitas a alterações microbiológicas e de coloração. Comportamentos semelhantes na acidez e no pH, durante os processos fermentativos de kiwi, pupunha e caju, também foram verificados por Bortolini et al. (2001), Andrade et al. (2003) e Torres Neto et al. (2006), respectivamente.

## **4.4 Análises na bebida**

### **4.4.1 Análises químicas**

É importante a caracterização química da bebida para observar se há concordância entre os limites estabelecidos por lei e a concentração dos analitos na bebida obtida. Por não haver legislação específica para bebida fermentada de cagaita, as legislações para vinho e para fermentados de frutas foram tomadas como parâmetro.

Os parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira e seus limites para a caracterização de vinhos de mesa, fermentados de frutas e a composição físico-química das bebidas fermentadas de cagaita estão mostrados na TABELA 5.

Em relação ao grau alcoólico, pode-se observar que as quatro bebidas obtidas, tanto pela fermentação com leveduras imobilizadas quanto pela fermentação com leveduras livres, obtiveram valores dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente (Brasil, 2009).

As bebidas obtidas pela fermentação com leveduras livres apresentaram valores mais elevados de etanol, comparados aos das bebidas obtidas pela fermentação com leveduras imobilizadas.

TABELA 5 Valores físico-químicos encontrados nas bebidas fermentadas de cagaita, comparados aos valores legais estabelecidos.

	pH	°Brix	Etanol (°GL)	Glicerol (g/L)	Metanol (g/L)	Acidez total (meq/L)	Acidez volátil (meq/L)	Acidez titulável (% ác. cítrico)	Anidrido sulfuroso total (g/L)	Açúcares redutores (g/L)	Açúcares totais (g/L)	Fenólicos solúveis em água (%)	Vit. C (%)
UFLA CA11 Imobilizada	2,95a	5,83ab	11,01a	10,03a	0,0029a	51,78a	5,86a	0,34a	0,012833a	0,001696a	0,002108b	0,054954a	9,64a
UFLA CA11 Livre	3,23b	5,97b	11,99b	10,02a	0,0028a	55,59b	9,01c	0,38b	0,022400b	0,001626b	0,002291c	0,046473ab	9,75a
CAT1 Livre	3,28c	5,77a	12,03b	7,56b	0,0019b	44,93c	7,98b	0,34ab	0,019867b	0,000480c	0,001102a	0,053248ab	8,26b
CAT1 Imobilizada	2,99d	5,70a	11,05a	9,64a	0,0032a	47,78d	8,94c	0,33a	0,019667b	0,000857d	0,002178bc	0,043655b	6,77c
Brasil (1988) – vinho seco	-	-	10 - 13	-	Máx.: 0,35	55 - 130	Máx.: 20	-	Máx.: 0,35	-	Máx.: 5,0	-	-
Brasil (2008, 2009) – fermentado de fruta	-	-	4 - 14	-	-	50 - 130	Máx. 20	Min.: 0,19	-	-	-	-	-

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

Em estudos com fermentados de frutas utilizando células livres, a partir de cajá (Dias et al., 2003), cacau (Dias et al., 2007), seriguela (Muniz et al., 2002), caju (Torres Neto et al., 2006), laranja (Corazza et al., 2001) e abacaxi (Araujo et al., 2009), também foram obtidos resultados, quanto ao teor alcoólico, que se enquadraram dentro da faixa de teor alcoólico determinada pelo MAPA para fermentados de frutas (Brasil, 2009). Os resultados encontrados por estes autores foram de 12,0 °GL, 11,5°GL, 10°GL, 11,5°GL, 10,6°GL e 11,2°GL, respectivamente.

O metanol é um álcool resultante da ação da pectinametilesterase sobre a cadeia de pectinas presente nos frutos. É um componente tóxico, no entanto, o limite permitido pelo MAPA (Brasil, 1988), para vinhos, é de, no máximo, 0,35 g.L<sup>-1</sup>. Os valores obtidos a partir dos fermentados de cagaita encontram-se abaixo do limite estabelecido, pois o máximo observado foi da ordem de 0,0032 g.L<sup>-1</sup> (TABELA 7). Cabaroglu (2005) mencionou que, normalmente, os vinhos contêm metanol. Sabe-se que a formação deste é dependente de alguns fatores, como conteúdo de pectina no fruto, forma de processamento, temperatura e tratamento enzimático.

O glicerol tem importante papel por contribuir no sabor e na “maciez” do vinho. De acordo com Balli et al. (2003), no vinho, a concentração deste composto varia entre 1 e 10 g.L<sup>-1</sup>, sendo dependente da levedura utilizada. Observando-se a concentração de glicerol nas bebidas obtidas pela fermentação do mosto de cagaita (TABELA 7), constatou-se que os valores estão dentro da faixa de concentração citada para vinhos.

