



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

ELABORAÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA A PARTIR DE FRUTAS TROPICAIS

DISNEY RIBEIRO DIAS

2001

52096

NF 36642

DISNEY RIBEIRO DIAS

**ELABORAÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA A PARTIR DE FRUTAS
TROPICAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do Curso de Pós graduação em
Ciência dos Alimentos, área de concentração em
Microbiologia de Alimentos, para obtenção do título de
"Mestre".

Orientador

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

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

Dias, Disney Ribeiro

Elaboração de bebida fermentada a partir de frutas tropicais / Disney
Ribeiro Dias. -- Lavras : UFLA, 2001.

130 p. : il.

Orientadora: Rosane Freitas Schwan.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Fruticultura tropical. 2. Fermentação alcoólica. 3. Bebida fermentada. 4.
Cacau. 5. Cajá. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-663.13
-663.5

DISNEY RIBEIRO DIAS

**ELABORAÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA A PARTIR DE FRUTAS
TROPICAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Pós graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Microbiologia de Alimentos, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 08 de maio de 2001

Prof. Dr. Luiz Carlos Oliveira Lima -

UFLA

Prof. Dr. Valter Roberto Linardi -

UFMG



Prof. Dra. Rosane Freitas Schwan

UFLA

(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

À Sra. Enice Ribeiro Dias e ao Sr. João Dias de Lera, meus pais,
ao amigo Waldo Miranda Horta e família,
às professoras e amigas Dra. Vânia Déa de Carvalho e Dra. Rosane Freitas
Schwan e
ao amigo João Marcos de Pádua e família,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A gratidão é um sentimento nobre transmitido às pessoas por quem temos um carinho sincero. E é com esse sentimento que me lembre algumas pessoas com quem pude trocar conhecimento, sempre recebendo mais do que minha intenção de doar.

A Deus, pela nossa existência.

Àqueles a quem dediquei este trabalho, reforço meu carinho e eterno agradecimento por terem, de alguma forma, confiado em mim e me incentivado.

À Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan pela atenção, paciência, amizade e pela orientação neste trabalho.

À Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho pela alegria compartilhada e pela co-orientação neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Oliveira Lima, colega farmacêutico e co-orientador, pela educação e presteza quando requeri alguma ajuda.

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

A todo o corpo docente e aos funcionários do Departamento de Ciência dos Alimentos e do Departamento de Biologia.

Ao CNPq pelo período de bolsa a mim concedido.

Ao químico Akson de Lima (Fazenda Experimental da EPAMIG – Caldas, MG) pelo auxílio nas análises laboratoriais.

Aos amigos Newton Moreno Sanches, Prof. Eustáquio Souza Dias, Cidinha, Mírian, Cristina e Luís, pelo agradável convívio.

Aos companheiros de trabalho do Centro de Pesquisas da Fundação Educacional de Lavras, Vilmar, Ademir, Rogéria e João Argenta.

Aos alunos da Fundação Educacional de Lavras.

Aos companheiros do DCA, Sílvio, Alberto, Beto, Eduardo, Elayne, Renata, Marlúcia, Hessel.

Aos amigos Nelson, Bruno, Marcelo, José Carlos, Leonardo, Leandro, Júlio e Tiago.

À Sra. Luzia Dias de Oliveira, pelo carinho dado desde minha infância até os dias de hoje.

Aos amigos Roberto, Diogo, Fabio, Mônica, Livia, Damarys, Daniel Guarda, Daniel Pádua, Daniel Ribeiro, Rafael Ribeiro, Roni, Marcelo, Luís Alberto, Lucas, Doquinha e Cambão.

Aos professores da Escola Estadual Dr. Farid Silva, Pratápolis-MG; do Colégio e Curso Objetivo, Passos-MG; do Colégio e Curso Oswaldo Cruz, Ribeirão Preto-SP; da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, Alfenas-MG, pelo embasamento que torna sustentável o caminhar de seus alunos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	iii
CAPÍTULO 1: Aspectos gerais da fruticultura tropical, enotecnologia e biotecnologia de fermentações.....	1
1 Introdução Geral.....	2
2 Referencial Teórico	5
2.1 Fruticultura Tropical.....	5
2.1.1 Evolução do mercado frutícola brasileiro	5
2.1.2 Importância comercial de algumas frutas cultivadas no Brasil	7
2.1.3 Aspectos nutricionais e aproveitamento das frutas.....	9
2.2 Bebidas alcoólicas obtidas por fermentação	11
2.2.1 Microbiologia das bebidas alcoólicas obtidas por fermentação	11
2.2.2 Microbiota presente na fermentação espontânea	13
2.2.3 Inóculo: natural, selecionado ou industrializado	14
2.2.4 Fermentação	15
2.2.5 Sistemas fermentativos	16
2.2.5.1 Sistema descontínuo (batelada simples).....	17
2.2.5.2 Sistema semicontínuo (batelada alimentada).....	17
2.2.5.3 Sistema Contínuo.....	18
2.2.5.4 Maceração carbônica	19
2.2.5.5 Termovinificação.....	19
2.3 Vinho e vinificação.....	20
2.3.1 Etapas da vinificação	21
2.3.1.1 Desengace e esmagamento.....	21
2.3.1.2 Mosto	22

2.3.1.3 Chaptalização	22
2.3.1.4 Sulfitação.....	23
2.3.1.5 Clarificação	25
2.3.1.6 Colagem	26
2.3.1.7 Trasfega.....	27
2.3.1.8 Filtração	27
2.3.1.9 Atesto	28
2.3.2 Vinificação em tinto e em branco.....	28
2.3.2.1 Vinificação em branco	28
2.3.2.2 Vinificação em tinto.....	29
2.3.3 Qualidade do vinho.....	30
3 Referências Bibliográficas.....	33
CAPÍTULO 2: Seleção de leveduras para fermentação alcoólica do mosto de frutas tropicais.....	40
1 Resumo	41
2 Abstract.....	42
3 Introdução	43
4 Referencial Teórico	45
4.1 Metabolismo microbiano	45
4.1.1 Fermentação alcoólica	46
4.1.2 Produtos originados da fermentação.....	48
4.1.2.1 Etanol	48
4.1.2.2 Glicerol.....	50
4.1.2.3 Compostos formadores de aroma	52
4.1.3 Carboidratos de reserva.....	53
4.2 Inóculo	55
5 Material e Métodos.....	56
5.1 Leveduras utilizadas e preparo do inóculo.....	56

5.2 Condições de cultivo.....	57
5.3 Análises durante o processo fermentativo.....	57
5.3.1 Análises químicas	58
5.3.2 Análises microbiológicas	60
5.3.2.1 Contagem de células	60
5.3.2.2 Biomassa ou massa seca.....	62
5.3.3 Análise estatística	62
6 Resultados e Discussão.....	63
6.1 População celular	63
6.1.1 Crescimento a 18 °C.....	63
6.1.2 Crescimento a 22 °C.....	65
6.1.3 Crescimento a 25 °C.....	66
6.2 Biomassa.....	69
6.3 Morfologia	74
6.4 Relação etanol/biomassa e glicerol/biomassa	75
7 Conclusões.....	77
8 Referências Bibliográficas.....	78
CAPÍTULO 3: Elaboração de bebida alcoólica fermentada a partir dos mostos de cajá (<i>Spondias mombin</i>) e cacau (<i>Theobroma cacao</i>)	85
1 Resumo	86
2 Abstract.....	87
3 Introdução	88
4 Referencial Teórico	90
4.1 Cacau – <i>Theobroma cacao</i>	90
4.2 Cajá – <i>Spondias mombim</i>	91
4.3 Ação enzimática	94
4.3.1 Parede celular de frutos.....	94
4.3.2 Produção de enzimas	94

4.3.3 Utilização das enzimas.....	95
5 Material e Métodos.....	97
5.1 Polpas.....	97
5.2 Preparo e correções do mosto.....	97
5.2.1 Chaptalização	98
5.2.2 Desacidificação e tratamento enzimático	98
5.2.3 Sulfitação	99
5.2.4 Colagem	99
5.2.5 Inoculação	100
5.3 Fermentação	100
5.4 Trasfega	100
5.5 Filtração	101
5.6 Análises na bebida.....	101
5.6.1 Análises químicas.....	102
5.6.1.1 Etanol e glicerol.....	102
5.6.1.2 Álcoois superiores, metanol, acetaldeído e ésteres	103
5.6.1.3 Ácidos orgânicos	104
5.6.1.4 Acidez total.....	105
5.6.1.5 Acidez volátil.....	105
5.6.1.6 Potencial hidrogeniônico (pH).....	105
5.6.1.7 Anidrido sulfuroso total e anidrido sulfuroso livre.....	105
5.6.1.8 Açúcares redutores (glicose e frutose) e não redutores (sacarose)	106
5.6.1.9 Açúcares totais.....	106
5.6.2 Análise sensorial.....	106
6 Resultados e Discussão.....	108
6.1 Preparo do mosto.....	108
6.1.1 Chaptalização	108
6.1.2 Tratamento enzimático.....	110

6.1.3 Colagem	111
6.1.4 Sulfitação	112
6.2 Fermentação do mosto	113
6.3 Análises químicas das bebidas	116
6.4 Análise sensorial das bebidas.....	120
7 Conclusões	123
8 Referências Bibliográficas	124
ANEXOS	128

RESUMO

DIAS, Disney Ribeiro. **Aspectos gerais da fruticultura tropical, enotecnologia e biotecnologia de fermentações**. Lavras: UFLA, 2001. 130p. (Dissertação – Mestrado em Ciência dos Alimentos).*

O estudo para a elaboração de bebida alcoólica fermentada obtida a partir do mosto de frutas tropicais foi dividido em duas fases. Primeiramente foi selecionada uma estirpe de *Saccharomyces cerevisiae*, testada quanto à performance de crescimento em meio sintético, para ser utilizada como inóculo. A segunda parte foi avaliar a aceitação de bebidas alcoólicas produzidas a partir de polpas de cacau (*Theobroma cacao*) e cajá (*Spondias mombin*). As polpas utilizadas neste experimento provieram do CEPEC/CEPLAC, Itabuna – BA, onde também foram caracterizadas. O experimento foi conduzido no Departamento de Biologia e no Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade Federal de Lavras. Para isto, as três leveduras, codificadas como Sc₁, Sc₂ e Sc₃, foram submetidas a crescimento nas temperaturas 18 °C, 22 °C e 25 °C, em meio MF (Schwan e Rose, 1994). Utilizou-se o sistema fermentativo em batelada simples, com reciclo do meio de cultivo a cada 24 horas, perfazendo um tempo total de 56 horas para cada uma das temperaturas avaliadas. Foram coletadas amostras a cada 4 horas no primeiro dia e a cada 6 horas nos dois dias seguintes do experimento. Em cada amostra coletada foram feitas as seguintes análises: contagem do número de células viáveis; determinação do peso seco; açúcares redutores pelo método de DNS (Miller, 1959); etanol e glicerol por cromatografia líquida de alta eficiência. A análise estatística utilizada foi o sistema rotacional de superfície de resposta, a partir do programa Statistica para Windows. Esta análise evidenciou não haver diferenças significativas quanto à capacidade de formação de etanol e glicerol entre as três leveduras testadas. Entretanto, a temperatura de 22 °C mostrou uma melhor taxa de fermentação e foi, então, definida como a melhor temperatura para condução dos experimentos para elaboração da bebida alcoólica. A partir destes resultados, passou-se à segunda etapa do experimento, a elaboração da bebida. Ambas as polpas, de cacau e de cajá, foram chaptalizadas a 24° Brix e 22 °Brix, respectivamente, para constituir 20 litros de mosto. O mosto foi desacidificado a pH 4,5 para ser submetido ao tratamento enzimático com solução de Ultrazym^R AFP-L (Novo

* Comitê Orientador: Rosane Freitas Schwan - UFLA (Orientadora), Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA e Luís Carlos Oliveira Lima - UFLA

DK). Foi utilizado SO_2 , na forma de metabissulfito de potássio, como agente inibidor do crescimento bacteriano e como antioxidante. Os mostos foram adicionados de bentonite como agente colante, para facilitar o processo de clarificação. Depois destes tratamentos, os mostos foram inoculados com a levedura selecionada na concentração de 10^7 cel./mL. A fermentação foi conduzida a 22°C durante dez dias, com acompanhamento diário do grau Brix e da atividade fermentativa pela liberação de CO_2 . Ao final da fermentação, os mostos foram armazenados a 10°C . Depois de dez dias a esta temperatura, foi feita a primeira trasfega. Uma outra, 30 dias após a primeira, foi realizada antes da filtração em terra de diatomáceas e placa de celulose. O produto final foi submetido a análises normalmente feitas em vinhos. Etanol, glicerol e ácidos orgânicos foram analisados por CLAE. CG foi utilizada para analisar álcoois superiores, metanol, ésteres e acetaldeído. Todos os metabólitos detectados na bebida estavam dentro dos padrões estabelecidos pelo Ministério da Agricultura para bebidas fermentadas. Foram detectadas concentrações elevadas de álcoois superiores, os quais são normalmente responsáveis pela formação de sabor e aroma da bebida. A aceitação das bebidas foi realizada por 45 provadores não treinados, utilizando-se escala hedônica de 9 pontos. Os dados, avaliados pela análise de Mann Whitney, mostraram que as bebidas foram bem aceitas, podendo ser uma nova fonte de investimento para indústrias ou pequenos produtores.

ABSTRACT

DIAS, Disney Ribeiro. **General aspects of tropical fruits, winemaking and fermentation biotechnology**. Lavras: UFLA, 2001. 130p. (Dissertation – Master Program in Food Science).*

The aim of this work was two-fold. First, to select one of three strains of *Saccharomyces cerevisiae* which were tested for better growth performance in synthetic medium for use as an inoculum. Secondly, to evaluate the acceptance of beverages made from cocoa (*Theobroma cacao*) and yellow mombin (*Spondias mombin*) fruit pulp. The fruit pulps used were extracted and characterised from fresh fruit at CEPLAC, Itabuna, Bahia. The experiments were carried out in the Department of Biology and Department of Food Science at the Federal University of Lavras, MG, Brazil. Three strains of *Saccharomyces cerevisiae* were used: a wild isolate from a sugar cane fermentation and two commercial varieties. The first objective consisted of selection of the yeast after growth at different temperatures (18° C, 22° C and 25° C) in MF medium (Schwan and Rose, 1994). A batch system was used with one recycle every 24 hours for a total of 56 hours for each temperatures tested. Samples were collected after 24 hours and every 6 hours subsequently. All samples were analysed for viable count; dry weight, reducing sugars (DNS); ethanol and glycerol by HPLC. No significant differences were found among the ethanol and glycerol concentrations using the rotational system of surface response. However at 22° C the overall fermentation rate was better and this temperature was used for the following experiments to make the final alcoholic beverage. Both fruit pulps (cacao and yellow mombin) had their sugar content fixed at 24° and 22° Brix, respectively. The must was deacidified until it reached pH value of 4.5 and then enzymatically treated with Ultrazym AFP-L (Novo DK). Sulphur dioxide, as potassium metabisulfite, was used as an inhibitor of bacterial growth and as an antioxidant. Bentonite was also added to aid the must clarification. After these adjustments the must was inoculated with 10⁷ cell/ml of selected yeast. The fermentation was carried out at 22° C for 10 days, with daily monitoring of Brix and fermentation activity by the liberation of CO₂. At the end of the fermentation the fermented must was stored at 10° C for sedimentation of the yeasts. Another separation of cells from the fermented must was done 30

* Guidance Committee: Rosane Freitas Schwan - UFLA (Major Professor), Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA and Luís Carlos Oliveira Lima - UFLA

days after the first one, using filtration with diatomaceous earth and a cellulose plate. The final product was submitted to chemical analysis normally done for white wines. Ethanol, glycerol, organic acids were measured by HPLC. GC was used to measure higher alcohols, methanol, esters e acetaldehyde. All the metabolites were within the standards established by the Ministry of Agriculture. There was a high concentration of higher alcohols, which are usually responsible for the flavour found in alcoholic beverages. The acceptance of the drink was assessed by 45 panellists using the hedonic scale (1-9). The data were analysed by the Mann-Whitney non-parametrical method that showed good scores for both cacao and yellow mombin. Both beverages were well accepted and provide potential new products for small or medium enterprises.

CAPÍTULO 1

ASPECTOS GERAIS DA FRUTICULTURA TROPICAL, ENOTECNOLOGIA E BIOTECNOLOGIA DE FERMENTAÇÕES

1 INTRODUÇÃO GERAL

A elaboração de bebidas alcoólicas é um dos mais antigos processos que acompanham a civilização, tendo, ao que tudo indica, sido iniciado com as produções de vinho e cerveja há milhares de anos. Ambas as bebidas, vinho e cerveja, bem como outras que surgiram com a própria evolução da sociedade, tiveram melhorada sua tecnologia de produção à medida que se tornaram uma fonte, extensiva, de geração de capital e trabalho. Além do aspecto financeiro, há toda uma cultura e tradição por trás da produção de bebidas, sendo algumas caracterizadoras de suas regiões produtoras. Bem conhecidas são as cervejas holandesas e alemãs; os vinhos europeus provenientes da França, Portugal e Alemanha; os maltes escoceses, que geram os melhores uísques; além da tequila mexicana, do saquê japonês e da bebida destilada mais produzida no mundo, a aguardente ou cachaça brasileira.

Há uma tendência de se buscarem, a cada dia, novas tecnologias que tragam consigo, além de uma maior produtividade, uma melhora na qualidade do produto final. Os processos de vinificação têm sido um bom exemplo desse progresso. A fermentação alcoólica do mosto de uvas, algo que antes era totalmente empírico, tornou-se uma das mais fortes áreas da pesquisa agroindustrial. Dentro deste contexto, a viticultura e a enologia estudam vários aspectos para a melhoria da produção, que vão desde a seleção das melhores cultivares e variedades de vinha e do melhor sistema e microrganismo para fermentação até os cuidados para obtenção da bebida final, sua estabilização, engarrafamento e venda. As leveduras utilizadas no processo de fermentação são de extrema importância para o produto final obtido. São elas que transformarão os açúcares em etanol e do seu metabolismo também são gerados os demais compostos formadores de aroma que caracterizam, peculiarmente, a bebida.

Além da uva, outras frutas têm sido utilizadas para a produção de bebidas alcoólicas fermentadas. Talvez as mais difundidas sejam a cidra, obtida a partir da fermentação do mosto de maçãs, e o *Perry*, obtido da fermentação do mosto de pêras. Muitas das bebidas alcoólicas tiveram sua origem a partir de uma descendência cultural, que posteriormente assumiu os moldes capitalistas e tornou-se indústria. Algumas outras surgiram como alternativa para o aproveitamento do excesso de produção frutícola de certas regiões ou como uma inovação tecnológica para o uso das mesmas, como as bebidas alcoólicas fermentadas obtidas de pêssego, laranja e caju.

Sob os aspectos de superprodução e aproveitamento das safras frutícolas brasileiras, são observadas algumas necessidades para que as cifras de perdas sejam atenuadas. As estatísticas mostram que os volumes perdidos, em relação às frutas tropicais, estão entre 40% e 50%, sobremaneira nas cultivares como manga, abacaxi e mamão. Em contrapartida, a fruticultura tem sido apontada como uma das alternativas viáveis de produção agrícola. Uma associação entre a diversificada flora frutífera brasileira e as tecnologias de produção de bebidas alcoólicas fermentadas poderia apresentar uma confluência para o aproveitamento da produção ou gerar novas perspectivas, quando da utilização de frutas tropicais nativas como cajá, *Spondias mombin*, e cacau, *Theobroma cacao*. Tem sido observado que as frutas tropicais têm ganhado mercado além de suas áreas limítrofes de produção. Dentre estas frutas emergentes, incluem-se as *Spondias* (cajá, ciriguela, umbucajá e cajamanga). Sobre o cajá, há relatos de que dele pode ser produzida bebida alcoólica de boa qualidade e aceitação. Uma outra fruta, característica do nordeste brasileiro, que poderia ter sua polpa utilizada para a elaboração de bebida, é o cacau, cujo comércio de amêndoas para a produção de chocolate já não é tão economicamente viável como fora há cerca de 6 anos, fazendo com que os cacaucultores busquem novas fontes de

renda utilizando matérias-primas pouco aproveitadas até então, como a polpa de cacau.

A elaboração de bebidas fermentadas tendo como base frutas tropicais vem a ser uma alternativa para evitar o desperdício, além de poder gerar novos empregos e tecnologias. A biotecnologia dos processos fermentativos, principalmente os desenvolvidos para a produção de vinho, pode ser usada analogamente para a elaboração de fermentados de frutas. Há, porém, a necessidade de testar o procedimento técnico apropriado para cada fruta, o que requer estudos mais detalhados para determinação de uma metodologia apropriada, os quais foram objetivos deste presente trabalho.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fruticultura Tropical

2.1.1 Evolução do mercado frutícola brasileiro

A utilização de frutas como fonte de renda é uma realidade não muito recente em nosso país. Todavia, alguns aspectos, pendentes quando do início da fruticultura como mercado, continuam a preocupar este importante setor comercial brasileiro. Murayama (1973) mencionou que o solo brasileiro é propício ao cultivo de um vasto número de plantas frutíferas. Isto seria possível devido à variada constituição química do solo, somada às variações climáticas aqui existentes. Dependendo da região do país, as espécies frutíferas seriam adaptadas, gerando novas fontes de investimento e desenvolvimento. O autor complementava que não bastaria investir somente na produção. Para o fruticultor atender aos mercados internos e externos, seria necessário um equilíbrio entre qualidade e quantidade do fruto a ser comercializado, salientando maior atenção à qualidade do produto e, com isso, tornando o país um grande produtor mundial neste mercado. Um outro aspecto, global, que se relaciona à qualidade do produto final, é o montante que pode ser perdido durante as fases de pré e pós-colheita. Para exemplificar, na cultura da uva, segundo Salunkhe e Desai (1984), aproximadamente 27% da produção mundial são perdidos. Dentre as causas de perda, as principais são as mecânicas, fisiológicas e microbiológicas. Em função da natureza frágil das bagas da uva, as causas mecânicas são expressivas naquele percentual.

Cerca de uma década após os apontamentos de Murayama, o Brasil alcançou a segunda posição no mercado mundial de produtores de frutas, numa

época considerada por Gomes (1985) como sendo o início do desenvolvimento frutícola do país.

Em relação às perdas, ainda há números preocupantes. Como citam Araújo e Silva (1995), o volume de frutas nativas perdidas na fase pós-colheita gera um desperdício que repercute econômica e socialmente em algumas regiões do país. Segundo ele, entre 40% e 50% da produção da fruticultura tropical, principalmente nas culturas de manga, abacaxi e mamão, são perdidas.

Lima (1998) reitera haver um grande desperdício de matéria-prima no setor frutícola, bem como em outras áreas da agricultura nacional. O autor propõe que grande parte destas perdas é reflexo do pouco conhecimento de como o excesso da produção poderia ser utilizado. Acredita, ainda, que a industrialização seria uma das formas de diminuir o prejuízo. Para algumas frutas, como laranja, toda a produção já possui destino certo em algumas atividades industriais (produção de sucos, principalmente). Existem alguns problemas para frutas cujo consumo sem processamento não absorve a produção anual ou de uma safra, sendo necessário processá-las (polpas, sorvetes, bebidas, doces). Mesmo que a qualidade de uma fruta íntegra não seja mantida, um pré-processamento garantiria um maior aproveitamento da produção.

Todavia, as perspectivas para o futuro da fruticultura brasileira são positivas. No mercado nacional, ela passa a assumir um papel como geradora de divisas dentro do setor agrícola. Anualmente, cerca de 20 bilhões de dólares são movidos pelo setor fruti-hortícola. Ainda assim, grandes perdas permanecem. De toda a produção, entre o que foi plantado e o que foi colhido, 30% são perdidos. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de frutas, com cerca de 36 milhões de toneladas, aproximadamente 10% do volume mundial. Neste contexto, as frutas frescas movimentam cerca de 23 bilhões de dólares. Deste total, apenas 10%, ou 2,3 bilhões de dólares, são referentes às frutas tropicais. O mercado de frutas tropicais cresce um bilhão de dólares ao ano, tendo, o Brasil, apenas 1%

de participação. Entretanto, existem estudos e ações para o estímulo do desenvolvimento de novas tecnologias para a fruticultura tropical, por parte da Embrapa, visando ampliar o agronegócio nacional (Panneta, 2000).

O governo Nacional demonstra intenções de fortalecer a fruticultura através do Plano Plurianual de Investimentos 2000/2003. A intenção é nivelar, internacionalmente, os padrões de qualidade e competitividade frutícola nacionais, investindo na capacitação tecnológica de produção. Este Plano prevê, como ações prioritárias, o apoio à geração de novas tecnologias em fruticultura, o melhoramento de cultivares e cuidados em colheita e pós-colheita. Também incentivará a promoção das frutas brasileiras nos mercados interno e externo e o desenvolvimento de métodos, técnicas e processos tecnológicos, em parceria com instituições de ensino e pesquisa, que possam inovar a utilização das frutas no mercado (Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 2001a).

Um outro exemplo de incentivo ao mercado frutícola está ocorrendo na região Norte do estado de Minas Gerais. Lá, existe um projeto de fruticultura irrigada no qual variedades como manga, uva, anonas (atemóia, pinha e graviola) e banana, entre outras, movimentam milhões de dólares anuais. Só no município de Janaúba, capital daquele pólo fruticultor, são mais de 42 milhões de dólares ao ano, aproximadamente 3,5 milhões de dólares mensais, levando-se em conta os comércios interno e externo, uma quantia significativa para uma cidade com 60 mil habitantes. Além do aumento da renda e do número de empregos, a qualidade de vida foi melhorada (Brazilian Fruit, 2001).

2.1.2 Importância comercial de algumas frutas cultivadas no Brasil

De acordo com o Ministério da Agricultura e do Abastecimento (2001b), durante a década de 90, entre 1991 e 1998, o Brasil manteve suas exportações de frutas entre 0,5% e 1,0% das exportações mundiais deste setor. Algumas das principais frutas brasileiras exportadas, em ordem de valor comercializado

naquele período, foram: melão, laranja, banana, mamão, maçã e abacaxi. O Ministério da Agricultura e Abastecimento cita, ainda, que dentro do montante do total de frutas exportado, a exportação de *outras frutas*, não discriminadas, ampliou de 8,4 milhões de dólares, em 1991, para aproximadamente 57 milhões de dólares em 1998 (Figura 1, na qual os valores percentuais referem-se à participação brasileira nas exportações mundiais). Naquele ano, foram exportados 28 milhões de dólares em melão. A projeção para as exportações do mercado mundial para o ano 2000 foi de 22 bilhões de dólares.

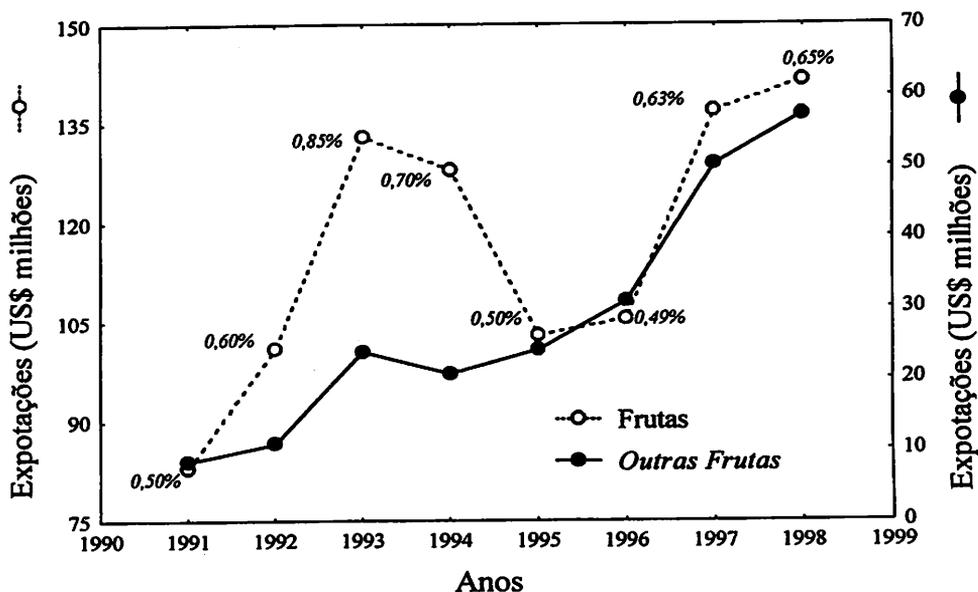


FIGURA 1 Valores de exportação total de frutas e *outras frutas* pelo Brasil. Fonte: Ministério da Agricultura e do Abastecimento (2001b).

Segundo estatísticas da SBF (2001) sobre o comércio internacional de frutas, as quantidades exportadas pelo Brasil nos anos de 1999 e 2000 foram,

respectivamente, 232 mil toneladas e 235 mil toneladas, lideradas por maçãs (57 mil toneladas e 64 mil toneladas em 1999 e 2000, respectivamente), bananas (57 mil toneladas e 53 mil toneladas em 1999 e 2000, respectivamente), laranjas (52 mil toneladas e 31 mil toneladas em 1999 e 2000, respectivamente) e melões (21 mil toneladas em 1999 e em 2000).

2.1.3 Aspectos nutricionais e aproveitamento das frutas

As frutas são alimentos que fornecem uma gama de atrativos sensoriais (cor, textura, sabor e aroma). Além destes atributos, a grande maioria apresenta, em sua estrutura, 80% de água, contendo também carboidratos, vitaminas, proteínas, sais minerais e lipídios (Tabela 1).

TABELA 1 Composição nutricional de algumas frutas para cada 100 g de porção comestível.

Fruta	Nome Científico	Glicídios (g)	Proteínas (g)	Lipídios (g)	Retinol (Vit. A) (mcg)	Ácido ascórbico (Vit. C) (mg)	Ca (mg)	Fe (mg)
Abiu	<i>Pouteria caimito</i> Radke	22,0	0,40	0,20	46,0	13,2	13,0	0,40
Cacau (amêndoa)	<i>Theobroma cacao</i> L.	1,50	21,80	52,1	5,00	0,0	120,0	3,00
Cajá	<i>Spondias mombin</i> , <i>Spondias lutea</i> L.	13,80	0,80	2,10	<i>nf</i>	4,7	26,0	2,20
Ciriguela	<i>Spondias purpurea</i> L.	22,00	0,90	0,10	<i>nf</i>	<i>nf</i>	22,0	0,60
Cupuaçu	<i>Theobroma grandiflorum</i> Schum	14,70	1,70	1,60	30,0	26,5	23,0	2,60
Graviola	<i>Annona muricata</i> L.	14,90	1,10	0,40	2,00	26,0	24,2	0,50
Jabuticaba	<i>Myrciaria cauliflora</i> Berg.	11,20	0,54	0,00	0,00	12,8	9,00	1,26
Pitanga	<i>Eugenia pitanga</i> Kk	6,40	1,02	1,90	210,0	14,0	9,00	0,20
Sapoti	<i>Manilkara zapota</i> L., van Royen	20,69	1,36	1,00	8,0	6,7	25,0	0,30
Uvaia	<i>Eugenia uvalha</i> L.	6,80	1,70	0,40	30,0	200,4	10,0	2,60

Fonte: a partir de Franco (1999). *nf* = dado não fornecido.

Para maior aproveitamento destes nutrientes, é necessário que as frutas sejam ingeridas no seu estágio final de maturação, fase na qual o vegetal produziu os máximos teores das substâncias supracitadas. Parte das vitaminas e outros compostos das frutas são termolábeis, sendo que, para o aproveitamento dos mesmos, é necessário ingerir a fruta a fresco, sem tratamento térmico (Lima, 1998; Franco, 1999).

Os oligoelementos fornecidos pelas frutas são fundamentais para o metabolismo celular humano. Além disso, muitas frutas fornecem, a partir de seus tecidos (pericarpo, mesocarpo e endocarpo), comumente conhecidos por casca e polpa, um alto teor de fibras alimentares (Franco, 1999).

Mais recentemente, como apontado por Pollonio (2000), estudos têm abordado uma nova categoria alimentar, os *alimentos nutraceuticos* ou *alimentos funcionais* (os quais têm aumentada a concentração de uma ou mais substâncias fundamentais à manutenção da homeostase), em que as frutas são amplamente utilizadas, principalmente em relação às propriedades antioxidantes de alguns de seus componentes (*e.g.* vitamina C, fenólicos, carotenóides).

Grande parte da produção nacional de frutas não é voltada ao consumo fresco, mas ao processamento. Dentro desta produção, uma maior parcela é voltada para a elaboração de sucos, polpas, néctares e bebidas alcoólicas, e outra parcela é destinada ao fabrico de doces, compotas e sorvetes (Lima, 1998). Este autor comenta que a industrialização de frutas pode seguir dois caminhos distintos: a indústria é projetada para receber e processar um único tipo de matéria-prima (*e.g.* suco de laranja, bebida alcoólica) ou para estar apta a processar várias matérias-primas num mesmo estabelecimento, o que o autor cita como "instalações polimodais".

2.2 Bebidas alcoólicas obtidas por fermentação

A história da produção de bebidas alcoólicas iniciou-se centenas de anos antes da era Cristã, provavelmente com a fermentação espontânea do suco de uvas, as quais, como muitas frutas, têm uma microbiota presente em sua superfície. Com o armazenamento, que normalmente promove uma elevação de temperatura, a fermentação alcoólica era iniciada. A hidrólise do amido, presente em cereais, para a produção de cerveja ocorreu, segundo historiadores, no Egito, 6000 anos a.C. (Rose, 1977; Aquarone, 1993). Aquarone (1993) prossegue citando que quão numerosas são as origens das bebidas, as são, também, suas variedades. Em relação às bebidas alcoólicas fermentadas obtidas de frutas, Brasil (1997) as define como sendo a "bebida com graduação alcoólica entre quatro e quatorze por cento em volume, a 20 °C, obtida da fermentação alcoólica do mosto de fruta sã, fresca e madura, o qual pode ser adicionado de açúcares, água e outras substâncias previstas, em ato administrativo complementar, para cada tipo de fruta."

Segundo Lee (1996), para a produção de bebidas são utilizados os mais variados substratos, sejam cereais, frutos ou bulbos (Tabela 2). O autor cita cifras da produção mundial de cerveja, exemplificando os EUA e o Brasil, que em 1990 movimentaram, respectivamente, US\$20 bilhões e US\$5 bilhões. Naquele ano, a indústria cervejeira mundial produziu mais de 1,1 milhões de hL (hectolitros) da bebida. Em 1992 foram produzidos 326 milhões de hL de vinho, valores mundiais. Demain (2000) ressalta que todas as bebidas alcoólicas são produzidas por fermentação, sendo que algumas podem sofrer destilação após o processo fermentativo.

2.2.1 Microbiologia das bebidas alcoólicas obtidas por fermentação

Durante muito tempo, as produções de vinho e cerveja foram, primorosamente, processos empíricos. Um passo científico importante para o

entendimento da obtenção de bebidas foi dado por Leeuwenhoek, que em 1680 observou, em seu microscópio, células, que seriam leveduras, presentes em mosto de cerveja. Pasteur, nos anos de 1866 e 1876, publicou, respectivamente, os artigos *Études sur le Vin* e *Études sur la Bière*. Os estudos de Pasteur contribuíram imensamente para a elucidação do que ocorria na fermentação alcoólica. Naquele segundo estudo, o cientista constatou que células de leveduras, ou fermentos, promoviam a fermentação em ausência de ar e que, durante o processo, as leveduras convertiam açúcar em etanol e dióxido de carbono (Rose, 1977).

TABELA 2 Variedades de bebidas alcoólicas.

Bebida	Substrato	Microbiota	Geografia	Destilada	Teor alcoólico (°GL)
Aguardente ⁴	Cana-de-açúcar	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> e/ou microbiota natural	Brasil	Sim	38-54
Cerveja ¹	Cevada	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mundial	Não	3-6
Chicha ²	Milho	<i>Aspergillus sp</i> , <i>Penicillium sp</i> , leveduras e bactérias	Peru	<i>nf</i>	<i>nf</i>
Licor ⁴	Frutas	Não é uma bebida fermentada	Mundial	Não	18-54
Saquê ⁴	Arroz	<i>Aspergillus oryzae</i> e leveduras	Japão	Não	14-26
Sorghum ²	Sorgo e milho	Bactérias do ácido láctico e leveduras	África do Sul	Não	<i>nf</i>
Tequila ³	Agave (cacto)	Leveduras	México e Américas	Sim	36-54
Uísque ¹	Cevada, trigo.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mundial	Sim	40-45
Vinho ¹	Uvas	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> e/ou microbiota natural	Mundial	Não	6-18
Vodca ⁴	Cereais	Depende do cereal do qual foi originada	Europa, mundial	Sim (tratada com carvão ativo)	40-45

Fonte: 1) Walker (1998); 2) Beuchat (1997); 3) Pinal et al. (1997); 4) Aquarone (1993). *nf*= não fornecido.

2.2.2 Microbiota presente na fermentação espontânea

Na vinificação, normalmente há uma sucessão de espécies de leveduras envolvida. Inicialmente, há o crescimento de espécies sensíveis ao álcool, como *Kloekera apiculata*, *Hanseniospora guillemondii* e *Candida pulcherrima*, seguidas por algumas espécies de *Saccharomyces*, como *S. rosei*, *S. veronae* e *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*. Posteriormente, quando a concentração de álcool no mosto aproxima-se de 10%, as leveduras predominantes são: *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *S. oviformis*, *S. chevalieri* [renomeada como *S. cerevisiae* var. *chevalieri*, segundo Kurtzman e Fell (1998) e Barnet, Payne e Yarrow (2000)] e *S. italicus*. Durante o processo fermentativo também podem atuar algumas bactérias, como as do ácido láctico, cujo metabólito produzido pode ser de interesse na bebida final (Kunkee e Goswell, 1977; Harrison, 1978). Dittrich (1987) observou a ocorrência microbiana numa fermentação espontânea de mosto de uvas brancas durante 28 dias, identificando os seguintes microrganismos: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata*, *C. krusei*, *Lactobacillus* sp, *Kloekera apiculata* e *Leuconostoc mesenteroides*. Após o segundo dia da fermentação houve prevalência de *Saccharomyces cerevisiae*. Kunkee e Bisson (1993) e Fleet (1993 e 1999) descrevem a seguinte sucessão durante a fermentação alcoólica de vinhos: *Kloekera* sp, *Hanseniospora* sp, *Candida* sp, *Metschnikowia* sp, *Pichia* sp e *Kluyveromyces* sp, as quais atingem uma população em torno de 10^7 células por mL, permanecendo até o quarto dia da fermentação. Estas leveduras vão perdendo a viabilidade em função de sua baixa tolerância ao etanol produzido, mas são responsáveis por uma parte dos produtos finais que caracterizam um vinho. Os autores também mencionam que a *Saccharomyces cerevisiae* também cresce durante este período inicial, prevalecendo até o final da fermentação por sua maior tolerância ao etanol.

2.2.3 Inóculo: natural, selecionado ou industrializado

A fermentação espontânea é uma prática comum nos países menos industrializados e tem sido utilizada desde os primeiros tempos da descoberta dos processos fermentativos, sendo a base da produção de bebidas em países em desenvolvimento. Mesmo em países industrializados, algumas casas viníferas não abrem mão deste processo. Estes produtores acreditam que a fermentação espontânea gera vinhos de qualidade superior, com mais corpo e aroma. Este conhecimento empírico foi comprovado por alguns estudos científicos. Alguns outros estudos não observaram esta correlação (Reed e Nagodawithana, 1991). Um dos exemplos da utilização deste inóculo natural, muitas vezes obtido a partir de um pé de cuba*, é a produção de vinhos e aguardente no Sul de Minas Gerais (Silva, 1998; Mendonça, 1999).

O uso de culturas selecionadas para iniciar a fermentação nas indústrias de vinho data da década de 50. Desde então, institutos de pesquisa em viticultura começaram a isolar culturas puras de leveduras com ótimo rendimento fermentativo, partindo de microrganismos selvagens, e formar coleções próprias. As culturas iniciadoras da fermentação são obtidas pela inoculação do microrganismo selecionado no mosto de frutas em escala de laboratório. Após 3 estágios de 12 h, tendo-se transferido o inóculo para frascos de maior volume, o volume celular é suficiente para iniciar a fermentação comercial. Já na década de 60, as indústrias passaram a produzir leveduras na forma liofilizada ou, como são normalmente comercializadas, *wine active dry yeasts*, que se difundiram globalmente. Esta forma de levedura é de fácil utilização, normalmente bastando ressuspendê-las em um volume de mosto a uma dada temperatura para que estejam ativas e em condições de iniciar a fermentação (Reed e Nagodawithana, 1988; Fleet, 1993 e 1997).

* Pé de cuba é o termo referente, basicamente, à formulação de uma cultura inicial a partir de leveduras selvagens, ou nativas, presentes na fruta. Deixa-se o mosto fermentar por um período de 2 a 4 dias, findos os quais haverá intensa fermentação (Pato, 1982).

2.2.4 Fermentação

Segundo Caldwell (1995), o termo fermentação denota vários aspectos bioquímicos. Por algum tempo foi considerada um processo metabólico exclusivo de microrganismos. Já foi definida como qualquer processo que ocorra na ausência de oxigênio. É um processo no qual a fosforilação ocorre em presença do substrato. Na área da biotecnologia, segundo o autor, o principal aspecto se refere a quais produtos poderão ser obtidos a partir da fermentação.