As análises de acidez total e volátil são importantes porque nos permitem inferir sobre a qualidade e a sanidade dos vinhos (Ough, 1996). Os resultados de acidez total obtidos para as bebidas apresentaram valores de 51,78 meq.L<sup>-1</sup> (UFLA CA11 imobilizada), 55,59 meq. L<sup>-1</sup> (UFLA CA11 livre), 44,93 meq. L<sup>-1</sup> (CAT1 livre) e 47,78 meq. L<sup>-1</sup> (CAT1 imobilizada) que, com exceção

da bebida originada pela levedura UFLA CA11 livre, estão fora dos limites estabelecidos pela legislação brasileira para vinhos (Brasil, 2008), a qual determina máximo de  $130 \text{ meq L}^{-1}$  e mínimo de  $50 \text{ meq L}^{-1}$  (TABELA 7).

De acordo com Hashizume (2001), o teor de acidez volátil mede o grau de avinagem do vinho e é normal que todo vinho apresente acidez volátil, uma vez que o ácido acético é um produto secundário da fermentação alcoólica. Pelos valores listados na TABELA 7, nota-se que as bebidas fermentadas produzidas a partir do mosto de cagaita apresentaram quantidade de acidez volátil dentro ao estabelecido pela legislação brasileira para vinhos (Brasil, 1988).

Os resultados referentes ao anidrido sulfuroso total estão de acordo com a legislação vigente para vinhos (Brasil, 1988), que recomenda uma quantidade menor que  $0,35 \text{ g.L}^{-1}$ . Todas as amostras apresentaram concentração de anidrido sulfuroso inferior a  $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ . Este resultado também foi verificado por Silva et al. (1999), para diferentes tipos de vinho de uva provenientes do sul de Minas Gerais e para fermentados de jabuticaba de diferentes safras (2002-2006) analisados por Silva et al. (2008).

As concentrações finais dos açúcares totais permitiram classificar todas as bebidas fermentadas de cagaita em secas, de acordo com a legislação vigente para vinhos (Brasil, 1988), uma vez que apresentaram menos de  $5,0 \text{ g.L}^{-1}$  de açúcares totais.

#### **4.4.2 Análise sensorial**

De acordo com os dados da TABELA 6, pode-se observar diferença para o grau de aceitabilidade entre todas as bebidas fermentadas de cagaita, para os parâmetros cor, limpidez e aspecto geral.

Para os parâmetros aroma e sabor, houve menor variação nas respostas dos provadores. De acordo com Nurgel et al. (2002), compostos específicos

presentes em vinhos são responsáveis pelas características típicas de aroma e sabor. A principal origem desses compostos é o metabolismo das leveduras durante a fermentação; entretanto, alguns compostos nos vinhos se originam das frutas utilizadas como substrato.

As similaridades, para os parâmetros sabor e aroma, observadas na análise sensorial das quatro bebidas fermentadas de cagaita estudadas mostraram que esses parâmetros foram influenciados, provavelmente, pelos compostos presentes na cagaita e não pela linhagem de levedura e nem a utilização de células livres e imobilizadas.

TABELA 6 Resultado da análise sensorial das bebidas fermentadas de cagaita realizada com 50 provadores, expresso em valores médios das notas para cada parâmetro sensorial avaliado.

	<b>Cor</b>	<b>Limpidez</b>	<b>Aroma</b>	<b>Sabor</b>	<b>Aspecto geral</b>
UFLA CA11 Imobilizada	7,42	7,66	7,44	6,40	7,18
UFLA CA11 Livre	7,74	7,52	7,02	6,40	7,06
CAT1Livre	7,74	7,58	6,98	6,12	6,96
CAT1 Imobilizada	6,90	6,42	6,98	6,10	6,62

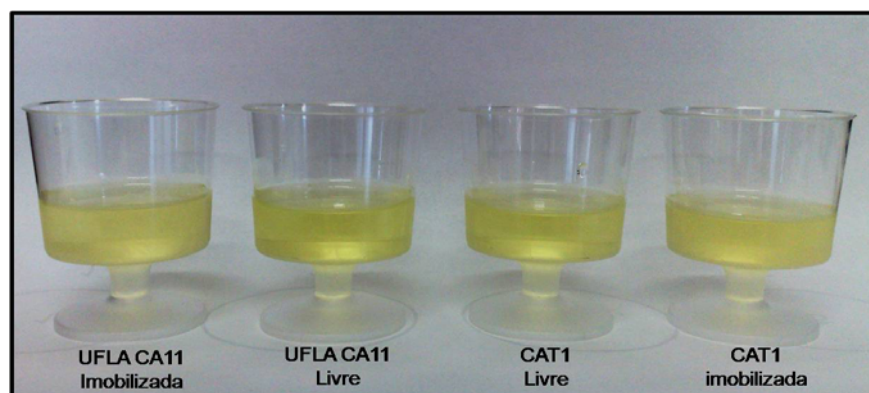


FIGURA 24 Aspecto final das bebidas alcoólicas fermentadas de cagaita, provenientes dos processos conduzidos com as leveduras UFLA CA11 e CAT1, nas formas livres e imobilizadas. (Foto: Mara Elisa Soares de Oliveira)

Nos parâmetros cor e limpidez, a bebida produzida pela levedura CAT1 imobilizada apresentou a menor nota. A diferença desses parâmetros nas bebidas pode ser observada também na FIGURA 24, em que as bebida produzida pela levedura CAT1 imobilizada apresenta-se menos límpida.

Considerando os aspectos gerais, as bebidas elaboradas empregando-se UFLA CA11 apresentaram maiores notas que as bebidas elaboradas com a linhagem CAT1.

No gráfico da FIGURA 25 observam-se os percentuais de aceitação e de não aceitação das bebidas, em função das notas atribuídas pelos provadores. Pode-se observar que o percentual de aceitação foi maior que 70%, para todos os parâmetros avaliados. Para os aspectos cor, limpidez e aroma, as bebidas produzidas pelos processos fermentativos com as leveduras UFLA CA11 imobilizada, UFLA CA11 livre e CAT1 imobilizada apresentaram percentual de aceitação entre 90% e 100%; já a bebida obtida pelo processo fermentativo com a levedura CAT 1 imobilizada apresentou menor percentual, entre 70% a 90%,

de aceitação. O aspecto sabor foi o que apresentou o menor percentual de aceitabilidade para todas as bebidas, entre 70% e 85%. Neste mesmo atributo, em média 17% dos provadores desgostam das bebidas fermentadas de cagaita. Com relação ao aspecto geral, as bebidas fermentadas de cagaita obtidas neste estudo tiveram percentual de aceitabilidade entre 80% e 100%.

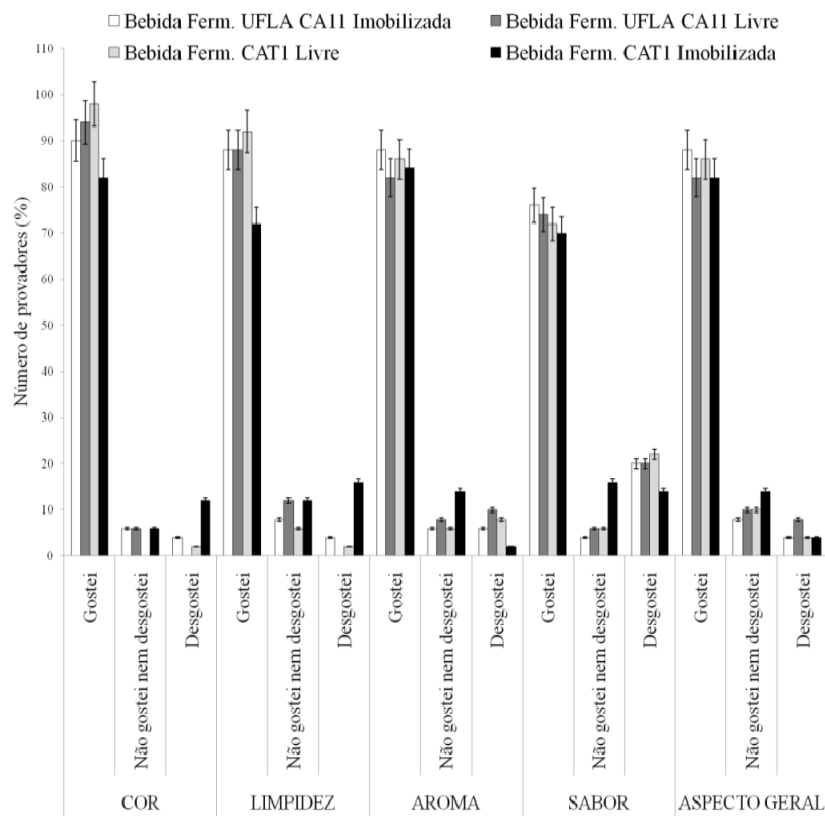


FIGURA 25 Percentual de aceitação (6-9) e recusa (1-4) das bebidas alcoólicas fermentadas de cagaita provenientes dos processos conduzidos com as leveduras UFLACA11 e CAT1, nas formas livres e imobilizadas, conforme análise de escala hedônica de 9 pontos, respondida por 50 provadores não treinados.



Estudando o uso de frutas tropicais na produção de bebidas fermentadas, Muniz et al. (2002) utilizaram mosto de ata, mangaba e seriguela corrigido a 16° Brix e inoculado com levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* var *bayanus*. Os resultados da análise sensorial demonstraram que a bebida de mangaba se destacou nos atributos aceitação global e intenção de compra. Avaliando o uso da banana para produção de vinho, Akubor et al. (2003) constataram que, na avaliação sensorial, o vinho de banana foi semelhante a um vinho de uva, para os atributos aparência, sabor e aceitação global.