Sob o ponto de vista bioquímico, fermentação é um processo gerador de ATP no qual moléculas orgânicas atuam tanto como doadores quanto como receptores de elétrons, e que ocorre em anaerobiose. Significa a degradação de fontes orgânicas de carbono que rende 2 moléculas de ATP para cada molécula de substrato de partida, não requerendo oxigênio e não necessitando de uma cadeia de transporte de elétrons, tendo uma molécula orgânica como acceptor final de elétrons. Isto se deve ao fato de grande parte da energia permanecer nas ligações químicas dos produtos finais, como o ácido láctico (fermentação láctica), ácido acético (fermentação acética), etanol (fermentação alcoólica) e ácido propiônico, entre outros (Garret e Grisham, 1995; Tortora, Funke e Case, 1998). Consiste na degradação anaeróbica da glicose, ou outra fonte orgânica de carbono, a vários produtos, característicos para cada ser vivo, para obter energia na forma de ATP. A grande maioria dos organismos fermentadores tem em comum o fato de metabolizar a fonte de carbono até o piruvato e, deste, sintetizar outros compostos orgânicos retentores de energia, como os já supracitados (Lehninger, Nelson e Cox, 2000).

Para a produção de bebidas alcoólicas, a fermentação é fato. A mais importante delas, a fermentação alcoólica, não é um fenômeno isolado durante a degradação do mosto. No caso da obtenção do vinho, especificamente o tinto e também podendo ocorrer no vinho branco, a fermentação malolática (bioconversão do ácido málico em ácido láctico) trata a suavidade da bebida,

melhorando-a. A fermentação malolática é a descarboxilação do ácido málico em ácido lático através das bactérias lácticas do vinho. É de particular importância para vinhos de regiões frias, melhorando a qualidade por reduzir a acidez fixa e elevar o pH. Isto faz com que o sabor de vinhos ácidos seja modificado para melhor, pois o ácido lático (monocarboxílico) é menos agressivo ao paladar em relação ao ácido málico (dicarboxílico). Com a redução da acidez, há aumento da concentração de diacetil, que em valores entre 2 ppm e 4 ppm qualifica o vinho (Ferreira, 1982).

Além de etanol, glicerol e ácido lático, outros compostos orgânicos são sintetizados, em menores concentrações, durante o processo fermentativo, e são responsáveis pelo aroma da bebida (e.g. acetato de etila, álcoois superiores, ácidos orgânicos). Outros, como mercaptanas e gás sulfídrico, originam odores desagradáveis na bebida, diminuindo a qualidade da mesma (Kunkee e Bisson, 1993).

2.2.5 Sistemas fermentativos

∕ O objetivo da biotecnologia, na área da microbiologia, é obter produtos derivados do metabolismo microbiano que possam ser utilizados na forma de nutriente, medicamento, solvente e outros. Este procedimento acontece em duas fases distintas: uma sendo a fermentação propriamente dita e outra a fase de recuperação do produto. ∕ Para cultivar o microrganismo em condições ótimas, *i.e.*, para que haja o maior rendimento na produção dos metabólitos de interesse, foram desenvolvidos sistemas de fermentação. Os três principais sistemas industriais utilizados atualmente são a batelada simples (sistema descontínuo), a batelada alimentada (sistema semicontínuo) e o sistema contínuo (Borzani, 1975; Doin, 1975; Crueger e Crueger, 1993). Andrieta e Stupiello (1990a) citam dois outros processos que vêm sendo desenvolvidos para uso na produção do

álcool combustível, o contínuo em múltiplo estágio e a batelada contínua. Uma abordagem breve desses processos é feita a seguir.

2.2.5.1 Sistema descontínuo (batelada simples)

Este processo pode ser considerado como sendo um sistema fechado. No momento da introdução do inóculo (pé de cuba) no substrato, é tomado o tempo zero de fermentação, constituindo a primeira fase, ou seja, uma incubação sob condições ótimas de crescimento. Uma segunda fase do processo é a ação do microrganismo sobre o substrato, ou seja, a fermentação. Durante todo o desenrolar da fermentação nada é adicionado ao sistema, à exceção do oxigênio, necessário na fase inicial para formação de biomassa microbiana, um antiespumante, quando for requerido, e soluções ácidas ou básicas, para ajuste do pH. No sistema de batelada simples é observada a curva típica de crescimento microbiano (Crueger e Crueger, 1993; Walker, 1998).

Mendonça (1999) cita este processo como sendo o mais utilizado por produtores de aguardentes artesanais. Uma dorna de fermentação é inoculada com o pé de cuba e, num estágio seguinte (quando foi cessada a produção de CO₂), é feito o corte de dorna, que consiste na transferência de metade do conteúdo da dorna mãe para uma segunda dorna, completando-se, a seguir, o volume das duas dornas com caldo de cana a ser fermentado.

2.2.5.2 Sistema semicontínuo (batelada alimentada)

Neste sistema, são adicionados nutrientes ou substrato de maneira escalonada, de acordo com o progresso da fermentação. A formação de muitos metabólitos secundários está associada à repressão por altas concentrações de glicose e outros carboidratos ou por compostos nitrogenados. Estes elementos são adicionados em pequenas concentrações durante toda a fermentação. Como nem sempre é possível medir a concentração do substrato, devem-se medir

parâmetros indiretos correlacionados ao metabolismo do substrato, *e.g.* açúcares redutores totais durante a produção de etanol e pH durante a produção de ácidos orgânicos (Crueger e Crueger, 1993; Stanbury, Whitaker e Hall, 1995).

A batelada alimentada, ou sistema de Melle-Boinot, é a mais utilizada nas destilarias produtoras de álcool combustível. Foi responsável por 70% do etanol produzido na safra de 1989, sendo o mais importante no setor alcooleiro (Andrieta e Stupiello, 1990a).

2.2.5.3 Sistema Contínuo

Na fermentação contínua estabelece-se um sistema aberto, em que se adiciona continuamente uma solução nutritiva estéril ao fermentador (biorreator), ao passo que uma quantidade equivalente da mistura de substrato utilizado, nutrientes e microrganismos sai do aparelho (Ward, 1991). Esta retirada permanente de parte do mosto contido no biorreator (quimiostatato ou turbidostatato) durante a fermentação requer um posterior tratamento do mesmo. O efluente é submetido a um sistema de separação da biomassa (centrifugação, filtração em membrana), que é reintroduzida no fermentador após um tratamento ácido para eliminação de microrganismos, principalmente bactérias (Silva, 1995). Em relação ao processo de Melle-Boinot, o contínuo apresenta uma maior produtividade e menores problemas operacionais. Na safra de cana-de-açúcar de 1989, cerca de 30% do etanol foram obtidos por este sistema (Andrieta e Stupiello, 1990b).

Em enologia, os sistemas de vinificação em tinto e em branco são exemplos da vinificação clássica, sendo um exemplo de sistema descontínuo ou batelada simples, quando não há chaptalização nem adição de nutrientes, ou batelada alimentada, quando da inserção de nutrientes durante a produção da bebida. Outros processos, citados a seguir, existem para a elaboração de bebida alcoólica fermentada e são utilizados principalmente na vinificação.

2.2.5.4 Maceração carbônica

Cataluña (1988) comenta que a maceração carbônica é um tipo de vinificação através do qual são obtidos vinhos jovens e frutados, passíveis de consumo num curto prazo após a fermentação. Neste sistema, deve haver um cuidado especial durante a vindima. As uvas, não desengaçadas, devem estar intactas e protegidas da poeira e do calor. Quando já na pipa de fermentação, o espaço entre a massa fermentativa e a tampa do recipiente deve ser saturado com dióxido de carbono. Isto pode ocorrer pela utilização de CO₂ engarrafado ou pela introdução prévia de cerca de 10% do mosto que se deixou fermentar. Em média, a maceração termina no décimo segundo dia de contato. A tensão de gás carbônico é mantida estável pela própria fermentação. O mesmo autor comenta a suavização da bebida e a evidenciação dos compostos aromáticos secundários, provenientes da fermentação, como vantagens da maceração. O excesso de adstringência, passado ao vinho pela presença do engace, e a possível contaminação por bactérias lácticas e acéticas após o descube, são fatores negativos neste processo.

2.2.5.5 Termovinificação

Esta técnica consiste no aquecimento súbito das uvas prensadas, seguido de resfriamento, aumentando a extração da cor. Este aquecimento fará com que haja a destruição das células da polpa, liberando os pigmentos da uva mais rapidamente para o mosto. Os vinhos elaborados por este método sofrem algumas alterações, não danosas, na sua qualidade, recebendo novos aromas. Estas novas atribuições são facilmente distinguíveis dos vinhos elaborados pelas técnicas convencionais, que são preferidas pela maioria das casas vinícolas (Ough, 1996). Grassin e Fauquembergue (1996) complementam que o aquecimento, que ocorre a 70 °C, libera, também, taninos e aromas e inativa todas as enzimas endógenas da baga da uva.

2.3 Vinho e vinificação

Desde os tempos de Pasteur, a produção de vinho vem se desenvolvendo com fortes pesquisas nas áreas de viticultura e enologia. Há muito se diz que a enologia é uma ciência, enquanto a vinificação é uma arte. A viticultura está relacionada ao estudo da uva e seu cultivo, enquanto a enologia preocupa-se com o processamento pós-colheita das uvas e a elaboração dos vinhos. É sabido que a qualidade das uvas varia de ano para ano, de região para região e até mesmo de um dia para outro de colheita, podendo-se observar um caso particular para cada tipo de vinha (Villetez e Dubourdiou, 1991; Fleet, 1997).

Segundo a legislação brasileira (Brasil, 1988), o vinho "é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto de uva sã, fresca e madura" e pode ser classificado, quanto à classe, em "leve, champanha ou espumante, licoroso, composto e outros a serem definidos na regulamentação da lei"; quanto à cor, em "tinto, rosado ou 'rosé' e branco". Também pode ser classificado, quanto ao teor de açúcar, em "brut, extra-seco, seco ou 'sec' ou 'dry', meio seco, meio doce ou 'demi-sec', suave e doce". Quanto à graduação alcoólica, o "vinho leve tem graduação alcoólica entre 7° GL e 9,9° GL (onde ° GL significa grau Gay Lussac), obtido exclusivamente da fermentação dos açúcares naturais de uva *Vitis vinifera*, produzido durante a safra, nas regiões produtoras, vedada sua elaboração a partir do vinho de mesa"; o "vinho de mesa é o com graduação alcoólica entre 10° GL e 13° GL"; o "vinho frisante ou gaseificado é o de mesa com a gaseificação máxima de 2 (duas) atmosferas e mínima de meia atmosfera e graduação alcoólica não superior a 13° GL"; o "vinho licoroso é o vinho doce ou seco com graduação alcoólica entre 14° GL e 18° GL, adicionado ou não de álcool etílico potável, mosto concentrado, caramelo e sacarose".

2.3.1 Etapas da vinificação

Fleet (1999) cita que os processos básicos na preparação de vinhos abrangem:

- Esmagamento da uva e extração do suco;
- Fermentação alcoólica do suco por leveduras;
- Fermentação malolática (opcional) do vinho por bactérias do ácido láctico;
- Estocagem e envelhecimento do vinho em adegas;
- Engarrafamento e venda. A produção de vinhos encorpados ou fortes, como os do Porto, e dos vinhos gaseificados, requerem operações especiais adicionais.

Existem várias etapas na vinificação, sendo algumas comuns tanto para os vinhos tintos quanto para os vinhos brancos. A compreensão de alguns termos correntes em enologia é fundamental para o entendimento destes processos.

2.3.1.1 Desengace e esmagamento

Desengace é o termo referente à separação das bagas de uva de seu respectivo pedúnculo, pois a presença deste no mosto em fermentação provocaria a produção de vinho de qualidade inferior devido à alta acidez, adstringência e concentração de taninos. Já o esmagamento consiste em uma ação mecânica sobre as bagas de uva para que, delas, extraia-se o mosto (Pato, 1982; Cataluña, 1988). Pato (1982) cita que a inversão deste processo, promovendo-se inicialmente o esmagamento e, posteriormente, o desengace, é um fator antagônico para elaboração de vinhos de qualidade devido à excessiva matéria tânica liberada no mosto, facilitando processos oxidativos. Entretanto, é uma alteração de passível ocorrência pelo fato de muitos consumidores preferirem vinhos encorpados, adstringentes e intensamente corados. Silva (1998) aponta que esta inversão normalmente ocorre nas casas vinícolas do Sul

de Minas Gerais, providas, em sua grande maioria, de máquinas esmagadeiras e desengaçadeiras.

2.3.1.2 Mosto

O mosto resulta do esfacelamento da polpa, tendo, inicialmente, constituição semelhante à mesma. Todavia, algumas substâncias presentes no mosto são escassas ou inexistentes no vinho, devido a processos como transformação, evaporação, coagulação e precipitação (Pato, 1982). Brasil (1988) define mosto simples de uva como sendo "o produto obtido pelo esmagamento ou prensagem da uva sã, fresca e madura, com a presença ou não de suas partes sólidas". Ainda define o mosto concentrado, "produto obtido pela desidratação parcial do mosto não fermentado"; o mosto sulfitado, "mosto simples estabilizado pela adição de anidrido sulfuroso ou metabissulfito de potássio"; o mosto cozido e o mosto em fermentação.

2.3.1.3 Chaptalização

Ribéreau-Gayon e Peynaud (1964) descrevem a chaptalização como sendo a adição de sacarose ao mosto a ser fermentado. Este método foi desenvolvido pelo francês Chaptal, em 1801. A sacarose é empregada na forma cristalina, não se fazendo distinção quanto ao uso da obtida de cana ou da obtida de beterraba. Estes autores citam que para elevar o teor alcoólico em um grau GL são necessários, teoricamente, 17 gramas de sacarose por litro, ou 1,7 Kg de sacarose por hL de mosto. Cataluña (1988) complementa que quando o objetivo é obter um vinho com a graduação alcoólica desejada, a partir de um mosto com concentração de açúcares fermentescíveis insuficientes para tal operação, pode-se proceder a chaptalização. Neste processo, há a adição de açúcar (sacarose ou mosto concentrado) para que no, final da fermentação, obtenha-se o grau alcoólico previamente definido. Esta adição é calculada em função do

rendimento fermentativo. Em média, 1° Brix eleva em 0,60° GL o teor alcoólico da bebida. Portanto, a elevação de 1° GL requer o aumento dos açúcares do mosto em 1,8° Brix. Daí, para atingir estes valores, são necessários cerca de 25,2 g de açúcar por litro de mosto. Hashizume (1993) também menciona estes valores, comentando que são válidos quando a vinificação ocorre a baixas temperaturas. Este autor cita que, na prática, 1,8 Kg de sacarose por hL de mosto elevam o seu grau alcoólico de 1° GL. A sacarose deve ser dissolvida no mosto sob aquecimento ou na fase fermentativa da vinificação. No caso da vinificação em tinto, a chaptalização deve ocorrer após a descube (separação da matéria sólida).

Rizzon, Zanus e Manfredini (1994) citam que a chaptalização poderia ser evitada se algumas medidas preventivas fossem tomadas ainda no vinhedo. Aqui enquadrariam-se a colheita no ponto correto de maturação da uva, a diminuição do uso de adubação nitrogenada e de cama-de-aviário. Os mesmos autores são a favor, na necessidade da chaptalização, do emprego do açúcar de cana, seja na forma de cristais ou refinado, para a obtenção do grau alcoólico desejado (Tabela 3). O emprego de outros derivados da cana-de-açúcar, como açúcar mascavo e melaço, deve ser evitado por prejudicarem a qualidade do vinho.

2.3.1.4 Sulfitação

Consiste na adição de dióxido de enxofre (SO₂), seja na forma de sal (metabissulfito de potássio) ou gás (SO₂ gasoso). Pato (1982) sugere o emprego, preferencialmente, do dióxido de enxofre na forma gasosa, pois os sais contêm, em média, 50% de SO₂, e podem elevar os níveis de potássio na bebida final. No Brasil, não há obrigatoriedade quanto ao estado físico do SO₂ a ser utilizado, sendo que os níveis aceitáveis de dióxido de enxofre total para os vinhos de mesa não devem superar os 0,35 g·L⁻¹, não sendo preconizado, por lei, um limite mínimo (Ministério da Agricultura, 1988).

TABELA 3 Relação entre a quantidade de açúcar a ser adicionada ao mosto para correção do grau alcoólico da bebida.

°Babo a 20 °C	Álcool provável (°Babo x 0,6)	Kg de açúcar a adicionar em 100 litros de mosto para atingir o grau alcoólico de:	
		10,5 °GL	11,0 °GL
13	7,80	5,4	6,4
14	8,40	4,2	5,2
15	9,00	3,0	4,0
16	9,60	1,8	2,8
17	10,2	0,6	1,6
18	10,8	-	0,4
19	11,4	-	-
20	12,0	-	-

Fonte: Rizzon, Zanus e Manfredini, 1994.

Segundo Rizzon, Zanus e Manfredini (1994), a sulfitação é amplamente utilizada nos estabelecimentos vinícolas. As principais ações do dióxido de enxofre são:

- Ação seletiva, inibindo o crescimento de bactérias contaminantes e também algumas leveduras selvagens que seriam indesejáveis à fermentação,
- Ação antioxidante e anti-oxidásica, inibindo, respectivamente, alterações de frescor, aroma e coloração e a chamada casse oxidásica (turvação do mosto e do vinho por enzimas associadas à podridão do cacho),
- Regula a temperatura, impedindo sua elevação excessiva e conferindo melhor qualidade ao vinho, e
- Ação clarificante, no caso da vinificação em branco, gerando um mosto mais límpido após a prensagem. Hashizume (1993) acrescenta que existe uma ação seletiva do dióxido de enxofre, favorecendo as leveduras elípticas, desfavorecendo o crescimento das apiculadas e do gênero *Torulopsis* e inibindo

o crescimento bacteriano. Cita, ainda, que como dissolvente, o SO₂ favorece a dissolução da cor e dos polifenóis presentes no mosto. Henick-Kling e Park (1994) citam que quantidades de dióxido de enxofre adicionadas ao mosto, quando neste se pretende inocular tanto as leveduras, para promoção da fermentação alcoólica, quanto bactérias do ácido láctico, para promoção da fermentação malolática, podem ser elevadas pelo metabolismo das leveduras e inibir a ação bacteriana. Gerbaux e Meurgues (1995) observaram que teores de dióxido de enxofre até 80 mg·L⁻¹, adicionados inicialmente no mosto, têm um efeito negativo sobre o início da fermentação alcoólica, não interferindo, entretanto, no seu curso. Porém, a fermentação malolática é bem mais sensível às concentrações de anidrido sulfuroso. Estes teores de SO₂ total também possuem uma correlação positiva com a formação de acetaldeído. Para Ough (1996), o metabissulfito de sódio deve ser evitado e devem ser tomadas medidas de segurança quando do uso de SO₂ gasoso, devido à toxicidade deste. O autor comenta que é melhor usar uma solução aquosa a 5%, obtida da dissolução do gás. Palacios, Vasserot e Maujean (1997) citam que o vinho, assim como outras bebidas fermentadas, pode, freqüentemente, conter compostos voláteis sulfurosos, os quais são, devido aos seus níveis de percepção e características eméticas, responsáveis por defeitos organolépticos da bebida.

2.3.1.5 Clarificação

Du Plessis (1977) citou que, para os vinicultores, existe uma correlação entre a clarificação do mosto e a obtenção de vinhos de qualidade, mas não havia uma evidência clara desta relação. Pato (1982) cita que uma das funções da clarificação, quando da ocorrência da colagem, é amaciar o vinho pela precipitação de compostos que o tornam adstringente ao paladar. Estes compostos em suspensão podem sedimentar-se naturalmente ou pelo abaixamento da temperatura. Cataluña (1988) complementa que uma eficiente

clarificação, ou limpidez do vinho, pode ser obtida submetendo-se o mesmo à colagem e posterior filtração.

Enologicamente, a clarificação expressa a eliminação da turbidez dos vinhos em função da agregação de substâncias que aderem, superficialmente, às partículas dispersas na bebida, precipitando-as. Uma outra via de ação destes agentes clarificantes seria a formação de colóide com um determinado constituinte do vinho que, por sua vez, flocularia e arrastaria a substância causadora da turbidez. Aqui, leva-se em consideração a interação eletrostática entre as substâncias (Vogt et al., 1986). Grassin e Fauquembergue (1996) descrevem a utilização de complexos enzimáticos durante o curso da fermentação para diminuir a concentração destas substâncias coloidais. As enzimas, carboidrases, atuam hidrolisando as gomas, constituintes dos colóides.

2.3.1.6 Colagem

Segundo Pato (1982), é um processo que consiste na adição de substâncias, denominadas colas, ao vinho ou ao mosto em fermentação para que se consiga uma boa clarificação da bebida final. As colas podem ter diferentes origens e constituições e podem ser classificadas, pelo mesmo autor, em três grupos: I) Substâncias albuminóides (clara de ovo, albumina sanguínea, sangue fresco, caseína e leite); II) Substâncias gelatinosas (ágar, osteocolas e ictiocolas) e III) Substâncias minerais (bentonite, terra espanhola e gesso). Vogt et al. (1986) citam que, segundo a lei do vinho de 1971 (Alemanha), as substâncias permitidas para uso na clarificação de vinhos e bebidas similares são, entre outros: ictiocola, gelatina, albumina de ovo de galinha, tanino, terra de diatomáceas, bentonite e enzimas pectinolíticas. Ough (1996) complementa esta lista citando colas como sílica, sparkaloid® (utilizado em vinhos de difíceis clarificação e filtração) e polivinilpirrolidona (PVP).