Dias et al. (2003, 2007) encontraram boa aceitação, verificada na análise sensorial, para as bebidas fermentadas de cajá e cacau e concluíram que o uso da polpa de cajá e cacau na produção de vinho é uma nova e viável alternativa para utilização desses frutos.

## 5 CONCLUSÕES

Foi possível adaptar técnicas normalmente empregadas na elaboração de vinho para desenvolver a metodologia empregada neste trabalho para a obtenção de bebida fermentada de cagaita, utilizando células de leveduras livres e imobilizadas.

As duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA11 e CAT1, testadas neste trabalho, mostraram-se capazes de fermentar o mosto de cagaita.

A levedura UFLA CA11 realizou o processo fermentativo em menor tempo que a CAT1.

Os processos fermentativos com as leveduras imobilizadas apresentaram melhor desempenho, considerando-se o rápido consumo dos açúcares no mosto e por finalizarem a fermentação em menor tempo, em relação aos processos com leveduras livres.

A análise sensorial revelou boa aceitação de todas as bebidas obtidas, indicando que essa tecnologia pode ser uma alternativa para o aproveitamento e a transformação dos frutos de cagaita naturalmente produzidos no cerrado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKUBOR, P. I.; OBIO, S. O.; NWADOMERE, K. A.; OBIOMAH, E. Production and quality evaluation of banana wine. **Plant Foods for Human Nutrition**, The Hague, v. 58, n. 3, p. 1-6, Sept. 2003.
- ALMEIDA, S. P. de. **Cerrado: aproveitamento alimentar**. Planaltina: Embrapa/CPAC, 1998. 188 p.
- ALMEIDA, S. P. de; SILVA, J. A. da; RIBEIRO, J. F. **Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos Cerrados: araticum, baru, cagaita e jatobá**. Planaltina: Embrapa/CPAC, 1987. 83 p.
- ANDRADE, J. S.; PANTOJA, L.; MAEDA, R. N. Melhoria do rendimento do processo de obtenção de bebida alcoólica de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 34-38, jan./abr. 2003.
- ARAUJO, K. G. L.; SABAA-SRUR, A. U. O.; RODRIGUES, F. S.; MANHÃES, I. R. T.; CANTO, M. W. do. Utilização de abacaxi (*Ananas comosus* L.) cv. Pérola e Smooth cayenne para a produção de vinhos-estudo da composição química e aceitabilidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 56-61, jan./mar. 2009.
- ARCURI, E. J.; NICHOLS, J. R.; BRIX, T. S.; SANTAMARINA, V. G.; BUCKLAND, B. C.; DREW, S. W. Thienamycin production by immobilized cells of *Streptomyces catly* in bubble column, **Biotechnology & Bioengineering**, New York, v. 25, n. 10, p. 2399-2411, Oct. 1983.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 17. ed. Washington, 2000. 1410 p.
- BALLI, D.; FLARI, V.; SAKELLARAKI, E.; SCHOINA, V.; ICONOMOPOULOU, M.; BEKATOROU, A.; KANELLAKI, M. Effect of yeasts cell immobilization and temperature on glycerol content in alcoholic fermentation with respect to wine making. **Process Biochemistry**, London, v. 39, n. 4, p. 499-506, Dec. 2003.

BEKERS, M.; LAUKEVICS, J.; KARSAKEVICH, A.; VENTINA, E.; KAMINSKA, E.; UPITE, D.; VINA, I.; LINDE, R.; SCHERBAKA, R. Levantethanol biosynthesis using *Zymomonas mobilis* cells immobilized by attachment and entrapment. **Process Biochemistry**, London, v. 36, n. 10, p. 979-986, Apr. 2001.

BITTER, T.; MUIR, H. M. A modified uronic acid carbazole reaction. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 4, n. 4, p. 330-334, Oct. 1962.

BORENSTEIN, I. M. **Uso de alumina como suporte para imobilização de leveduras**. 2003. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

BORTOLINI, F.; SANT'ANA, E. S.; TORRES, R. C. Comportamento das fermentações alcoólicas e acéticas de sucos de kiwi (*Actinidia deliciosa*): composição dos mostos e métodos de fermentação acética. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 236-243, maio/ago. 2001.

BORZANI, W.; AQUARONI, E.; LIMA, U. A. **Engenharia bioquímica**. São Paulo: E. Blücher, 1983. v. 3, 285 p.

BOSSOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron microscopy**. 2. ed. Boston: Jones and Bartlett, 1998. 670 p.

BOUCQUEY, J. B.; RENARD, P.; AMERLYNCK, P.; MODESTO FILHO, P.; AGATHOS, S. N.; NAVEAU, H.; NYNS, E. J. High-rate continuous biodegradation of concentrated chlorinated aliphatics by a durable enrichment of methanogenic origin under carrier-dependent conditions. **Biotechnology & Bioengineering**, New York, v. 47, n. 3, p. 298-307, Aug. 1995.