2.3.1.7 Trásfega

Esta fase consiste na separação das partes sólidas presentes no vinho por sifonação, após a sedimentação de partículas suspensas na bebida fermentada. Esta matéria sólida recebe o nome de borra e é constituída de células de leveduras e bactérias, sais insolúveis e outras matérias insolúveis presentes no mosto. É recomendado fazer três trásfegas na bebida: a primeira trásfega 10 dias decorrentes do final da fermentação lenta; a segunda 30 dias após a primeira e a terceira após os frios de inverno ou tratamento térmico (Rosier, 1993; Rizzon, Zanus e Manfredini, 1994).

Além de auxiliar a filtração e clarificação da bebida, a trásfega impede que haja a formação de compostos depreciadores da bebida, como H₂S (odor de ovo podre) e marcaptanas (C₂H₅SH, odor de alho) (Pato, 1982; Vogt et al., 1986; Hashizume, 1993; Ough, 1996).

2.3.1.8 Filtração

A filtração é uma etapa fundamental na vinificação. É grandemente viabilizada pelos processos de clarificação e colagem, tendo como função tornar o produto final aprazível à visão. Segundo Peleg et al. (1979) e Peynaud (1984), a filtração é um processo mecânico no qual o material particulado fica retido em um meio filtrante e a bebida, límpida, é recuperada sem que haja perda da qualidade organoléptica. Hashizume (1993) cita vários tipos de filtros, como os de terra de diatomáceas e os de placa de celulose. O primeiro é requerido quando de uma turbidez elevada, com grandes partículas em suspensão; já o segundo é utilizado na bebida quase limpa. Os filtros de celulose podem promover uma filtração esterilizante, retendo bactérias e leveduras. Rosier (1993) cita que nas grandes vinícolas, normalmente são feitas duas filtrações, seqüenciais, que favorecem a limpidez. O mesmo autor discorre sobre a necessidade da filtração antes do inverno nas pequenas propriedades. Segundo ele, as precipitações são

favorecidas pelo abaixamento da temperatura e o vinho teria sua estabilidade assegurada quando filtrado depois dos primeiros frios de inverno.

2.3.1.9 Atesto

O atesto tem por finalidade evitar o possível crescimento de microrganismos aeróbios, contaminantes do vinho . Consiste no preenchimento do recipiente, que contém o vinho já em fase de estocagem, com vinho de mesma qualidade. Como normalmente os vinhos são estocados em recipientes de madeira, a evaporação da bebida poderia ocasionar a presença de ar entre o vinho e a tampa do tonel (Hashizume, 1993). Rizzon, Zanus e Manfredini (1994) descrevem este processo como sendo uma prática simples, mas que pode evitar a perda de uma safra inteira nas pequenas cantinas. O atesto impede a formação da chamada doença da flor, que pode levar ao avinagramento da bebida. Esta operação deve ser feita pelo menos uma vez por semana, até o engarrafamento do produto.

2.3.2 Vinificação em tinto e em branco

2.3.2.1 Vinificação em branco

Segundo Cataluña (1988), a vinificação em branco pode ser obtida tanto de uvas brancas quanto de uvas tintas, sendo um processo requerente de anaerobiose, em que deve haver a separação e a depuração do mosto. Villetaz e Dubourdiou (1991) explicam que certos tipos de uvas, como as Muscat e Sylvaner, contêm altas concentrações de pectina em suas cascas, trazendo problemas na fase de prensagem, aumentando o tempo da mesma e trazendo um rendimento, em volume de suco, insatisfatório. Para reduzir o tempo de prensagem e obter um rendimento satisfatório de suco, as substâncias pécticas da uva podem ser hidrolisadas por tratamento enzimático.

Rizzon, Zanus e Manfredini (1994) dizem que a qualidade do mosto é melhor, o que refletirá em um vinho de melhor valor sensorial, nas porções iniciais da prensagem, pois existe um menor contato deste com as matérias tânicas e corantes presentes nas cascas da uva. Citam, ainda, que um dos pontos fundamentais da vinificação em branco é a clarificação do mosto antes de iniciar-se a fermentação, pois mostos límpidos originam vinhos de melhor qualidade que aqueles originados de mostos turvos.

Neste processo, as uvas, após o desengace e esmagamento, são prensadas para a retirada do suco, que é drenado sem as cascas. Se necessário, pode ser feita uma clarificação do suco por congelamento, filtração, centrifugação, ação enzimática (enzimas pectinolíticas, normalmente) ou uma combinação destes fatores (Fleet, 1997).

2.3.2.2 Vinificação em tinto

Wagener (1976) cita que a elaboração de vinho tinto é tão antiga quanto a própria enologia e que a cor e o buquê, característicos desta bebida, são liberados pelas cascas e sementes da uva durante a fermentação, gerando vinhos de qualidade superior.

Neste processo, as uvas são mecanicamente desengaçadas e esmagadas. O suco obtido, juntamente com as partes sólidas do fruto (cascas e sementes), é transferido para um tanque no qual haverá a maceração e uma fermentação inicial (natural ou após inoculação do mosto). Nesta fase há a extração da cor, caracterizada pelos pigmentos antociânicos e outros compostos fenólicos, e das características adstringentes, devidas aos taninos, do vinho tinto (Cataluña, 1988; Fleet, 1997). A fase de maceração, segundo Rizzon, Zanus e Manfredini (1994), é um ponto chave na elaboração de vinhos tintos. Durante este período, as cascas das uvas, menos densas que o mosto, ficam emersas no tanque de fermentação e necessitam ser remontadas, ou seja, submergidas no mosto para

que não haja o avinagramento do vinho por ação das bactérias acéticas. A remontagem deve ocorrer pelo menos três vezes ao dia durante todo o período de maceração. Estes mesmos autores citam que a descuba, separação das fases sólida e líquida após a maceração, deve ser bem conduzida, preferencialmente não seguida da prensagem. Caso esta seja necessária, não deve ser demasiado intensa, pois poderiam ser extraídas substâncias indesejáveis. Na vinificação em tinto esta fase de fermentação secundária, após a separação do mosto da matéria sólida, é chamada lenta ou malolática e ocorre devido à presença de bactérias lácticas, que convertem o ácido málico em ácido láctico, com liberação de CO₂. Guilloux-Benatier, Le Fur e Feuillat (1998) citam que o contato entre as cascas das uvas e o suco, após o esmagamento, mas antes da prensagem, numa fase pré fermentativa, promove a extração de compostos voláteis aromáticos e seus precursores, além de proporcionar melhores condições de crescimento para bactérias do ácido láctico.

2.3.3 Qualidade do vinho

Ratti (1984) descreve quatro fatores como sendo primordiais na elaboração de vinhos de qualidade: o solo ou *terroir*, a variedade da uva ou cultivar, o clima e o Homem. Os três primeiros fatores fornecem a matéria-prima, cabendo ao Homem manipulá-la com excelência. A elaboração de bebidas de qualidade requer cuidados que vão desde o cultivo ideal da matéria-prima (fatores climáticos e de solo), manuseio e higiene no processamento pós-colheita e no processamento dentro da indústria. Rizzon, Zanus e Manfredini (1994) citam que a elaboração de um vinho de qualidade requer, entre outros fatores, uma rigorosa assepsia nos estabelecimentos e equipamentos vinários, a correção adequada do grau alcoólico, o uso de SO₂, colagem, trasfegas e atesto. Guerra (1999) acrescenta que o tipo de vinificação (clássica, maceração carbônica, contínua ou termovinificação) e as condições de estabilização

também são fatores interferentes na qualidade do vinho. Guerra (1999) ressalta, ainda, que a fase que se inicia após a fermentação alcoólica, passando pela fermentação malolática, e vai até a estabilização, é crítica para se obter uma bebida de boa qualidade.

Alguns defeitos e alterações podem estar presentes nos vinhos. Autores como Amerine e Cruess (1960), Pato (1982), Vogt et al. (1986) e Hashizume (1993) mencionam as alterações microbiológicas (principalmente pelas bactérias acéticas) e as químicas (casses) como sendo os principais. O principal microorganismo infectante das uvas, e que pode vir a interferir na qualidade do vinho, é o *Botrytis cinerea*, um fungo filamentoso responsável pela chamada podridão cinza. Este fungo produz uma série de enzimas que atuam sobre a baga da uva (Villettaz e Dubordieu, 1991).

Em relação à qualidade do vinho em nosso país, o Ministério da Agricultura (1988) preconiza limites analíticos máximos e mínimos de algumas substâncias, ou relação entre elas, que podem estar presentes, neste caso, nos vinhos de mesa (Tabela 4).

TABELA 4: Limites analíticos estabelecidos para vinhos de mesa.

Índice	Limite	
	Máximo	Mínimo
Álcool etílico (°GL).....	13,0	10,0
Álcool metílico (g/L).....	0,25	-
Acidez total (meq/L).....	130,0	55,0
Acidez volátil (meq/L).....	20,0	-
Sulfatos totais, em K ₂ SO ₄ (g/L).....	1,0	-
Cloretos totais, em NaCl (g/L).....	0,20	-
Anidrido sulfuroso (SO ₂) total (g/L)	0,35	-
Cinzas (g/L)		
Vinhos comuns:		
Tinto.....	-	1,5
Rosado e branco.....	-	1,3
Vinhos finos e especiais:		
Tinto.....	-	1,5
Rosado e branco.....	-	1,0
Relação álcool em peso/extrato seco reduzido		
Vinhos comuns:		
Tinto.....	4,8	5,2
Rosado.....	6,0	6,5
Branco.....	6,5	6,7
Vinhos finos e especiais:		
Tinto.....	5,2	-
Rosado.....	6,5	-
Branco.....	6,7	-
Açúcares totais (g/L):		
Vinho seco.....	5,0	-
Vinho meio seco.....	20,0	5,1
Vinho suave ou doce.....	-	20,1

Fonte:Ministério da Agricultura. Portaria nº 229, de 25 de outubro de 1988.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERINE, M. A.; CRUESS, W. V. **The technology of winemaking**. Westport: Avi, 1960. 709p.
- ANDRIETA, S. R.; STUPIELLO, J. P. Simulação e modelagem para processos de fermentação alcoólica (I) batelada alimentada. **Stab**, São Paulo, n.5, p.36-40, mai./ago. 1990a.
- ANDRIETA, S. R.; STUPIELLO, J. P. Simulação e modelagem para processos de fermentação alcoólica (II) contínua. **Stab**, São Paulo, n.6, p.45-51, set./dez. 1990b.
- AQUARONE, E. Generalidades sobre bebidas alcoólicas. In: AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. (orgs). 1.ed.4.reimp. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher, 1993. v.5, cap.1. (Série Biotecnologia).
- ARAÚJO, J. P. P. de; SILVA, V. V. **Cajucultura: modernas técnicas de produção**. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 1995. p.23-41.
- BARNETT, J.A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 3.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 1139p.
- BEUCHAT, L. R. Traditional fermented foods. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T.J. (eds). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASP Press, 1997. cap.37.
- BORZANI, W. Fermentação descontínua. In: BORZANI, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. (coords). **Engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. v.3, cap.6. (Série Biotecnologia).
- BRASIL. Decreto n. 2314, de 4 de setembro de 1997. regulamenta a lei nº 8918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, p.19549, 5 de set. 1997.

BRASIL. Lei n. 7678 – 08 out. 1988. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br/leis.asp?lei=7678>>. Acesso em: 09 de fev. de 2001.

BRAZILIANFRUIT. Informações gerais sobre a fruticultura no norte de Minas Gerais. <URL> <http://www.brazilianfruit.com.br/fruticultura.htm>. Arquivo capturado em 02/02/2001.

CALDWELL, D. R. *Microbial physiology and metabolism*. Dubuque: Wm. C. Brown, 1995. 353p.

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

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. *Biotechnologia: manual de microbiologia industrial*. Tradução de Paloma Liras Padín. Zaragoza: Acribia, 1993. 413p. Tradução de: *Biotechnologie – Ierbuch der angewandten mikrobiologie*. 3.ed. München Wien:R. Oldenbourg, 1989.

DEMAIN, A. L. Microbial biotechnology. *TibTech*. [s.l.], v.18, p.26-31, Jan. 2000.

DICKINSON, J. R. Carbon metabolism. In: DICKINSON, J. R.; SCHWEIZER, M. (eds). *The metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae*. United Kingdom: Taylor & Francis, 1999a. cap.2.

DICKINSON, J. R. Nitrogen metabolism. In: DICKINSON, J. R.; SCHWEIZER, M. (eds). *The metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae*. United Kingdom: Taylor & Francis, 1999b. cap.3.

DOIN, P. A. Fermentação contínua. In: BORZANI, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. (coords). *Engenharia bioquímica*. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. v.3, cap.7. (Série Biotecnologia).

DU PLESSIS, C. S. The clarification of juice. *Farming in South Africa*, Pretoria, v.H, n.12, p.1-4, 1977. (Oenological and Viticultural Series).

FERREIRA, L. V.; AMORIM, H. V.; BASSO, L. C. Fermentação de trealose e glicogênio endógenos em *Saccharomyces cerevisiae*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.19, n.1, jan./abr. 1999. Disponível em: <<http://www.scielo.br/cgi.../fbtext?got=last7pid=S0101-20611999000100008&lng=pt&nrm=is>>. Acesso em: 19 de mar. 2001.

- FERREIRA, M. A. M. F. M. **A fermentação malolática**. Vila Real: Instituto Universitário de Trás-os Montes e Alto Douro, 1982. p.1-3.
- FLEET, G. H. Microorganisms in food ecosystems. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.50, n.1/2, p.101-117, Sept. 1999. Special issue.
- FLEET, G. H. Wine . In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (eds.). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASP Press, 1997. cap.37.
- FLEET, G. H. Wine yeasts. In: FLEET, G. H. (ed.). **Wine microbiology and biotechnology**. Switzerland: Harwood, 1993. cap.4.
- FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p.116, 130, 131, 147,148 e 149.
- GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. **Biochemistry**. Florida: Saunders College, 1995. 1100p.
- GERBAUX, V.; MEURGUES, O. Influence du sulfitage et du débourage des moûts sur l'élaboration et la qualité des vins de chardonnay. **Revue des Œnologues**, Paris, n.78, p.15-18, 1995.
- GOMES, R. P. **Fruticultura brasileira**. 11.ed. São Paulo: Nobel, 1985. 446p.
- GRASSIN, C.; FAUQUEMBERGUE, P. Wine. In: GODFREY, T.; WEST, S. (eds). **Industrial enzymology**.2.ed. Great Britain: Macmillan Press, 1996. cap.2.22.
- GUERRA, C. C. Evolução polifenólica: longevidade e qualidade dos vinhos tintos finos. In: SEMINÁRIO FRANCO-BRASILEIRO DE VITICULTURA, ENOLOGIA E GASTRONOMIA, 1998, Bento Gonçalves. **Anais ... Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPV**, 1999. p.55-65.
- GUILLOUX-BENATIER, M.; LE FUR, Y.; FEUILLAT, M. influence of fatty acids on the growth of wine microorganisms *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v.20, n.2, p.144-149, Feb. 1998.
- HARRISON, D. E. F. Mixed cultures in industrial fermentation processes. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v.24, p.129-164, 1978.

- HASHIZUME, T. Fundamentos de tecnologia do vinho. In: AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. (coords.). **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher, 1993. v.5, cap.2. (Série Biotecnologia).
- HENICK-KLING, T.; PARK, Y. H. Considerations for the use of yeast and bacterial starter cultures: SO₂ and time of inoculation. **American Journal Enology and Viticulture**, Davis, v.45, n.4, p.464-469, Oct./Dec. 1994. (Technical brief).
- KUNKEE, R. E.; BISSON, L.F. Wine making yeasts. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The yeasts: yeast technology**. 2.ed. London: Academic Press, 1993. v.5, cap.3.
- KUNKEE, R. E.; GOSWELL, R.W. Table wines. In: ROSE, A. H. (ed.). **Alcoholic beverages**. London: Academic Press, 1977. v.1, cap.4. (Economic Microbiology series).
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W (eds). **The yeasts: a taxonomic study**. 4.ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. p.79.
- LEE, B. H. **Fundamentals of food biotechnology**. New York: VCH, 1996. 431p. (Food Science and Technology Series).
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of biochemistry**. 3.ed. Worth, 2000. 1152p.
- LIMA, U. A. (coord.). **Agroindustrialização de frutas**. Piracicaba: FEALQ, 1998. v.5, 151p. (Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz).
- MENDONÇA, A. T. **Identificação e estudo das características fisiológicas de *Saccharomyces cerevisiae* presentes em fermentação espontânea de cana-de-açúcar**. Lavras: UFLA, 1999. 69p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v.31, n.2, p.426-428, Mar. 1959.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. **Estatísticas agrárias**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/spa/Pagespa/Index.html>>. Acesso em: 31 de jan. 2001a.

- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. **Fruticultura:** programa de desenvolvimento da fruticultura. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br/dfpv/fruticultura.htm>>. Acesso em: 31 de jan. 2001b.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Portaria n. 229, de 25 de outubro de 1988. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, p.20948-20950, 31 mai. 1988.
- MURAYAMA, S. **Fruticultura**. 2.ed. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1973. 428p.
- OUGH, C. S. **Tratado básico de enología**. Tradução de Concepción Llaguno Marchena e María Dolores Cabezado Ibañes. Zaragoza: Acribia, 1996. 294p. Tradução de: Winemaking basics. New York: Haworth Press, 1992.
- PALACIOS, S.; VASSEROT, Y.; MAUJEAN, A. Evidence for sulfur volatile products adsorption by yeast lees. **American Journal Enology and Viticulture**, Davis, v.48, n.4, p.525-526, Oct./Dec. 1997. (Technical brief).
- PANETTA, J. C. Qual o futuro da fruticultura brasileira? **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.74, p.3, jul. 2000.
- PATO, O. **O vinho: sua preparação e conservação**. 7 ed. Lisboa: Livraria Clássica Editora, 1982. 433 p. (Coleção Técnica Agrária).
- PELEG, Y.; BROWN, R. C.; STARCEVICH, P. W.; ASHER, R. Method for evaluating the filterability of wine and similar fluids. In: **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.30, n.3, p.174-178, July/Sept. 1979.
- PEYNAUD, E. **Enología práctica: conocimiento y elaboración del vino**. Tradução de Alfredo Gonzáles Salgueiro. Madrid: Mundi-Prensa, 1984. 405p. Tradução de: Connaissance et travail du vin.
- PINAL, L.; CEDENÓ, M.; GUTIÉRREZ, H.; ALVAREZ-JACOB, J. Fermentation parameters influencing higher alcohol production in the tequila process. **Biotechnology Letters**, Kew, v.19, n.1, p.45-47, Jan. 1997.
- POLLONIO, M. A. R. Alimentos funcionais: as recentes tendências e os aspectos de segurança envolvidos no consumo. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.74, p.26-31, jul. 2000.

- RATTI, R. **Como degustar os vinhos: manual do degustador.** Tradução de Eudal João Garbin. Bento Gonçalves: AEB, 1984. 129p. Tradução de: *Como gustare i vini.* Bréscia: AEB, 1981.
- REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W. Technology of yeast usage in wine making. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.39, n.1, p.83-90, Jan./Mar. 1988.
- REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W. **Yeast technology.** 2.ed. New York: Avi, 1991. 454p.
- RIBÉREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E. **Traité d'œnologie: maturation du raisin, fermentation alcoolique, vinification.** t.1. Paris: Béranger, 1964. 753p.
- RIZZON, L. A.; MANFROI, V.; MENEGUZZO, J. **Elaboração de suco de uva na propriedade vitícola.** Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 1998. 24p. (EMBRAPA Uva e Vinho. Documentos, 21).
- RIZZON, L. A.; ZANUS, M. C.; MANFREDINI, S. **Como elaborar vinho de qualidade na pequena propriedade.** Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPUV, 1994. 36p. (EMBRAPA-CNPUV. Documentos, 12).
- ROSE, A. H. History and scientific basis of alcoholic beverage production. In: ROSE, A. H (ed.). **Alcoholic beverages.** London: Academic Press, 1977. v.1, cap.1. (Economic Microbiology series).
- ROSIER, J. P. **Manual de elaboração de vinho para pequenas cantinas.** Videira: EPAGRI, 1993. 72p.
- SALUNKHE, D.K.; DESAI, B.B. **Postharvest biotechnology of fruits.** Boca Raton: CRC Press, 1984. v.1, 168p. Cap.7: Small fruits – grapes, p. 95-110.
- SALWAY, J. G. **Metabolism at a glance.** Oxford: Blackwell Scientific, 1994. p.58-59.
- SCHWAN, R. F.; ROSE, A. H. Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. **Journal of Applied Bacteriology**, Glasgow, v.76, n.1, p.62-67, Jan. 1994.
- SILVA, C. A. B. **Produção de aguardente.** Viçosa: FUNBRAE, 1995. v.4, 34p.
- SILVA, T. das G. **Diagnóstico vitivinícola do sul de Minas Gerais.** Lavras: UFLA, 1998. 196 p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia).

- SOCIEDADE BRASILEIRA DE FRUTICULTURA – SBF. **Estatísticas: exportações de frutas.** Disponível em: <<http://www.asbyte.com.br/sbfruti/historia3.htm>>. Acesso em: 31 de jan. 2001.
- STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology.** 2.ed. Great Britain: Pergamon, 1995. 357p.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, C. L. **Microbiology: an introduction.** 6.ed. California: Benjamin Cummings, 1998. 832p.
- VILLETAZ, J. C.; DUBOURDIEU, D. Enzymes in winemaking. In: FOX, P. F. **Food enzymology.** London: Elsevier, 1991. v.1, cap.11.
- VOGT, E.; JAKOB, L.; LEMPERLE, E.; WEISS, E. **El vino: obtención, elaboración y análisis.** Tradução de Jaime Esain Escobar. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1986. 294p. Tradução de: Der Wein: bereitung, behandlung, untersuchung. 9 ed. Stuttgart: Eugen Ulmer, 1984.
- WAGENER, G. W. W. Preparation of different types of wines: red wines. **Farming in South Africa.** Pretoria, v.H, n.4, 1976. (Oenological and Viticultural Series).
- WALKER, G. M. **Yeast physiology and biotechnology.** Chichester: Wiley, 1998. 350p.
- WARD, O. P. **Biotechnology de la fermentacion: principios, procesos e productos.** Tradução de Miguel Calvo Rebollar e Emilia Sevillano Calvo. Zaragoza: Acribia, 1991, 265p. Tradução de: Fermentation Biotechnology. Canada: Open University Press, 1989.

CAPÍTULO 2

SELEÇÃO DE LEVEDURAS PARA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO MOSTO DE FRUTAS TROPICAIS

1 RESUMO

DIAS, Disney Ribeiro. **Seleção de leveduras para fermentação alcoólica do mosto de frutas tropicais**. Lavras: UFLA, 2001. 130p. (Dissertação – Mestrado em Ciência dos Alimentos)*.

A seleção de leveduras para fermentação alcoólica em meio sintético foi o objetivo deste trabalho. Neste aspecto, foram utilizadas três estirpes de levedura *Saccharomyces cerevisiae* no experimento, sendo duas comerciais e uma selvagem, isolada de cana-de-açúcar, codificadas respectivamente como Sc₁, Sc₂ e Sc₃. As três leveduras foram submetidas a crescimento nas temperaturas 18 °C, 22 °C e 25 °C, em meio MF (Schwan e Rose, 1994). Utilizou-se o sistema fermentativo em batelada simples, com reciclo do meio de cultivo a cada 24 horas, perfazendo um tempo total de 56 horas para cada uma das temperaturas avaliadas. Foram coletadas amostras a cada 4 horas no primeiro dia e a cada 6 horas nos dois dias seguintes do experimento. Em cada amostra coletada foram feitas as seguintes análises: contagem do número de células viáveis; determinação do peso seco; açúcares redutores pelo método de DNS; etanol e glicerol, por cromatografia líquida de alta eficiência. A análise estatística utilizada foi o sistema rotacional de superfície de resposta, a partir do programa Statistica para Windows. De acordo com os resultados obtidos a partir da análise estatística, não foram evidenciadas diferenças significativas, entre as leveduras, quanto à produção de etanol e glicerol em função da biomassa correspondente. Foi observado, entretanto, que na temperatura de 22 °C as leveduras apresentaram os valores mais altos da relação etanol/biomassa e glicerol/biomassa. A partir disso, 22 °C foi definida como a melhor temperatura para condução da fermentação.

* Comitê Orientador: Rosane Freitas Schwan - UFLA (Orientadora), Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA e Luiz Carlos Oliveira Lima - UFLA

2 ABSTRACT

DIAS, Disney Ribeiro. Screening of yeast strains for alcoholic fermentation of tropical fruits must. Lavras: UFLA, 2001. 130p. (Dissertation – Master Program in Food Science) *

The aim of this work was the selection of *Saccharomyces cerevisiae* strain for alcoholic fermentation in synthetic medium submitted at different temperatures. Three strains of *Saccharomyces cerevisiae* were used: a wild isolate from a sugar cane fermentation and two commercial varieties. They were codified respectively as Sc₁, Sc₂ and Sc₃. The first objective consisted of selection of the yeast after growth at different temperatures (18° C, 22° C and 25° C) in MF medium (Schwan and Rose, 1994). A batch system was used with one recycle every 24 hours for a total of 56 hours for each temperatures tested. Samples were collected after 4 hours during the first day and every 6 hours subsequently. All samples were analysed for viable count; dry weight, reducing sugars (DNS); ethanol and glycerol by HPLC. No significant differences were found among the yeasts tested in relation to ethanol and glycerol concentrations using the rotational system of surface response. However at 22° C the overall fermentation rate was better and this temperature was used for the following experiments to make the final alcoholic beverage.

* Guidance Committee: Rosane Freitas Schwan - UFLA (Major Professor), Eliana Pinheiro de Carvalho-UFLA and Luiz Carlos Oliveira Lima - UFLA

3 INTRODUÇÃO

Quando da ocorrência da fermentação espontânea no mosto de uvas para obtenção do vinho, vários são os microrganismos componentes da microbiota fermentativa e cada um, a seu tempo, desempenha uma função ímpar na bebida acabada, seja uma melhora (*e.g.* formação de etanol, glicerol e componentes secundários do aroma, fermentação malolática), seja uma piora (*e.g.* excesso de ácido acético, formação de H₂S e mercaptanas). Uma das funções de se trabalhar com um inóculo selecionado ou industrializado é que fatores depreciantes do produto final foram estudados de forma a serem reduzidos ao máximo.

Vários fatores são levados em conta quando da seleção de um determinado microrganismo, neste caso leveduras, para que este seja submetido à fermentação de um substrato que originará um produto comercial. Dentro destes fatores podem ser citados a taxa de crescimento celular, correlacionada à produção de biomassa; a viabilidade do microrganismo durante o processo; a estabilidade do mesmo ante à diversidade do meio a fermentar e o rendimento de metabólitos de interesse, produzidos pelo microrganismo, a partir do substrato inicial.

Um outro fator do microambiente ao qual está sujeito a levedura e que é extremamente relevante, em um processo fermentativo, é a temperatura na qual a relação metabólito formado por substrato de partida seja a maior possível. A depender da temperatura, um mesmo microrganismo consome uma mesma quantidade de substrato de partida num tempo até dez vezes menor. Um exemplo pode ser tomado no caso da produção de aguardente, cuja fermentação ocorre durante 24 h, a um temperatura média de 32 °C, e da produção do vinho branco, cuja fermentação ocorre em até 10 dias, numa temperatura entre 18 °C e 20 °C.

Frente a isto foram testadas, neste trabalho, três estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* para observar qual delas, e a que temperatura, dentre três testadas, proporcionaria um maior rendimento de etanol e glicerol, em função da biomassa, durante três dias de fermentação em sistema de batelada simples com reciclo do substrato a cada 24 horas.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Metabolismo microbiano

O crescimento microbiano pode ser dividido em quatro sequenciais e distintas fases metabólicas, conhecidas como fase lag, fase exponencial, fase estacionária e fase de morte (Rose, 1978; Dawes e Sutherland, 1992; Griffin, 1994; Walker, 1998). Walker (1998) cita mais duas fases na curva de crescimento: a fase de aceleração, entre as fases lag e exponencial, e a fase de desaceleração, entre as fases exponencial e estacionária.

Para a utilização industrial, os produtos do metabolismo microbiano podem ser agregados em dois distintos grupos: os metabólitos primários, oriundos da tropofase, e os metabólitos secundários, obtidos na idiofase. Dentro dos produtos do metabolismo primário, incluem-se substâncias provenientes das vias de anabolismo (como ácidos nucleicos, proteínas, polissacarídeos, lipídeos e vitaminas) e das vias de catabolismo (etanol, ácido láctico, acetona e butanol), que são geradas, predominantemente, durante a fase exponencial de crescimento (Rose, 1978). Os metabólitos primários são essenciais à manutenção da atividade celular por serem precursores de macromoléculas ou atuarem como reserva energética. São derivados de compostos carbonados (carboidratos) e nitrogenados (aminoácidos) que são assimilados pelos microrganismos como fontes de nutrientes (Ward, 1991). Os produtos do metabolismo secundário têm sua origem no final da fase exponencial e predominam durante a fase estacionária. Os principais metabólitos secundários para a indústria são os antibióticos (penicilinas, aminoglicosídicos, tetraciclinas e macrolídeos) e o ácido giberélico. Toxinas bacterianas e micotoxinas também são formados durante o metabolismo secundário (Rose, 1979). Demain (2000) cita, ainda, os biopesticidas e fatores de crescimento animal como metabólitos secundários de

interesse. Este autor descreve que a produção industrial de metabólitos secundários é extremamente importante para a economia e comenta que, em 1996, o mercado mundial de antibióticos movimentou cerca de 23 bilhões de dólares.

A grande maioria dos produtos do metabolismo secundário não desempenha uma função essencial para o anabolismo microbiano. No caso dos antibióticos, estes conferem uma proteção ao microrganismo produtor por inibirem o crescimento de outros organismos que poderiam competir por uma fonte nutricional comum. Os metabólitos secundários são, estruturalmente, derivados dos produtos do metabolismo primário (Ward, 1991; Demain, 2000). Fuge e Werner-Washburne (1997) descrevem que na fase estacionária as células encontram-se em uma condição metabólica denominada *quiescence* (quietude ou latência). Neste estado, as células têm a capacidade de divisão celular cessada, podendo voltar a multiplicar-se novamente em função das condições do meio (um processo chamado de re proliferação celular).

4.1.1 Fermentação alcoólica

Uma das formas de ocorrer a fermentação alcoólica parte da degradação de substratos orgânicos carbonados, através da qual cada molécula destes originará duas de ácido pirúvico e quatro de ATP. Nesta reação, as duas moléculas de piruvato são convertidas em duas moléculas de acetaldeído e duas de dióxido de carbono por ação da piruvato descarboxilase, que promove uma descarboxilação simples e não envolve a oxidação do piruvato. A piruvato descarboxilase requer o cátion Mg^{2+} e tem como coenzima a tiamina pirofosfato. Em um segundo passo, o acetaldeído é reduzido a etanol por ação da enzima álcool desidrogenase, tendo o NADH (derivado da atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, quando utilizada a via glicolítica) como fornecedor de elétrons. A piruvato descarboxilase é característica de muitas leveduras, em

especial as do gênero *Saccharomyces*, sendo grandes responsáveis pela produção de bebidas alcoólicas e de produtos de panificação (Rose, 1977 e 1978; Vogt et al., 1986; Madigan, Martinko e Parker, 1995; Tortora, Funke e Case 1998). A equação geral da fermentação alcoólica é dada a seguir.

Gancedo e Serrano (1989) detalharam o metabolismo de carboidratos por leveduras, atentando para a preferência das mesmas pelas unidades monoméricas destes compostos. Hammond (1993) complementa que gênero *Saccharomyces* pode utilizar mais de uma fonte de carbono para proceder à fermentação alcoólica, como maltotriose, sacarose, galactose, maltose, frutose e glicose. Gancedo (1998) relata que, dentre estas fontes carbonadas, glicose e frutose são os preferidos. Dentre estes dois, segundo Öscan e Johnston (1999), a glicose é o metabólito de escolha pela grande maioria das células, sendo considerado um hormônio do crescimento celular.

Lima, Aquarone e Borzani (1992) descrevem a existência de 3 fases distintas durante o processo de fermentação de um mosto, sendo:

- Fase Preliminar: ao entrarem em contato com o mosto, os levedos iniciam uma intensa multiplicação celular, com pequenos aquecimentos e pequenos desprendimentos de CO₂ por um período de 4h a 6h,

- Fase Tumultuosa: há um desprendimento intenso de CO₂, indicando desdobramento dos açúcares fermentescíveis do mosto pelas numerosas células de leveduras. Há aumento da temperatura, elevação do teor de álcool e da acidez. Parece estar em ebulição. Ocorre por 12h a 16h, e

- Fase Complementar: leva de 4h a 6h para completar-se, o desprendimento de CO₂ é mínimo, com abaixamento da temperatura. A concentração de açúcares chega ao fim.] Kunkee e Bisson (1993) descreveram, também, estas 3 fases, associando-as à curva de crescimento de leveduras. A

fase preliminar corresponderia à fase lag de crescimento, a fase tumultuosa associar-se-ia à fase logarítmica ou exponencial e a fase complementar representaria a fase estacionária do crescimento.

4.1.2 Produtos originados da fermentação

Quando sob condições anaeróbias, as leveduras cessam sua multiplicação e reverterem seu metabolismo para a formação de compostos orgânicos passíveis de armazenamento de energia. A indução da formação de alguns destes compostos é a base da biotecnologia para a obtenção de produtos de interesse industrial. No caso de bebidas alcoólicas, não só o etanol, mas substâncias como glicerol, ésteres (acetato de etila, acetato de metila), álcoois superiores ou fúseis (isoamílico, 2-metil-1-propanol, amílico), entre outros, são responsáveis pela formação do aroma ou buquê que caracterizam o produto final (Lehtonen e Suomalainen, 1977; Watson, 1993; Lurton et al., 1995). A Figura 1 apresenta algumas vias de formação de compostos a partir da fermentação.

4.1.2.1 Etanol

O etanol ou álcool etílico é um dos principais metabólitos primários de interesse industrial, seja na produção de bebida alcoólica, seja para produção de combustível (Rose, 1978; Glazer e Nikaido, 1995). Este composto é formado a partir da clássica via de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ou via glicolítica, sob condições de anaerobiose. A partir de monossacarídeos (glicose, frutose, manose), basicamente, as células produzem piruvato sob a ação de várias enzimas em várias reações (Figura 1). O piruvato, então, é convertido em acetaldeído por ação da enzima piruvato descarboxilase (4.1.1.1). O acetaldeído é o substrato da enzima álcool desidrogenase (1.1.1.1) que, reduzido, forma a molécula de etanol, regenerando o NAD^+ (Rose, 1977; Berry e Brown, 1987; Ward, 1991; Stanbury, Whitaker e Hall, 1995).

Na biossíntese de etanol são empregadas linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*. É importante que a cultura de levedura possua um crescimento vigoroso e uma elevada tolerância ao etanol, apresentando um bom rendimento final. O etanol torna-se inibidor a altas concentrações, e a tolerância das leveduras é um ponto crítico para uma produção elevada deste metabólito primário. A tolerância ao etanol varia consideravelmente de acordo com as linhagens de leveduras. De modo geral, o crescimento cessa quando a produção atinge 5% de etanol (v/v), e a taxa de produção é reduzida a zero, na concentração de 6% a 10% de etanol (v/v). Uma das ações do etanol é desestruturar a fração lipídica da membrana celular (Ward, 1991; Kunkee e Bisson, 1993).

4.1.2.2 Glicerol

O glicerol, propanotriol ou glicerina, é um poliálcool formado na via glicolítica, ou via de Embden-Meyerhof-Parnas, pela grande maioria dos microrganismos fermentadores. De uma maneira simplificada, a molécula de glicerol resulta da redução e desfosforilação da diidroxiketona-fosfato, originada da cisão da molécula de frutose1,6-bifosfato pela enzima aldolase (Rose, 1978; Vogt et al., 1984; Berry e Brown, 1987; Lehninger, Nelson e Cox, 2000).

Um dos aspectos interessantes da produção de glicerol é que ele está envolvido com a regulação da produção de etanol (Figura 1). Em condições normais de crescimento, a maioria da glicose assimilada por *Saccharomyces cerevisiae* é convertida em etanol. Neste processo, o NAD⁺ é primeiramente reduzido a NADH, que será reoxidado durante a redução do acetaldeído para formação de etanol. Uma pequena porção de NADH é desviada e usada na redução da diidroxiketona-fosfato a glicerol-fosfato, o qual é desfosforilado e gera glicerol. Por um mecanismo de retroalimentação, devido ao excesso de etanol, pode haver um desvio de rota e o NADH formado será utilizado para

formação de glicerol, ao invés de etanol. Nos casos de fermentação controlada, nos quais são utilizados derivados de enxofre, estes podem ligar-se ao acetaldeído e formar complexos que não reagirão com o NADH. Conseqüentemente, este NADH não formará etanol e será utilizado na síntese de glicerol, a qual, conseqüentemente, aumentará (Spencer e Spencer, 1978; Berry e Brown, 1987; Myers, Lawlor e Attifield, 1997; Flikweert, Dijken e Pronk, 1997; Remize et al., 1999).

Rose (1978) relata um experimento conduzido por Neuberg e Reinfurth em 1918, em que estes autores descobriram que a adição de enxofre num meio rico em açúcar, fermentado por *Saccharomyces cerevisiae*, induzia a formação de glicerol como metabólito principal, ao invés de etanol e dióxido de carbono, como normalmente ocorre na fermentação alcoólica. Neuberg caracterizou este processo como "segunda forma de fermentação", que é baseada na capacidade que o íon sulfato tem de ligar-se ao acetaldeído e, assim, bloquear as reações de regeneração do NAD^+ . Este NAD^+ será, então, regenerado durante a redução da diidroxiketona-fosfato a glicerol 3-fosfato que, por hidrólise, gera o glicerol.

Bisson, Dauny e Bertrand (1980) relatam a existência de uma relação direta entre a elevação de temperatura e o aumento da produção de poliálcoois. Gardner, Rodrigue e Champagne (1993) citam que, além dos compostos sulfurados, a elevada temperatura de incubação e o aumento na taxa de açúcar no meio fermentativo são fatores que podem elevar a produção de glicerol por leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Myers, Lawlor e Attfield (1997) complementam que um dos pré-requisitos para uma cepa de levedura poder fermentar em condições de hiperosmolaridade, devido à alta concentração de açúcares no meio, é a capacidade do microrganismo em sintetizar e reter mais glicerol intracelular. Flikweert, Dijken e Pronk (1997) e Ciani, Ferraro e Fatichenti (2000) mencionam a limitação de oxigênio no ambiente fermentativo

como um possível fator de grande importância para a ativação das enzimas que atuam na síntese de glicerol.

4.1.2.3 Compostos formadores de aroma

Os compostos organolépticos formados durante a fermentação podem ser representados por cinco classes: álcoois superiores ou fúseis, ésteres, aldeídos e cetonas, compostos sulfurados e ácidos orgânicos (Tabela 1). A concentração e a diversidade de formação destes compostos variará tanto com o microrganismo fermentador quanto com o substrato a ser fermentado, fazendo com que cada bebida tenha sua identidade. A quantidade de açúcares fermentescíveis e de fontes nitrogenadas também é significativa, principalmente para a formação dos álcoois (Beech e Carr, 1977; Berry e Watson, 1987; Rapp e Versini, 1991).

Beech (1993) faz menção ao tipo de sistema no qual a fermentação é conduzida, contínuo ou batelada. A condução da fermentação pode influenciar as quantidades de compostos fúseis na bebida, sendo as mesmas superiores quando do uso de batelada. A formação dos compostos organolépticos pode, segundo Ough (1996), seguir várias rotas bioquímicas, sendo normalmente formados a partir de aminoácidos ou por reações de transaminação.

Martineau e Henick-Kling (1995) e Romano e Suzzi (1996) comentam sobre a formação e a importância de acetoina e diacetil (2,3-butenodiona), sendo o primeiro responsável pela formação do segundo, que é um importante componente formador de aroma em vinho.

Maicas et al. (1999) citam que a formação dos compostos organolépticos também pode ser derivada de carboidratos, através do metabolismo do piruvato (Figura 1).

TABELA 1 Componentes organolépticos e seu limiar de sensibilidade

Compostos	Limite de sensibilidade (ppm)
<i>Álcoois Superiores</i>	
1-propanol	800
1-butanol	450
2-metilpropanol (Isobutanol)	200
2-metilbutanol (Amílico)	65
3-metilbutanol (Isoamílico)	70
<i>Ácidos</i>	
Acético	175
Propiônico	150
Butírico	2,2
Lático	400
<i>Ésteres</i>	
Acetato de etila	33
Butirato de etila	0,4
Lactato de etila	250
<i>Aldeídos e Cetonas</i>	
Acetaldeído	25
Acetona	200
Diacetil	0,15
<i>Compostos sulfurados</i>	
Dimetilssulfito (mercaptana)	50

Fonte: Berry e Watson, 1997.