BRASIL. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**, Brasília, 4 jun. 2009. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 20 jan. 2010.

BRASIL. Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988. Dispõe sobre a produção, circulação, comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho. **Diário Oficial da União**, Brasília, 8 nov. 1988. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 20 jan. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Metodologia de análise de bebidas e vinagre**. Brasília: Imprensa Nacional, 1985. 67 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Portaria n. 64, de 23 de abril de 2008. Aprovam os regulamentos técnicos para a fixação dos padrões de identidade e qualidade para as bebidas alcoólicas fermentadas: fermentado de fruta, sidra, hidromel. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 abr. 2008. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 20 jan. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Portaria n. 229, de 25 de outubro de 1988. Aprova as normas referentes a complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho. **Diário Oficial da União**, Brasília, 25 out. 1988. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 20 abr. 2010.

BRITO, M. A. de; PEREIRA, E. B. C.; PEREIRA, A. V.; RIBEIRO, J. F. **Cagaita**: biologia e manejo. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. 79 p.

BRODELIUS, P.; VANDAMME, E. J. Immobilized cell systems. In: REHM, H. J., REED, G. (Ed.). **Biotechnology**: a comprehensive treatise. Weinheim: Verlage Chemie, 1987. v. 7, p. 405-464.

BUESCHER, R. W.; FURMANSKI, R. J. Role of pectinase and polygalacturonase in the formation of woolliness un peaches. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 43, n. 1, p. 264-266, Jan. 1978.

CABAROGLU, T. Methanol contents of Turkish varietal wines and effects of processing. **Food Control**, Guildford, v. 16, n. 1, p. 177-181, Jan. 2005.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D. A.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 1, jan./fev. 2003.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Revista Analytica**, São Paulo, v. 5, n. 23, p. 60-70, nov./dez. 2006.

CATALUÑA, E. **As uvas e os vinhos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Globo, 1988. 207p.

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, A. L. M. **Influência de diferentes cepas de leveduras e mostos na formação dos compostos voláteis majoritários em vinho de caju (*Anacardium occidentale*, L.)**. 1996. 94 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; FREIRE, E. S.; SERÔDIO, R. S. Elaboration of a fruit wine cocoa (*Thebroma cacao* L.) pulp. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 319-329, Mar. 2007.

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.

DONG, S.; CHEN, X. Some new aspects in biosensors. **Reviews in Molecular Biotechnology**, Oxford, v. 82, n. 4, p. 303-323, Feb. 2002.

DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; PEREIRA, G. V. M.; GERVÁSIO, I. M.; SCHWAN, R. F. Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabioba (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 36, n. 4, p. 557-569, Apr. 2009.

DURAN, P. M.; BAILEY, J. E. Effects of immobilization on growth, fermentation properties and macromolecular compositions of *Saccharomyces cerevisiae* attached to gelatin. **Biotechnology & Bioengineering**, New York, v. 28, n. 1, p. 73-87, Jan. 1986.

EITEN, G. Vegetação do cerrado. In: PINTO, M. N. **Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas**. 2. ed. Brasília: UNB, 1994. p. 9-65.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sorvete de cagaita e pão de jatobá**. Planaltina: Embrapa/CPAC, 1985.

FARIAS NETO, A. L. de; FONSECA, C. E. L. da; GOMIDE, C. C. C.; SILVA, J. A. Armazenamento de sementes de Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 13, n. 2, p. 55-62, ago. 1991.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 235.

FERREIRA, M. B. Plantas portadoras de substâncias medicamentosas, de uso popular, nos cerrados de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 6, n. 61, p. 19-23, jan. 1980.

FRAZIER, W. C.; ESTHOFF, D. C. Microorganisms Important in food microbiology. In: FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. **Food Microbiology**. 5. ed. Singapore: McGraw-Hill, 1988. p. 32-39.

FUKUI, S.; TANAKA, A. Immobilized microbial cells. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 36, p. 145-72, Oct. 1982.

GERBSCH, N.; BOCHHOLZ, R. New processes and actual trends in biotechnology. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 16, n. 2/3, p. 259-269, Feb. 1995.

GOEDERT, W. J. **Solos dos cerrados: tecnologias e estratégias de manejo**. Brasília: Embrapa, 1986. 422 p.

GRYTA, M. The assessment of microorganism growth in the membrane distillation system. **Desalination**, Amsterdam, v. 142, n. 1, p. 79-88, Jan. 2002.

HAMDY, M. K.; KIM, K.; RUDTKE, C. A. Continuous ethanol production by yeast immobilized onto channeled alumina beads. **Biomass**, London, v. 21, n. 1, p. 189-206, Mar. 1990.

HAMMOND, J. R. M. Genetically-modified brewing yeast for the 21 st century: Progress to date. **Yeast**, Chichester, v. 11, n. 16, p. 1613-1627, 1995.

HASHIZUME, K.; SAMUTA, T. Green odorants of grape cluster stem and their ability to cause a wine stemmy flavor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 4, p. 1333-1337, Apr. 1997.

HASHIZUME, T. Tecnologia do vinho. In: BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U. A. **Biotecnologia industrial biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: E.Blücher, 2001. v. 4, p. 21-48.

HULTIN, H. O.; SUN, B.; BULGER, J. Pectin methyl esterase of the banana: purification and properties. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 31, n. 3, p. 320-327, Mar. 1966.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. São Paulo: IMESP, 2005. v. 1, 371 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapa de biomas e de vegetação**. São Paulo, 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 20 jan. 2010.

JACK, T. K.; ZAJIC, J. E. The immobilization of whole cells. **Advances in Biochemical Engineering**, New York, v. 5, p. 125-43, Jan. 1977.

JIN, Y. L.; SPEERS, R. A. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Research International**, Barking, v. 31, n. 6/7, p. 421-440, Aug. 1998.

KAREL, S. F.; LIBICKI, S. B.; ROBERTSON, C. R. The immobilization of whole cells: Engineering principles. **Chemical Engineering Science**, New York, v. 40, n. 8, p. 1321-1354, 1985.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D. M. Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis**, Amsterdam, v. 10, n. 1/3, p. 157- 176, Oct. 2000.

KOLB, E. **Vinos de frutas**. Zaragoza: Acribia, 2002. 280 p.

KUBAL, B. S.; D'SOUZA, S. F. Immobilization of catalase by entrapment of permeabilized yeast cells in hen egg white using glutaraldehyde. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, Amsterdam, v. 59, n. 1, p. 61-64, Apr. 2004.

LALUCE, C.; PALMIERI, M. C.; CRUZ, R. C. L. Growth and fermentation characteristics of new selected strains of *Saccharomyces* at high temperatures and high cell densities. **Biotechnology & Bioengineering**, New York, v. 37, n. 6, p. 528-536, Mar. 1991.

LEBEAU, T.; JOUENNE, T.; JUNTER, G. A. Diffusion of sugar and alcohols through composite membrane structures immobilizing viable yeast cells. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 22, n. 6, p. 434-438, May 1998.

LEE, T. H.; AHN, J. C.; RYU, D. Y. Performance of an immobilized yeast reactor system for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 5, n. 1, p. 41-45, Jan. 1983.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípio de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995, 839 p.



- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.  
**Biotecnologia Industrial:** processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgard Bucher, 2001. v. 3, p. 67-71.
- LURTON, L.; SNAKKERS, G.; ROULLAND, C.; GALY, B. Influence of the fermentation yeast strains on the composition of wine spirits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Great Britain, v. 67, n. 4, p. 485-491, Apr. 1995.
- MACEDO, L. C. H. **Álcool etílico**. São Paulo: ICONI, 1993. 157 p.
- MARGARITIS, A.; MERCHANT, F. J. A. Advances in ethanol production using immobilized cell systems. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 2, n. 4, p. 339-393, 1984.
- MARKOVIC, O.; HEINRICHOVÁ, K.; LENKEY, B. Pectolytic enzymes from banana. **Collection Czechoslovak Chemistry Community**, London, v. 40, n. 3, p. 769-774, 1975.
- MARQUES, D. M.; PASTORE, G. M. Produção de aromas naturais por microrganismos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 33, n. 1, p. 80-85, 1999.
- MARTINELLI FILHO, A. **Tecnologia de vinhos e vinagres de frutas**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1983. 130 p.
- MCCREADY, P. M.; MCCOLOMB, E. A. Extraction and determination of total pectic material. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 24, n. 12, p. 1586, Dec. 1952.
- MENEZES, T. J. B. Os fungos na indústria. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 116-120, 1997.
- MORAES, M. **Métodos para avaliação sensorial dos alimentos**. 8. ed. Campinas: Unicamp, 1993. 93 p.
- MUNIZ, C. R.; BORGES, M. F.; ABREU, F. A. P.; NASSU, R. T.; FREITAS, C. A. S. Bebidas fermentadas a partir de frutos tropicais. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Paraná, v. 20, n. 2, p. 309- 322, 2002.

NAVARRO, A. C.; DURAND, G. Modification of yeast metabolism by immobilization onto porous glass. **European Journal of Applied Microbiology**, New York, v. 4, n. 2, p. 243-254, Feb. 1977.

NAVES, R. V. **Espécies frutíferas nativas dos cerrados de Goiás:** características e influências do clima e dos solos. 1999. 206 p. Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

NAVES, R. V.; ALMEIDA NETO, J. X.; ROCHA, M. R.; BORGES, J. D.; CARVALHO, G. C.; CHAVES, L. J.; SILVA, A. Determinação de características físicas em frutos e teor de nutrientes em folhas e no solo, de três espécies frutíferas de Ocorrência Natural nos Cerrados de Goiás. **Anais Escola de Agronomia e Veterinária**, Goiânia, v. 25, n. 2, p. 107-114, 1995.