4.1.3 Carboidratos de reserva

As leveduras são capazes de armazenar carboidratos em duas formas distintas: glicogênio (homopolissacarídeo de glicose) e trealose (homodímero de glicose). Estes carboidratos podem chegar a 40% do massa seca celular. Normalmente, os níveis de glicogênio são superiores aos de trealose quando as células estão em crescimento. Em relação à presença de oxigênio, os níveis de trealose são maiores na aerobiose. Também são maiores quando a célula está em condições de estresse. A trealose está associada à formação de ascósporos. As vias biossintéticas de trealose e glicogênio são semelhantes, podendo, ambas, ser sintetizadas a partir de UDP-glicose (Figura 1). Quando em condições de

estresse (temperatura, osmolaridade, catabólitos) ou falta de nutrientes, as leveduras fazem uso destas reservas para manter seu metabolismo basal, retomando seu ciclo celular quando as adversidades do ambiente são cessadas (Lillie e Pringle, 1980; Berry e Brown, 1987; Panek, 1991; Alcarde e Basso, 1997; Hounsa et al., 1998; Silljé et al., 1999). Ferreira, Amorin e Basso (1999), observaram que a fermentação de glicogênio e trealose endógenos, em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, pode formar até 68 litros de etanol por tonelada de levedura seca. Esta fermentação endógena é uma das formas utilizadas para a manutenção da viabilidade celular.

A molécula de glicogênio tem sua biossíntese promovida, principalmente, por duas enzimas. Uma delas, a glicogênio sintetase (E.C. 2.4.1.11), é responsável pelas ligações α -(1→4) entre os monômeros de glicose, promovendo a elongação linear da cadeia. A outra enzima, glicosil-(4→6)-transferase ou enzima ramificadora do glicogênio (E.C. 2.4.1.18), é responsável pela formação das ramificações glicosídicas α -(1→6) a partir da cadeia linear (Farkaš, 1989; Walker, 1998). Na degradação do glicogênio, outras duas enzimas estão envolvidas. A fosforilase do glicogênio (E.C. 2.4.1.1) catalisa a transferência de grupamentos fosfato para as unidades não redutoras α -(1→4) de glicosil e libera glicose 1-fosfato. Esta estrutura pode sofrer ação da fosfoglicomutase (E.C. 2.7.5.1) e ser convertida em glicose 6-fosfato, um importante metabólito da via glicolítica. A fosforilase não atua nas ligações α -(1→6). Uma outra enzima, a α -(1→6) glicosidase, atua nas ramificações das frações de glicogênio originadas pela ação da fosforilase, liberando glicose (Berry e Brown, 1987; Farkaš, 1989; Salway, 1994; Stryer, 1996).

A formação de trealose ocorre a partir da ação da enzima trealose 6-fosfato sintetase sobre a glicose 6-fosfato e UDP-glicose, formando trealose 6-fosfato. Por ação de fosfatases, a trealose 6-fosfato é convertida em trealose, cujas moléculas de glicose estão ligadas por ligações glicosídicas do tipo α -

(1→1). A degradação da trealose, liberando duas moléculas de glicose, ocorre pela ação de trealases presentes no citosol (pH neutro) e no vacúolo (pH ácido) (Berry e Brown, 1987; Panek, 1991; Walker, 1998; Plourde-Owobi et al., 2000).

4.2 Inóculo

Segundo Colagrande, Silva e Fumi (1994), culturas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* têm recebido uma atenção especial por apresentarem qualidades, principalmente na prática enológica, que normalmente estão presentes nos outros processos de fermentação. Algumas características desejáveis envolvem: rápida iniciação da fermentação; eficiente conversão de açúcares fermentescíveis a etanol; manutenção por toda a fermentação; apresentar certa tolerância ao etanol; retenção da viabilidade durante a estocagem; resistência ao dióxido de enxofre; produção de um fator *killer*; formação de componentes do buquê e capacidade de floculação. Apresenta algumas características indesejáveis, como produzir derivados sulfitados ou mercaptanas; superproduzir acetaldeído, ácido acético e álcoois superiores; capacidade de formar espuma e produção de uréia, a qual pode ser convertida a carbamato de etila, que é um agente tóxico.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Leveduras utilizadas e preparo do inóculo

Três estirpes de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, codificadas como Sc₁, Sc₂ e Sc₃, foram testadas quanto ao potencial fermentativo a diferentes temperaturas. Duas delas, Sc₁ e Sc₂, são leveduras produzidas industrialmente e comercializadas, na forma liofilizada, para a produção de vinhos. Sc₃ é uma estirpe isolada de um alambique da região de Lavras, MG, e é parte integrante da coleção de leveduras do Laboratório de Microbiologia (DBI/UFLA), onde foi identificada. O processo de fermentação foi iniciado com inóculo cuja população era próxima de 10^7 células viáveis·mL⁻¹.

Para atingir esta população inicial, as leveduras foram primeiramente purificadas. Cerca de 5,5 mg das amostras de Sc₁ e Sc₂ foram retiradas da embalagem e ressuspendidas em 2,0 mL de meio YW (em g·L⁻¹: extrato de levedura, 3,0; extrato de malte, 3,0; peptona universal, 5,0 e glicose, 10,0) líquido a pH 3,5. A levedura Sc₃ também foi inoculada neste meio, partindo-se de uma alíquota da cultura pura, estocada em glicerol a 15% (Kurtzman e Fell, 1998), a -20 °C, em congelador. Depois de incubadas a 30 °C por 24 h, uma alíquota de cada uma das leveduras foi transferida para placas de Petri com meio YW a pH 3,5 e adicionado, o meio, de ampicilina a 30 µL·L⁻¹ (30 ppm) como agente bactericida. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 h. Das culturas purificadas, tomou-se uma alíquota para iniciar a formação do inóculo. Nesta fase, as leveduras cresceram em 120 mL, em frascos Erlenmeyer, de meio MF (Schwan e Rose, 1994), constituído de (em g·L⁻¹): glicose, 10,0; KH₂PO₄, 4,5; (NH₄)₂SO₄, 3,0; extrato de levedura 1,0; MgSO₄·7H₂O, 0,250 e CaCl₂, 0,250; pH ajustado para 5,0 com HCl 0,1M e esterilizado a 121 °C por 15 min.

As leveduras foram incubadas em estufa, provida de agitador orbital, a 28 °C e 30 rpm. O meio foi renovado a cada 24 h (o meio contido nos frascos foi decantado e novo meio estéril foi adicionado) até que a população de 10^7 células viáveis·mL⁻¹, verificada por contagem em câmara de Neubauer, fosse atingida.

5.2 Condições de cultivo

Após atingir a população inicial de aproximadamente 10^7 células viáveis por mL, as amostras, em duplicata, foram cultivadas em incubadora B.O.D. sob três diferentes temperaturas, a saber: 18 °C, 22 °C e 25 °C. Foram utilizados frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, adicionados de 120 mL de meio MF. A fermentação ocorreu em sistema de batelada simples, com renovação do meio a cada 24 h (tempo suficiente para consumo da glicose), durante três dias consecutivos. O consumo de glicose foi acompanhado utilizando-se o método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), segundo Miller (1959).

O experimento iniciou-se à temperatura de 18 °C, sendo conduzido por três dias. Após o terceiro dia nesta temperatura, ou seja, final da fase experimental, as leveduras foram aclimatadas a 22 °C, por 2 horas, e o processo a esta temperatura foi iniciado com a renovação do meio. Ao final do terceiro dia a 22 °C, procedeu-se como anteriormente citado, para 18 °C, e iniciaram-se os testes a 25 °C.

A renovação do meio e a coleta das amostras ocorreram sob condições de assepsia.

5.3 Análises durante o processo fermentativo

Durante o experimento, foram coletadas amostras, em cada temperatura, para realização de testes químicos e microbiológicos. As amostras foram coletadas da seguinte maneira:

- 1º dia: coleta a cada intervalo de 4 horas.

•2º e 3º dias: coletas a cada intervalo de 6 horas.

Cada uma das amostras, homogeneizada por agitação dos frascos, teve quatro volumes de 1,0 mL tomados e armazenados em tubos tipo eppendorff. Os tubos foram rotulados da seguinte maneira:

- Viabilidade
- Biomassa
- Análises químicas

Os testes microbiológicos foram realizados no momento da coleta. Os tubos referentes à viabilidade foram utilizados para a contagem do número de células viáveis. Os outros três tubos (1 de biomassa e 2 de análises químicas) foram centrifugados a 11000 rpm por 5 min, em centrífuga da marca Jouan, modelo A14. Foram pipetados 500 µL do sobrenadante e adicionados a novos tubos eppendorff, então armazenados em congelador a -20 °C, para análises químicas subsequentes. Os tubos denominados biomassa tiveram o restante do sobrenadante desprezado, restando-lhes o sedimento ou biomassa. A análise de açúcares redutores totais (pelo método do DNS) foi realizada na penúltima coleta de cada dia. As demais análises químicas foram realizadas posteriormente, por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência).

A Figura 2 representa o fluxograma desta fase do experimento.

5.3.1 Análises químicas

As amostras foram analisadas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) quanto aos teores (em g·L⁻¹) de etanol, metanol, glicerol, sacarose, glicose e frutose. A metodologia utilizada foi modificada a partir de Schwan et al. (2001). Foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu, modelo LC-10Ai (Shimadzu Corp., Japão), equipado com detectores de índice de refração, modelo RID-10A, e de ultravioleta, modelo SPD-10Ai. A coluna utilizada foi o modelo Shim-pack SCR-101H (Shimadzu), operando à temperatura ambiente. O

fluxo foi de $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, tendo como eluente uma solução de ácido sulfúrico a $0,025 \text{ N}$. A quantificação foi realizada a partir da comparação com curvas de calibração, determinadas utilizando padrões certificados da marca Supelco.

Para as análises cromatográficas, as amostras foram tratadas do seguinte modo: retiradas do congelador a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ e colocadas em refrigerador a $8 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h. Aproximadamente 4 h antes da análise em CLAE, foram colocadas à temperatura ambiente. Depois de estabilizada a temperatura, as amostras foram diluídas 100 vezes, em água mili-Q, e filtradas em membrana ultrafiltrante (nitrato-celulose) de porosidade $0,20 \text{ }\mu\text{m}$, marca Sartorius. Foram utilizados $20 \text{ }\mu\text{L}$ da amostra para a corrida cromatográfica, injetados manualmente.

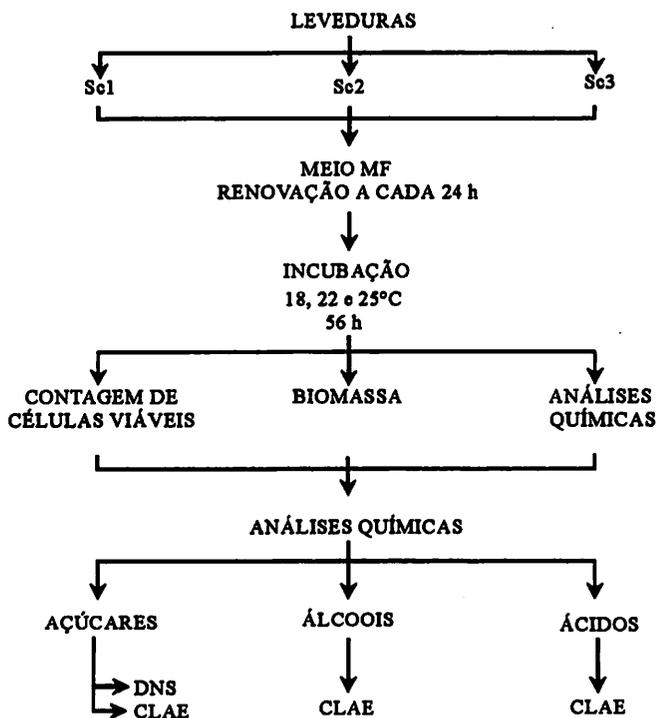


FIGURA 2 Fluxograma do processo de seleção das três estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* a três diferentes temperaturas.

5.3.2 Análises microbiológicas

Durante o experimento foram feitas análises microbiológicas visando acompanhar o crescimento e o desempenho das três leveduras quanto à viabilidade celular e à produção de biomassa. Estes parâmetros foram avaliados visando fazer a comparação entre os mesmos e a produção de etanol e glicerol pelas leveduras estudadas.

5.3.2.1 Contagem de células

Após a coleta das amostras, nos tempos já descritos anteriormente, foi feita, imediatamente, a contagem do número de células viáveis por mL. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer (hematimétrica), utilizando-se a coloração por azul de metileno (Fink e Kuhles, 1933) como indicador da viabilidade celular. Células com metabolismo ativo, viáveis, permanecem incolores, enquanto aquelas com deficiência metabólica ou que estejam inviáveis, corar-se-ão de azul. Um volume da amostra (100 μL) foi adicionado de igual volume de solução de azul de metileno (azul de metileno, 0,1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e citrato de sódio, 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Em todas as contagens foi necessária uma diluição para facilitar a visualização das células presentes na câmara. Procedeu-se à diluição da seguinte maneira: 100 μL da amostra mais 900 μL de água destilada estéril formaram uma solução, que foi homogeneizada. Posteriormente, 100 μL desta diluição foram tomados e adicionados de 100 μL de solução de azul de metileno, obtendo-se um fator de diluição (*fd*) igual a 20. Esta mistura foi homogeneizada por agitação e deixada em repouso por pelo menos 5 min. Após este tempo, a mistura foi novamente homogeneizada e a câmara preenchida. Após um minuto de repouso (para sedimentação das células na câmara), foi feita a contagem em microscópio óptico de campo claro com aumento de 400 vezes. Foram contados 5 dos 25 quadrículos do quadrante central da câmara (Figura 3)

e o número de células viáveis foi calculado pela seguinte fórmula (Bio-Rad Laboratories, 1992):

$$\text{Número de Células Viáveis} = \frac{\sum nq \times 25 \times fd \times 10^4}{n}, \text{ onde:}$$

$\sum nq$ = soma algébrica do número de células viáveis* contadas nos n quadrículos.

25 = número total de quadrículos da câmara.

fd = fator de diluição utilizado.

10^4 = constante padrão da câmara.

n = número de quadrículos contados, dentro dos 25 disponíveis.

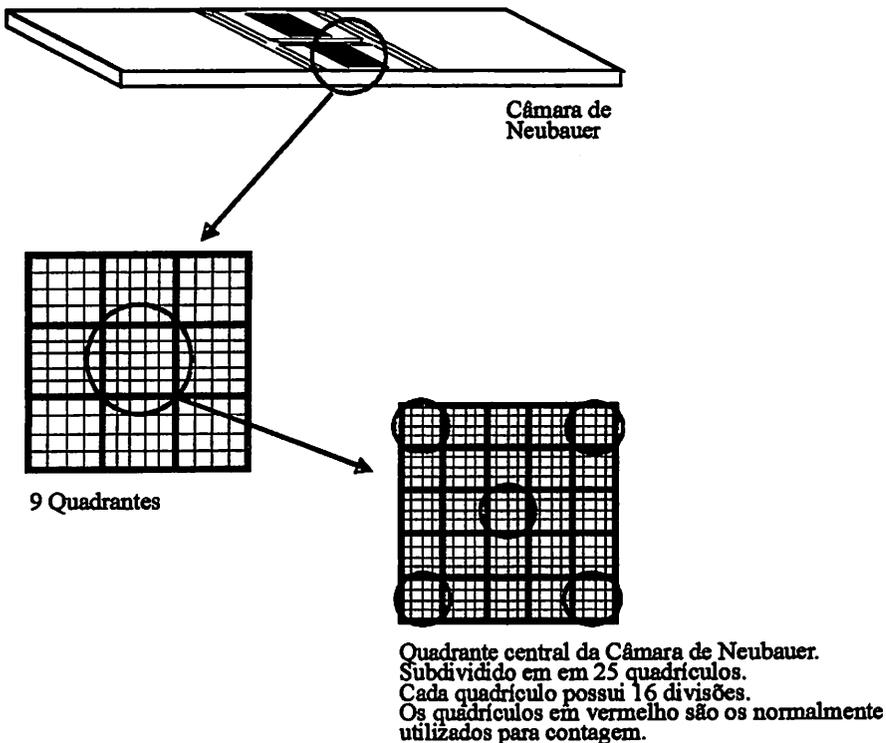


FIGURA 3 Esquema de uma câmara de Neubauer utilizada na contagem de microrganismos.

* Observação: esta fórmula é utilizada para contagem de microrganismos, seja de células viáveis, seja de células em brotamento, seja o número total de células. Para contagem de células de mamíferos, consulte a referência.

5.3.2.2 Biomassa ou massa seca

A biomassa celular foi determinada a partir de tubos eppendorff cuja massa havia sido aferida. Depois de centrifugados, os tubos contendo o sedimento foram levados à estufa a 60 °C por 4 horas. A partir da quarta hora, os tubos foram retirados a cada 30 minutos, colocados em dessecador por 20 min e pesados a cada hora até peso constante. Lembrando-se que foi coletado 1 mL da amostra para esta análise, o valor de biomassa por mL foi obtido subtraindo-se a massa inicial do tubo, aferida, do valor encontrado após estabilização em estufa.

5.3.3 Análise estatística

Os delineamentos experimentais foram definidos utilizando-se o *software* Statistica^R for Windows^R Release 5.0 A (StatSoft, 1995).

O modelo de regressão utilizado é descrito abaixo:

$$y = a + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_1X_2 + b_5X_1X_3 + b_6X_2X_3 + b_7X_1X_1 + b_8X_2X_2 + b_9X_3X_3$$

sendo:

y = variável resposta ,

a = ponto de interceptação,

b_i = coeficiente de regressão associado ao parâmetro i e

X_i = variável independente.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 População celular

As três estirpes de levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas neste experimento, Sc₁, Sc₂ e Sc₃, onde Sc₁ e Sc₂ são leveduras comerciais e Sc₃ é uma levedura selvagem, foram testadas sob as mesmas condições de cultivo, crescendo em meio MF a pH 5,0 em estufa B.O.D., sem agitação, nas temperaturas de 18 °C, 22 °C e 25 °C.

6.1.1 Crescimento a 18 °C

Quando da comparação do crescimento celular à temperatura de 18 °C (Figura 4) entre as três leveduras, a estirpe Sc₁ apresentou um visível predomínio sobre as duas outras durante todo o curso da fermentação. Entretanto, na quarta hora do experimento, a população de Sc₁ foi aproximadamente 23% maior que as demais, cujas populações naquele tempo foram, respectivamente, $8,7 \times 10^7$ cel. \cdot mL⁻¹ e $8,5 \times 10^7$ cel. \cdot mL⁻¹ para Sc₂ e Sc₃. Foi observada a população máxima de $1,76 \times 10^8$ cel. \cdot mL⁻¹ para a levedura Sc₁ na décima segunda hora, cerca de 50% a mais que a levedura Sc₂ no mesmo ponto (que foi máximo para esta levedura). Após a décima segunda hora, a população celular da Sc₁ decresceu, chegando ao final da fermentação com $1,54 \times 10^8$ cel. \cdot mL⁻¹ (Figura 4).

Observou-se, como já citado, que as leveduras Sc₂ e Sc₃ apresentaram uma população muito próxima na quarta hora do experimento. Nos pontos oitava hora e décima segunda hora houve uma divergência no crescimento das mesmas. A levedura Sc₂ aumentou sua população celular e o número de células viáveis de Sc₃ diminuiu. Na décima sexta hora houve uma inversão, a população de Sc₂ diminuiu e a de Sc₃ aumentou. Após a vigésima quarta hora, quando Sc₂ e Sc₃

mostraram populações, respectivas, de $1,0 \times 10^8$ cél. \cdot mL $^{-1}$ e $9,6 \times 10^7$ cél. \cdot mL $^{-1}$, estas duas leveduras apresentaram, proporcionalmente, uma sincronia no crescimento.

Observou-se, também, que após o primeiro reciclo do meio de cultura, ocorrido no tempo 24 horas, as leveduras não manifestaram um aumento populacional, contrariamente ao que foi notado no segundo reciclo, ocorrido no tempo 48 horas, quando as três leveduras voltaram a multiplicar-se (Figura 4).

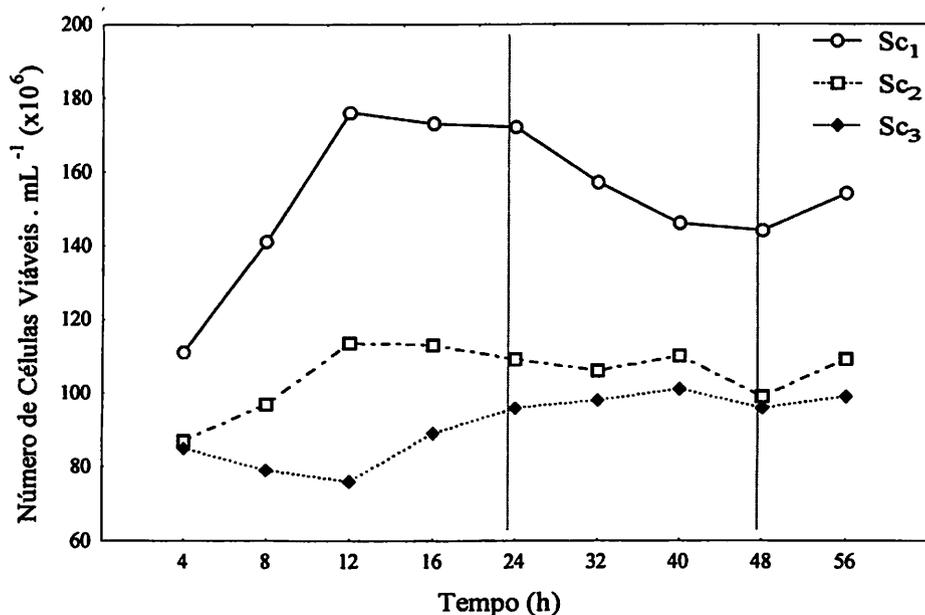


FIGURA 4 Crescimento das três estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* durante 56 horas a 18 °C, em sistema de batelada simples com reciclo do substrato a cada 24 horas. As linhas tracejadas verticais, 24 h e 48 h, indicam o ponto de renovação do meio MF.

6.1.2 Crescimento a 22 °C

Nesta temperatura a levedura Sc_1 continuou mantendo o predomínio do número de células em relação às estirpes Sc_2 e Sc_3 (Figura 5), porém num valor médio inferior ao apresentado na temperatura de 18 °C. Observou-se que a levedura Sc_1 atingiu a população máxima de $1,53 \times 10^8 \text{ cel.}\cdot\text{mL}^{-1}$ na décima sexta hora do experimento, baixando a partir daquele tempo até a trigésima segunda hora. Na quadragésima hora houve um pico de crescimento para Sc_1 , atingindo $1,51 \times 10^8 \text{ cel.}\cdot\text{mL}^{-1}$. A levedura Sc_1 apresentou uma queda acentuada nas últimas oito horas do experimento, logo após o segundo reciclo do meio, finalizando a batelada com uma população de $1,09 \times 10^8 \text{ cel.}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 5, 56ª hora).

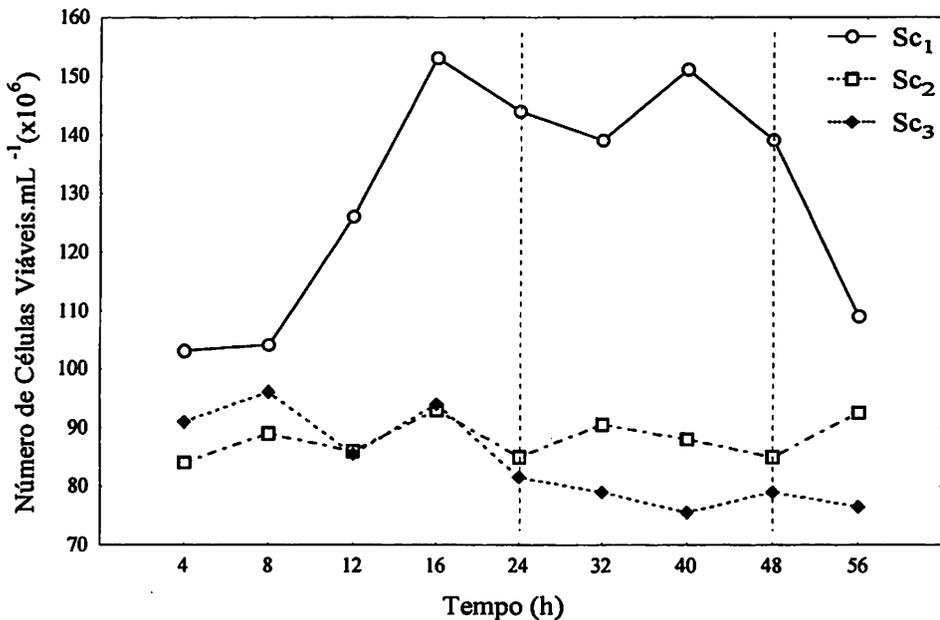


FIGURA 5 Crescimento das três estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* durante 56 horas a 22 °C, em sistema de batelada simples com reciclo do substrato a cada 24 horas. As linhas tracejadas verticais, 24 h e 48 h, indicam o ponto de renovação do meio MF.

As populações das leveduras Sc₂ e Sc₃ mantiveram uma equivalência proporcional, em relação ao crescimento celular, até a décima segunda hora, a partir da qual apresentaram também uma equivalência numérica de células até a vigésima quarta hora (representada pela sobreposição dos respectivos pontos na Figura 5). Da vigésima quarta hora até o final do experimento o crescimento de ambas foi divergente, com uma população celular maior observada na levedura Sc₂. Em relação aos dois pontos de reciclo do meio fermentativo, nos tempos 24 horas e 48 horas, somente a levedura Sc₂ apresentou uma elevação na taxa de crescimento nas oito horas que sucederam ambos os reciclos. As demais leveduras apresentaram uma diminuição em sua população celular após a renovação do meio naqueles dois tempos (Figura 5).

6.1.3 Crescimento a 25 °C

Como já observado, a levedura Sc₁ mostrou-se com maior população em relação às demais. Entretanto, os valores médios do número de células para esta levedura foram inferiores aos observados na temperatura de 22 °C, os quais por sua vez foram inferiores aos obtidos na temperatura de 18 °C (Tabela 2).

TABELA 2 Média do número de células viáveis por mL (cél·mL⁻¹) das três estirpes de *S. cerevisiae* crescendo a 18 °C, 22 °C e 25 °C.

Levedura	cel·mL ⁻¹ (x10 ⁶)		
	18 °C	22 °C	25 °C
Sc ₁	152,66	129,77	113,66
Sc ₂	100,83	88,11	98,38
Sc ₃	91,00	84,22	82,33

Na Tabela 2 também pôde ser observado que a levedura Sc₂ decresceu sua população a 22 °C e, praticamente, restabeleceu a média quando do seu

crescimento a 25 °C. A levedura Sc₃ portou-se à semelhança da levedura Sc₁, porém com médias inferiores.

A 25 °C, observou-se um crescimento mais organizado das três linhagens utilizadas, não sendo tão desproporcional, a favor da levedura Sc₁, como ocorrera nas duas temperaturas anteriormente avaliadas. Observou-se (Figura 6) que as três leveduras reativaram o metabolismo e voltaram a multiplicar-se após a introdução de novo substrato no tempo de 24 horas.

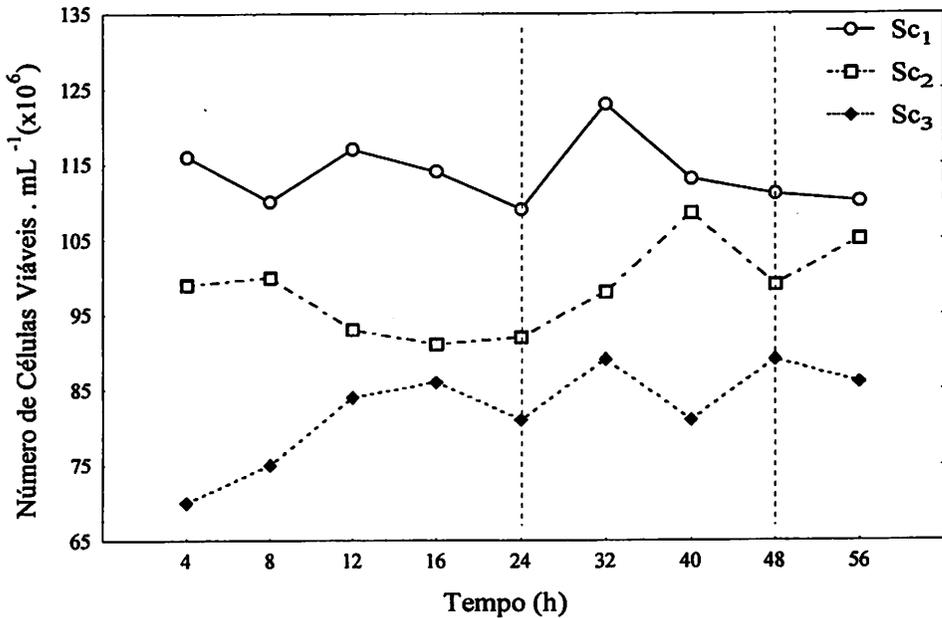


FIGURA 6 Crescimento das três estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* durante 56 horas a 25 °C, em sistema de batelada simples com reciclo do substrato a cada 24 horas. As linhas tracejadas verticais, 24 h e 48 h, indicam o ponto de renovação do meio MF.

A Figura 7 torna mais clara a observância do desempenho do crescimento de cada uma das leveduras nas três temperaturas avaliadas. Foi possível observar que a levedura Sc₁ teve uma taxa de crescimento maior que as demais em todas as temperaturas testadas. Entretanto, a viabilidade da mesma é instável, ou seja, a levedura Sc₁ aumentou rapidamente sua população, mas não a manteve nas horas seguintes ao respectivo aumento. Isto pôde ser evidenciado nas temperaturas de 18 °C e 22 °C. A 25 °C o crescimento da Sc₁ foi mais estável. As leveduras Sc₂ e Sc₃ apresentaram um crescimento mais estável durante todo o curso do experimento.

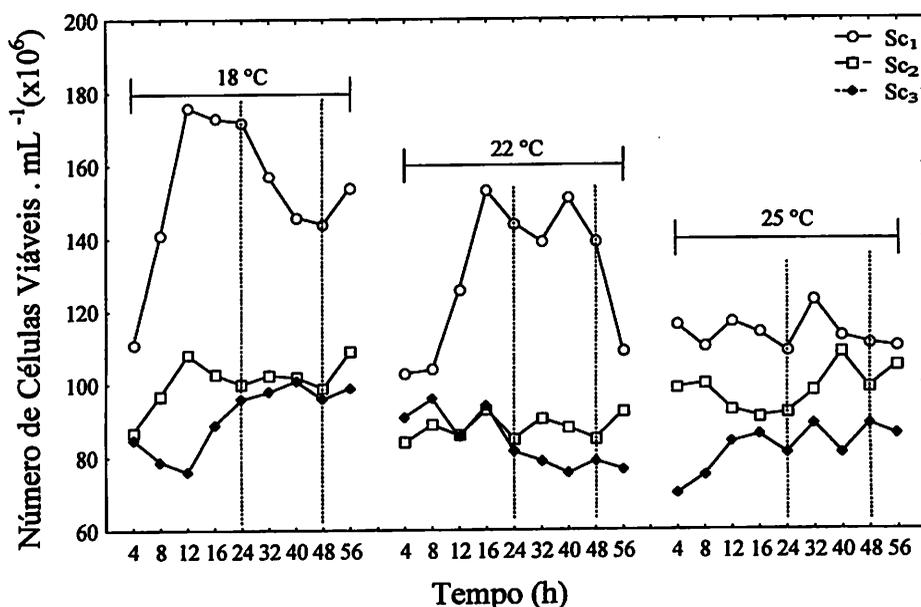


FIGURA 7 Crescimento das linhagens Sc₁, Sc₂ e Sc₃ de *Saccharomyces cerevisiae* nas temperaturas de 18 °C, 22 °C e 25 °C. As linhas tracejadas verticais, 24 h e 48 h, indicam o ponto de renovação do meio MF.

Os dados da Figura 7 fazem notar que a levedura Sc₁ não seria ideal para a condução de uma fermentação a 25 °C, em relação às demais temperaturas, se o desejado fosse uma rápida conversão dos açúcares fermentescíveis ao produto final.

Na seleção da levedura, para fermentar um determinado mosto a uma dada temperatura, deve ser levado em consideração o fato de a bebida ser fermentada ou, se após a fermentação, destilada. A temperatura ideal de fermentação, como citado por Jones, Pamment e Greenfield (1981), situa-se entre 5 °C a 10 °C acima da temperatura ideal de crescimento das leveduras, cujos valores estão entre 25 °C a 30 °C. Para a fermentação de bebidas posteriormente destiladas, a temperatura geralmente é mais elevada em função do tempo de fermentação. Na produção de aguardente de cana, em que o etanol é o principal componente e cuja temperatura ideal é próxima de 30 °C, as leveduras consomem todo açúcar do mosto em 24 horas, o que leva aproximadamente 10 dias na fermentação da uva.

A temperatura ideal para a fermentação de uvas varia com o tipo de vinificação utilizado. No processo em tinto, no qual há a maceração da casca concomitante à fermentação, os valores de temperatura oscilam entre 24 °C e 29 °C. Para a vinificação em branco, as temperaturas são mais amenas, com valores entre 7 °C e 18 °C (Kunkee e Goswell, 1977; Pato, 1982; Vogt et al., 1986).

6.2 Biomassa

A produção de biomassa entre as três leveduras foi comparada para, posteriormente, ser feita uma correlação entre este parâmetro e o rendimento fermentativo em etanol. A relação glicerol por biomassa também foi avaliada, uma vez que quantidades deste poliálcool na bebida são responsáveis pela maciez da mesma (Amerine e Cruess, 1960; Fleet, 1993).

A análise de superfície de resposta foi feita para cada uma das leveduras correlacionando as três temperaturas, o tempo de fermentação e a produção de biomassa, com o intuito de selecionar levedura e temperatura cuja produção de biomassa fosse superior.

Na Figura 8 pode ser observada a produção de biomassa pela levedura Sc₁. Esta levedura apresentou índices máximos de biomassa (6 mg·mL⁻¹) nas três temperaturas. Após a trigésima hora de fermentação este valor foi alcançado nas temperaturas de 22 °C e 25 °C e mais tardiamente, após a quadragésima hora, a produção de biomassa a 18 °C atingiu os 6 mg·mL⁻¹. Aos 18 °C, também foram observados os valores mínimos de biomassa, sendo inferiores a 3mg·mL⁻¹.

Os valores de biomassa para a levedura Sc₂ (Figura 9) mostraram-se mais homogêneos durante a condução do experimento. Houve uma nítida preferência de crescimento, por parte da levedura Sc₂, na temperatura de 22 °C, quando foi alcançado o valor máximo, para esta levedura, de aproximadamente 6 mg·mL⁻¹. Nesta temperatura pôde ser observada, também, a uniformidade da levedura Sc₂ em relação ao tempo de fermentação, mantendo os níveis de número celular durante todos os graus de temperatura testados no experimento.

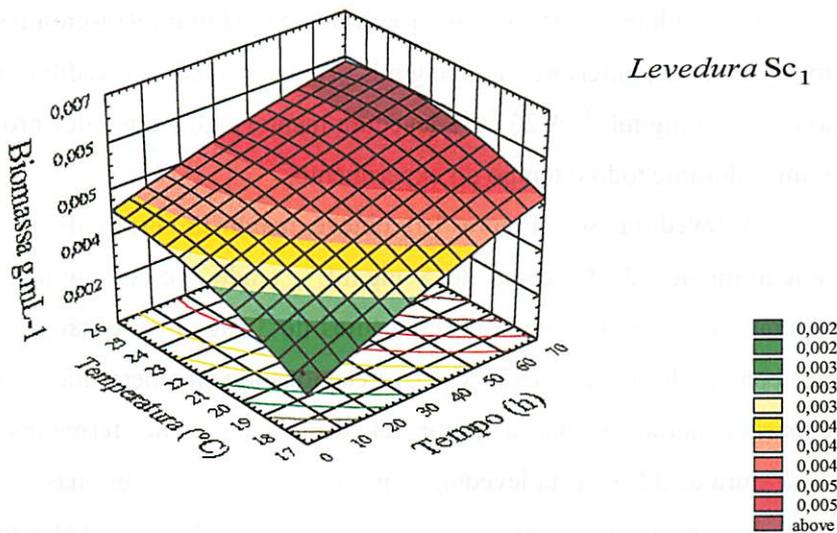


FIGURA 8 Análise de superfície de resposta para produção de biomassa pela levedura Sc₁

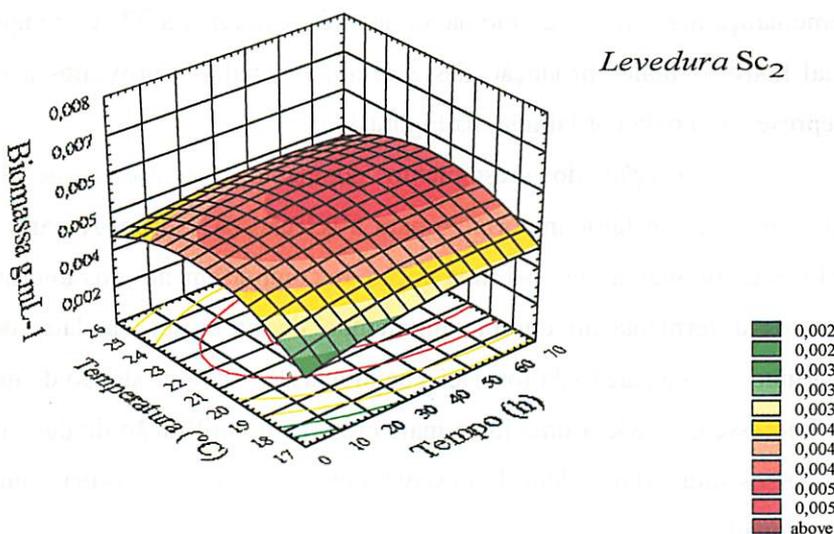


FIGURA 9 Análise de superfície de resposta para produção de biomassa pela levedura Sc₂

Os resultados a 18 °C para a levedura Sc₂ (Figura 9) foram baixos até o tempo 32 horas, inferiores a 3 mg·mL⁻¹, após o qual a levedura obteve um máximo de 5 mg·mL⁻¹. A 25 °C a levedura manteve um valor próximo de 4 mg·mL⁻¹ durante todo o tempo do experimento.

A levedura Sc₃ (Figura 10) obteve maior produção de biomassa na temperatura de 22 °C, cerca de 5 mg·mL⁻¹, tendo crescido muito pouco na temperatura de 18 °C, com valores médios de 3 mg·mL⁻¹, e não apresentando uma boa performance a 25°C. Correlacionando temperatura e tempo de incubação, notou-se que a partir da décima hora de fermentação, e na temperatura de 22 °C, esta levedura começou produzir mais biomassa, sendo que o final do experimento, entre 50 horas e 60 horas, refletiu um valor máximo da produção de biomassa, algo próximo a 5 mg·mL⁻¹.

A Figura 11 apresenta o crescimento das três leveduras às três temperaturas durante todo o tempo do experimento. Foi observada uma grande semelhança nos valores de biomassa das três leveduras a 22 °C, temperatura na qual houve a maior produção deste parâmetro, valores próximos a 4 mg·mL⁻¹ (representado pela cor laranja, na Figura 11).

A avaliação do crescimento populacional expresso pela biomassa microbiana é um fator importante para a seleção da estirpe. A partir dele, dos valores de biomassa, ter-se-á uma noção do comportamento dos microrganismos sujeitos à fermentação durante um tempo de processo, batelada ou sistema contínuo. A associação da formação de biomassa com a produção de metabólitos de interesse conceberá uma idéia mais próxima da utilização de dada estirpe em processos industriais, além da possível comercialização da mesma como inóculo selecionado.

Levedura Sc₃

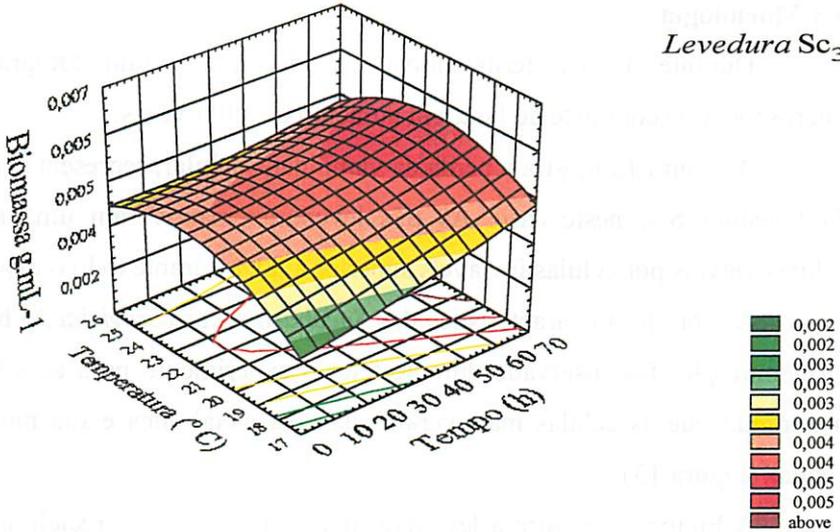


FIGURA 10 Análise de superfície de resposta para produção de biomassa pela levedura Sc₃

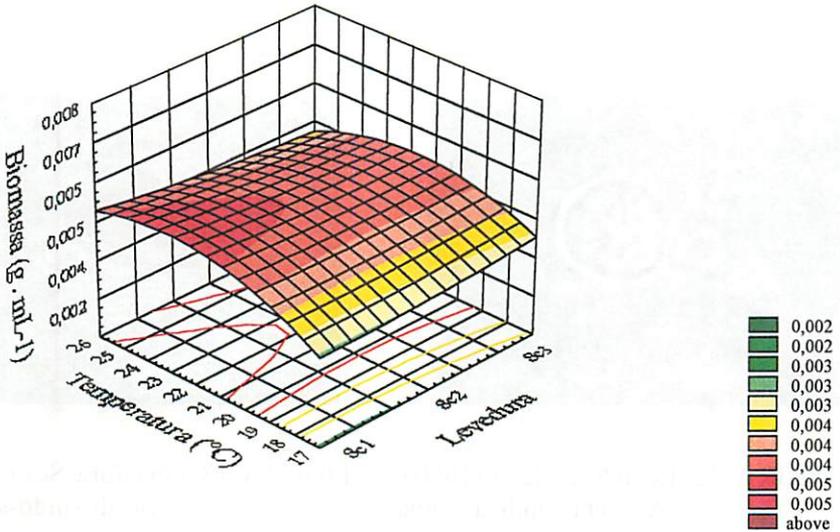


FIGURA 11 Análise de superfície de resposta para produção de biomassa pelas leveduras Sc₁, Sc₂ e Sc₃ a 18 °C, 22 °C e 25 °C.