NIMER, E. **Climatologia do Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE, 1989. 422 p.

NORTON, S.; D'MORE, T. Physiological effects of yeast cell immobilization: Applications for brewing. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 16, n. 5, p. 365-375, May 1994.

NURGEL, C.; ERTEN, H.; CANBAS, A.; CABAROGLU, T.; SELLI, S. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* strain on fermentation and flavour compounds of white wines made cv. Emir grown in Central Anatolia, Turkey. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 29, n. 2, p. 28-33, Apr. 2002.

OGAWA, Y.; NITTA, A.; UCHIYAMA, H.; IMAMURA, T.; SHIMOI, H.; ITO, K. Tolerance mechanism of the ethanol-tolerant mutant of sake yeast. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 90, n. 3, p. 313-320, Mar. 2000.

OLGA, F. M.; FONCECA, C. E. L. de. Um método rápido para estimar área foliar em mudas de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* D. C.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 571-577, abr. 1994.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. P.; LEANDRO, W. M.; OLIVEIRA, G. C. de; NAVES, R. V.; VILELA, E. F.; MENDONÇA, R. S.; M. da G.; REIS, A. J. S. Caracterização química do solo, de folhas e frutos de cagaita (*Eugenia dysenterica*) no sudeste de Goiás. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS DO SOLO, 26., 1997, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: SBSCS, 1997. p. 20-21.

OUGH, C. S. **Tratado básico de enología**. Zaragoza: Acribia, 1996. 294 p.

ÖZTOP, H. N.; ÖZTOP, A. Y.; KARADAĞ, E.; IŞIKVER, Y.; SARAYDIN, D. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* on to acrylamide-sodium acrylate hydrogels for production of ethyl alcohol. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 1, p. 114-119, Jan. 2003.

PACHECO, M. T. B.; SGARBIERI, V. C. Diferentes métodos de concentração de proteína de levedura e suas implicações nas propriedades funcionais. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 36, n. 2, p. 83-94, 2002.

PANTOJA, L.; MAEDA, R. N.; CARVALHO, S. M. S.; AGUIAR, J. P. L.; MONTEIRO, F. M.; LIMA, Q. A.; MENDONÇA JÚNIOR, F. G.; YUYAMA, L. K. O.; PEREIRA JÚNIOR, N. Aprovechamiento biotecnológico de la guanabana en la elaboración de bebidas alcohólicas fermentadas utilizando levadura inmovilizada en alginato de cálcio. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, p. 96-102, mar. 2005. Disponível em: <[http://www.ital.sp.gov.br/bj/bj\\_old/brazilianjournal/ed\\_especial/17.pdf](http://www.ital.sp.gov.br/bj/bj_old/brazilianjournal/ed_especial/17.pdf)>. Acesso em: 17 dez. 2010.

PARK, J. K.; CHANG, H. N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 4, p. 303-319, July 2000.

PARK, T. G.; HOFFMAN, A. S. Immobilization of *Arthrobacter simplex* in athermally reversible hydrogel: effect of temperature cycling on steroid conversion. **Biotechnology & Bioengineering**, New York, v. 35, n. 2, p. 152-159, Jan. 1990.

PEREIRA JÚNIOR, N. Bioprocessos industriais. In: PEREIRA JÚNIOR, N.; BON, E. P. S. **Tecnologia Enzimática**. Rio de Janeiro: ENZITEC, 1999. p. 24-46.

PILKINGTON, P. H.; MARGARITIS, A.; MENSOUR, N. A. Mass transfer characteristics of immobilized cells used in fermentation processes. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 18, n. 1, p. 237-255, Mar. 1998.

PROENÇA, C. E. B.; GIBBS, P. E. Reproductive biology of eight sympatric myrtaceae from central Brazil. **New Phytologist**, Cambridge, v. 126, n. 2, p. 343-354, Feb. 1994.

- RAMA-KRISHNA, S. V.; PRAKASHAM, R. S. Microbial fermentations with immobilized cells. **Current Science**, Bangalore, v. 77, n. 1, p. 87-100, July 1999.
- RATNER, A.; GOREN, R.; MONSELINE, S. P. Activity of pectin esterase and cellulase in the abscission zone of citrus leaf explants. **Plant Physiology**, Washington, v. 44, n. 12, p. 1717-1723, Dec. 1969.
- RATTER, F. A.; BRIDGWATER, S.; RIBEIRO, J. F.; DIAS, T. A. B.; SILVA, M. R. Distribuição das espécies lenhosas da fitofisionomia cerrado sentido restrito nos estados compreendidos pelo bioma Cerrado. **Boletim do Herbário Ezechias Paulo Heringer**, Brasília, v. 5, p. 5-43, jul. 2000.
- REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R.; CORRÊA, J. C. B. Determinação espectrofotométrica de taninos pelo relativo fosfotúgstico fosfomolibdico. **Arquivo de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 24, n. 4, p. 401-411, abr. 1981.
- RIBEIRO, C. A. F.; HORII, J. Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 56, n. 2, p. 255-263, ago. 1999.
- RIBEIRO, J. F.; PROENÇA, C. E. B.; ALMEIDA, S. P. Potencial frutífero de algumas espécies frutíferas nativas dos cerrados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 8., 1986, Brasília. **Anais...** Brasília: Embrapa, 1986. p. 491-500.
- RIZZINI, C. T. Aspectos ecológicos da regeneração em algumas plantas do Cerrado. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO, 3., 1971, São Paulo. **Anais...** São Paulo: E. Blucher, 1971. p. 61-64.
- RIZZINI, C. T. Efeito tegumentar na germinação de *Eugenia dysenterica* DC. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 3, p. 381-402, Mar. 1970.
- RIZZON, L. A.; ZANUS, M. C.; MANFREDINI, S. **Como elaborar vinho de qualidade na pequena propriedade**. Bento Gonçalves: Embrapa/CNPUV, 1996. 36 p. (Documentos, 12).
- RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. **Plantas Medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: UFLA, 2001. 180 p.

ROEHR, M. Products of primary metabolism. In: REED, G. **Biotechnology**. New York: VCH, 1996. v. 6, p. 123-168.

ROSS, R. P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 79, n. 1/2, p. 3-16, Nov. 2002.

SANCHES-PERES, M. F.; SOUSA, S. R.; LALUCE, C. Obtaining strains of *Saccharomyces* tolerant to high temperatures and ethanol. **Methods in Biotechnology**, Araraquara, v. 14, p. 355-367, Dec. 2000.

SANDHU, D. K.; JOSHI, V. K. Technology, quality and scope of fruit wines especially apple beverages. **Indian Food Industry**, New Delhi, v. 14, n. 1, p. 24-34, Jan. 1995.

SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa/CPAC, 1997. 556 p.

SANTOS, R. dos; SCHENDERG, M. G. G. A. C. G.; ASTOLFI-FILHO, S.; VICENTE, E. J.; FARIA, J. B.; CAMARGO, S. S.; MORAES, L. P.; GUEDES, L.S.; SHIMIDELL, W.; FACCIOTTE, M. C. R. **Yeast biotechnology**. São Paulo: Intercept, 1997. p. 571-575.

SCOTT, C. Immobilized cells: a review of recent literature. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 9, n. 1, p. 66-73, Jan. 1987.

SILVA, J. A. da; SILVA, D. B.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. M. **Coleta de sementes, produção de mudas e plantio de espécies frutíferas nativas dos cerrados: informações exploratórias**. 2. ed. Planaltina: Embrapa, 1997. 24 p.

SILVA, P. H. da; FARIA, F. C. de; TONON, B.; MOTA, S. J. D.; PINTO, V. T. Avaliação da composição química de fermentados alcoólicos de jabuticaba (*myrciaria jabuticaba*). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 595-600, 2008.

SILVA, R. S. M. **Caracterização de sub-populações de cagaita (*Eugenia dysenterica*) da região sudeste do estado de Goiás, Brasil**. Goiânia: UFG, 1999. 107 p.

SILVA, T. G.; REGINA, M. A.; ROSIER, J. P.; RIZZON, L. A.; CHALFUN, N. N. J. Diagnóstico vinícola do sul de minas gerais II: teores de minerais dos vinhos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 638-642, mar. 1999.

SLUIS, C. van der; STOFFELEN, C. J.; CASTELEIN, S. J.; ENGBERS, G. H.; TER SCHURE, E. G.; TRAMPER, J.; WIJFFELS, R. H. Immobilized salt-tolerant yeasts: application of a new polyethylene-oxide support in a continuous stirred-tank reactor for flavour production. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 88, n. 2, p. 129-139, June 2001.

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

TORRES NETO, A. B. T.; SILVA, M. E.; SILVA, W. B.; SWARNAKAR, R.; SILVA, F. L. H. Cinética e caracterização físico-química do fermentado do pseudofruto do caju (*Anacardium occidentale* L.). **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 489-492, maio/jun. 2006.

VOGT, E.; JAKOB, L. **El vino**: obtención, elaboración y análisis. Zaragoza: Acribia, 1986. 292 p.

WARD, O. P. **Biología de la fermentación**: principios, procesos y productos. Zaragoza: Acribia, 1991. 155 p.

WILLIAMS, D.; MUNNECKE, D. M. The production of ethanol by immobilized yeast cells. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 23, n. 8, p. 1813-1825, Dec. 1981.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochem Journal**, London, v. 56, n. 3, p. 508-514, Feb. 1954.