6.3 Morfologia

Durante a fase fermentativa, as leveduras foram fotografadas em microscopia de contraste de fase, em aumento de 1000 vezes.

A Figura 12 mostra a perda da viabilidade celular, representada pela seta, da levedura Sc₁, neste caso. As três leveduras mantiveram uma relação de células viáveis por células inviáveis superior a 80% durante todo o experimento.

A reprodução característica das *Saccharomyces cerevisiae*, o brotamento ou gemulação, foi observado durante todo o experimento para as três estirpes, mostrando que as células mantiveram sua taxa metabólica e sua multiplicação celular (Figura 13).

A Figura 14 mostra a levedura Sc₃, 24 horas após o reciclo do meio de cultivo, ou seja, meio escasso de nutrientes, apresentando características morfológicas típicas de fase estacionária de crescimento e também uma ligeira agregação celular (floculação).

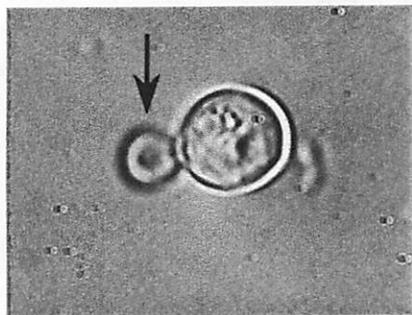


FIGURA 12 Levedura Sc₁ (x1000).
A seta indica uma célula inviável corada por azul de metileno.

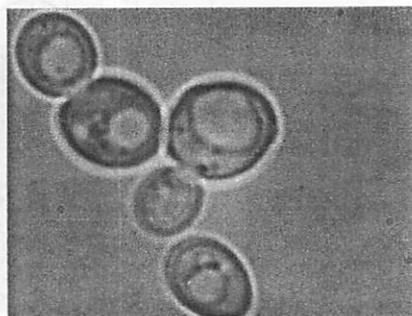


FIGURA 13 Levedura Sc₂ (x1000)
reproduzindo-se por brotamento.

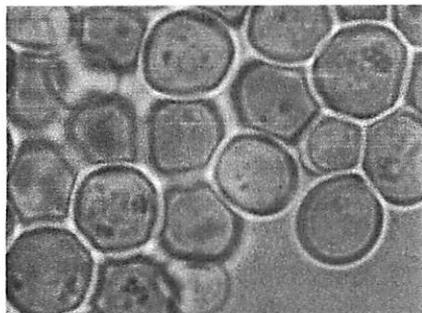


FIGURA 14 Levedura Sc_3 (x1000) apresentando morfologia típica de fase estacionária de crescimento e uma ligeira agregação.

6.4 Relação etanol/biomassa e glicerol/biomassa

Utilizou-se a análise de superfície de resposta para selecionar qual das leveduras foi a maior produtora de etanol em relação à biomassa celular. A Figura 15 é a representação conjunta da performance das três leveduras testadas, Sc_1 , Sc_2 e Sc_3 , nas três temperaturas durante as 56 horas do experimento. A análise estatística mostrou que as leveduras Sc_2 e Sc_3 obtiveram uma maior relação etanol/biomassa do que a observada para a levedura Sc_1 . Entre as leveduras Sc_2 e Sc_3 não houve uma diferença significativa, visto que ambas obtiveram os mesmos valores (cores vermelha, laranja e laranja claro na Figura 15). Em relação à temperatura, apesar de alguns pontos de máximo a 18 °C e 25 °C, a temperatura de 22 °C revelou uma área mais constante de produção de etanol por biomassa celular (cores laranja e laranja claro na Figura 15), ou seja, a 22 °C houve uma maior produção média de etanol/biomassa para as três leveduras.

A relação de glicerol produzido esteve num valor médio de 10% do teor de etanol final, com já descrito por Vogt et al. (1986), e 5% do teor de açúcares no meio, concordando com os valores obtidos por Alves (1994). Em função destes dados, as respostas estatísticas e representação gráfica, assim como as

conclusões sobre a levedura e a temperatura ideais seguem em concordância com os valores já descritos para a relação etanol/biomassa, ou seja, as três leveduras apresentaram um rendimento equivalente, sendo que a 22 °C foram obtidas as maiores concentrações dos metabólitos analisados.

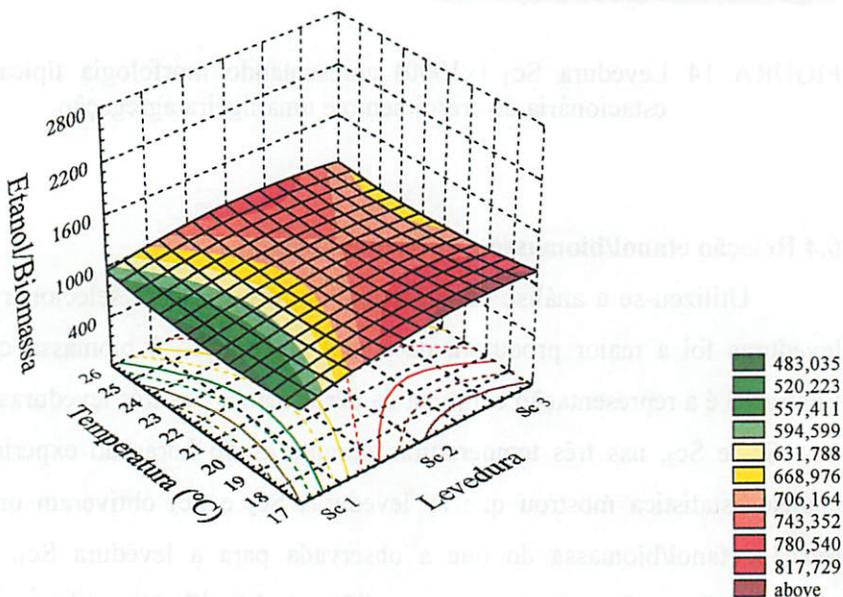


FIGURA 15 Análise de superfície de resposta para seleção de levedura e temperatura ideais relacionado etanol por biomassa.

7 CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos neste experimento, comparando duas leveduras que são comercializadas na forma liofilizada (Sc_1 e Sc_2) e uma outra levedura selecionada de cana-de-açúcar Sc_3 , pôde-se concluir que:

1. A levedura Sc_1 apresentou uma maior população celular e uma maior produção de biomassa em relação às outras leveduras, nas três temperaturas avaliadas.

2. Esta maior produção de biomassa está associada com o tempo ou idade do inóculo e com a temperatura.

3. A temperatura selecionada neste experimento foi a de 22 °C, a qual promoveu os melhores rendimentos fermentativos (relação etanol/biomassa e glicerol/biomassa).

4. Quando comparadas quanto à capacidade de produção de etanol e glicerol em função da biomassa produzida, as três leveduras mostraram equivalência.

5. A levedura Sc_3 apresentou características de floculação no curso do experimento.

6. Não houve diferenças significativas entre as leveduras industriais e a levedura selvagem no rendimento fermentativo durante o experimento, podendo ser, qualquer uma delas, utilizada para o processo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCARDE, A. R.; BASSO, L. C. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v.54, n.3, set./dez. 1997. Disponível em: <<http://www.scielo.br/cgi.../fbtext?got=last7pid=S0103-90161997000200013&lng=pt&nrm=is>>. Acesso em: 19 de mar. 2001.
- ALVES, D. M. G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica.** Piracicaba: ESALQ-USP, 1994. 251p. (Dissertação – Mestrado em Ciências)
- AMERINE, M. A.; CRUESS, W. V. **The technology of winemaking.** Westport: Avi, 1960. 709p.
- BEECH, F. W. Yeasts in cider-making. In: In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The yeasts: yeast technology.** 2.ed. London: Academic Press, 1993. v.5, cap.5.
- BEECH, F. W.; CARR, J. G. Cider and perry. In: ROSE, A. H. (ed.). **Alcoholic beverages.** London: Academic Press, 1977. v.1, cap.3. (Economic Microbiology series).
- BERRY, D. R.; BROWN, C. Physiology of yeast growth. In: BERRY, D. R.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. (eds.). **Yeast biotechnology.** London: Allen & Unwin, 1987. cap.6.
- BERRY, D. R.; WATSON, D. C. Production of organoleptic compounds. In: BERRY, D. R.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. (eds.). **Yeast biotechnology.** London: Allen & Unwin, 1987. cap.11.
- BIO-RAD. **Pulsed field electrophoresis systems: instructions manual and applications guide.** United States of America: Bio-Rad Laboratories, 1992. (Catalog numbers 170-3612 through 170-3729).
- BISSON, J.; DAULNY, B.; BERTRAND, A. Influence de la temperature de fermentation sur la composition d'un vin blanc sec. **Connaissance Vigne et du Vin**, Talence, France, v.14, n.3, p.195-202,1980.

- CIANI, M.; FERRARO, L.; FATICHENTI, F. Influence of glycerol production on the aerobic and anaerobic growth of the wine yeast *Candida stellata*. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v.27, n.9, p.698-703, Nov. 2000.
- COLAGRANDE, O.; SILVA, A.; FUMI, M. D. Recent applications of biotechnology in wine production. **Biotechnology Progress**, Washington, v.10, n.1, p.2-18, Mar. 1994. (Review).
- DAUDT, C. A.; OUGH, C. S. Efeitos da variedade de microrganismos, temperatura, SO₂ e variedade de uva sobre a formação de álcoois superiores. **Revista Brasileira de Tecnologia**, Brasília, v.6, n.s4, p.301-305, dez. 1975.
- DAWES, I. W.; SUTHERLAND, I. W. **Microbial physiology**. 2.ed. Oxford: Blackwellscientific, 1992. 289p. (Basic Microbiology, v.4).
- DEMAIN, A. L. Microbial biotechnology. **TibTech**, v.18, p.26-31, Jan. 2000.
- FARKAŠ, V. Polysaccharide metabolism. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (eds). **The Yeasts: metabolism and physiology of yeasts**. 2.ed. Great Britain: Academic Press, 1989. v.3, cap.9.
- FERREIRA, L. V.; AMORIM, H. V.; BASSO, L. C. Fermentação de trealose e glicogênio endógenos em *Saccharomyces cerevisiae*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.19, n.1, jan./abr. 1999. Disponível em: <<http://www.scielo.br/cgi.../fbtext?got=last7pid=S0101-20611999000100008&lng=pt&nrm=is>>. Acesso em: 19 de mar. 2001.
- FINK, H.; KUHLES, R. Beitrage zur methylenblau farbung der hefezellmembran. **Hoppe –Seylers Zeitschrift fur Physiologische Chemie**, Deutschland, n.218, p.65-66, 1933.
- FINK, H.; KUHLES, R. Beitrage zur methylenblau farbung der hefezellmembran. **Hoppe–Seylers Zeitschrift fur Physiologische Chemie**, Deutschland, n.218, p.65-66, 1933.
- FLEET, G. H. Wine yeasts. In: FLEET, G. H. (ed.). **Wine microbiology and biotechnology**. Switzerland: Harwood, 1993. cap.4.
- FLIKWEERT, M. T.; DIJKEN, J. P. van; PRONK, J. T. Metabolic responses of pyruvate decarboxilase-negative *Saccharomyces cerevisiae* to glucose excess. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.9, p.3399-3404, Sept. 1997.

- FUGE, E. K.; WERNER-WASHBURN, M. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: HOHMANN, S.; MAGER, W. H. (eds). **Yeast stress response**. Heidelberg: Springer Verlag / R. G. Landes, 1997. cap.2. (Molecular Biology Intelligence Unit).
- GANCEDO, C.; SERRANO, R. Energy-yielding metabolism. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The Yeasts : metabolism and physiology of yeasts**. 2.ed. London: Academic Press, 1989. v.3, cap.6.
- GANCEDO, J. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v.62, n.2, p.334-361, June 1998.
- GARDNER, N.; RODRIGUE, N.; CHAMPAGNE, C. P. Combined effects of sulfites, temperature and agitation time on production of glycerol in grape juice by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, n.7, p.2022-2028, July 1993.
- GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. **Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology**. New York: W. H. Freeman, 1995. 662p.
- GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. 2.ed. New York: Wiley-Liss, 1994. 458p.
- HAMMOND, J. R. M. Brewer's yeasts. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The Yeasts : yeast technology**. 2.ed. London: Academic Press, 1993. v.5, cap.1.
- HOUSA, C. G.; BRANDT, E. V.; THEVELEIN, J.; HOHMANN, S.; PRIOR, B. A. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* osmotic stress. **Microbiology**, Reading, v.144, n.3, p.671-680, Mar. 1998.
- JONES, R. P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P. F. Alcohol fermentation by yeasts: the effects of environmental and other variables. **Process Biochemistry**, London, v.16, p.42-49, 1981.
- KUNKEE, R. E.; BISSON, L.F. Wine making yeasts. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The Yeasts: yeast technology**. 2.ed. London: Academic Press, 1993. v.5, cap.3.
- KUNKEE, R. E.; GOSWELL, R.W. Table wines. In: ROSE, A. H. (ed.). **Alcoholic beverages**. London: Academic Press, 1977. v.1, cap.4. (Economic Microbiology series).
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W (eds). **The yeasts: a taxonomic study**. 4.ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. p.79.

- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of biochemistry**. 3.ed. Worth, 2000. 1152p.
- LEHTONEN, M.; SUOMALAINEN, H. Rum. In: ROSE, A. H. (ed.). **Alcoholic beverages**. London: Academic Press, 1977. v.1, cap.9. (Economic Microbiology series).
- LILLIE, S. H.; PRINGLE, J. R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. **Journal Bacteriology**, Washington, v.143, n.3, p.1384-1394, Sept. 1980.
- LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (coords.). **Tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgard Blücher, 1992, v.1, cap.1-2. (Série Biotecnologia,).
- LURTON, L.; SNAKKERS, G.; ROULLAND, C.; GALY, B. Influence of the fermentation yeast strain on the composition of wine spirits. **Journal of Science Food and Agriculture**, London, v.67, n4, p.485-491, Apr. 1995.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 8.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 986p.
- MAICAS, S.; GIL, J. V.; PARDO, I.; FERRER, S. Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria. **Food Research International**, Ottawa, v.32, p.491-496, 1999.
- MARTINEAU, B.; HENICK-KLING, T. Formation and degradation of diacetyl in wine during alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* strain ec1118 and malolactic fermentation with *Leuconostoc oenos* strain mcw. **American Journal Enology and Viticulture**, Davis, v.46, n.4, p.442-448, Oct./Dec. 1995.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v.31, n.2, p.426-428, Mar. 1959.
- MYERS, D. K.; LAWLOR, D. T. M.; ATTFIELD, P. V. Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention on fermentation of media with a high sugar concentration by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washinton, v.63, n.1, p.145-150, Jan. 1997.
- NIELSEN, J. C.; RICHELIEU, M. Control of flavor development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washinton, v.65, n.2, p.740-745, Feb.1999.

- ÖSCAN, S.; JOHNSTON, M. Function and regulation of yeast hexose transporters. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v.63, n.3, p.554-569, Sept. 1999.
- OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. New York, v.64, n.1, p.34-50, Mar. 2000.
- OUGH, C. S. **Tratado básico de enología**. Tradução de Concepción Llaguno Marchena e María Dolores Cabezudo Ibañes. Zaragoza: Acribia, 1996. 294p. Tradução de: Winemaking basics. New York: Haworth Press, 1992.
- PANEK, A. D. Storage carbohydrates. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (eds). **The Yeasts: yeasts organelles**. 2.ed. Great Britain: Academic Press, 1991. v.4, cap.13.
- PATO, O. **O vinho: sua preparação e conservação**. 7 ed. Lisboa: Livraria Clássica Editora, 1982. 433 p. (Coleção Técnica Agrária).
- PLOURDE-OWOBI, L.; DURNER, S.; GOMA, G.; FRANÇOIS, J. Trehalose reserve in *Saccharomyces cerevisiae*: phenomenon of transport, accumulation and role in cell viability. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.55, n.1/3, p.33-40, Apr. 2000.
- RAPP, A.; VERSINI, G. Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN IN GRAPES AND WINE, p.156-164, 1991.
- REMIZE, F.; ROUSTAN, J. L.; SABLAYROLLES, J. M.; BARRE, P.; DEQUIN, S. Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in by-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.1, p.143-149, Jan. 1999.
- ROMANO, P.; SUZZI, G. Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.2, p.309-315, Feb.1996. (Minireview).
- ROSE, A. H. History and scientific basis of alcoholic beverage production. In: ROSE, A. H (ed.). **Alcoholic beverages**. London: Academic Press, 1977. v.1, cap.1. (Economic Microbiology series).

- ROSE, A. H. Production and industrial importance of primary products of microbial metabolism. In: ROSE, A. H. (ed.) **Primary products of metabolism**. London: Academic Press, 1978. v.2, cap.1. (Economic Microbiology series).
- ROSE, A. H. Production and industrial importance of secondary products of microbial metabolism. In: ROSE, A. H. (ed.). **Secondary products of metabolism**. London: Academic Press, 1979. v.3, cap.1. (Economic Microbiology series).
- SALWAY, J. G. **Metabolism at a glance**. Oxford: Blackwell Scientific, 1994. p.58-59.
- SCHWAN, R. F.; MENDONÇA, A. T.; SILVA JÚNIOR, J. J. et al. Microbiology and physiology of *cachaça* (*aguardente*) fermentations. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.79, p.89-96, Dec. 2001.
- SCHWAN, R. F.; ROSE, A. H. Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. **Journal of Applied Bacteriology**, Glasgow, v.76, n.1, p.62-67, Jan. 1994.
- SILLJÉ, H. H. W.; PAALMAN, J. W. G.; SCHURE, E. G. ter.; OLSTHOORN, S. Q. B.; VERKLEIJ, A. J.; BOONTRA, J.; VERRIPS, C. T. Function of trehalose and glycogen in cell cycle progression and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.181, n.2, p.396-400, Jan.1999.
- SPENCER, J. F. T.; SPENCER, D. Production of polyhydroxy alcohols by osmotolerant yeasts. In: ROSE, A. H. (ed.) **Primary products of metabolism**. London: Academic Press, 1978. v.2, cap.10. (Economic Microbiology series).
- STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology**. 2.ed. Great Britain: Pergamon, 1995. 357p.
- STATSOFT INC. **Statistica for Windows** [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, 1995.
- STRYER, L. Metabolismo do glicogênio. In: STRYER, L. **Bioquímica**. 4.ed. Tradução de Antônio José Magalhães da Silva Moreira et al. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. cap.23.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, C. L. **Microbiology: an introduction**. 6.ed. California: Benjamin Cummings, 1998. 832p.

- VOGT, E.; JAKOB, L.; LEMPERLE, E., WEISS, E. **El vino: obtención, elaboración y análisis.** Tradução de Jaime Esain Escobar. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1986. 294p. Tradução de: Der Wein: bereitung, behandlung, untersuchung. 9 ed. Stuttgart: Eugen Ulmer, 1984.
- WALKER, G. M. **Yeast physiology and biotechnology.** Chichester: Wiley, 1998. 350p.
- WARD, O. P. **Biocnologia de la fermentacion: principios, procesos e productos.** Tradução de Miguel Calvo Rebollar e Emilia Sevillano Calvo. Zaragoza: Acribia, 1991, 265p. Tradução de: Fermentation Biotechnology. Canada: Open University Press, 1989.
- WATSON, D. C. Yeasts in distilled alcoholic beverage production. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The Yeasts : yeast technology.** 2.ed. London: Academic Press, 1993. v.5, cap.6.
- WEEB, A. D.; INGRAHAN, J. L. Fusel oil. **Advances in Applied Microbiology,** San Diego, v.5, p.317-353, 1963.

CAPÍTULO 3

ELABORAÇÃO DE BEBIDA ALCOÓLICA FERMENTADA A PARTIR DOS MOSTOS DE CAJÁ (*Spondias mombin*) E CACAU (*Theobroma cacao*)

1 RESUMO

DIAS, Disney Ribeiro. Elaboração de bebida alcoólica fermentada a partir dos mostos de cajá (*Spondias mombin*) e cacau (*Theobroma cacao*). Lavras: UFLA, 2001, 130p. (Dissertação – Mestrado em Ciência dos Alimentos)*.

A elaboração de um processo de fermentação utilizando mostos obtidos a partir das polpas de cacau e cajá foi o tema do presente trabalho. O planejamento de uma metodologia para elaboração de bebidas a partir de frutas tropicais visou não só a inovação da bebida como também uma saída financeira para o aproveitamento de frutas nativas. A avaliação da aceitação da bebida elaborada a partir das polpas de cacau, *Theobroma cacao*, e cajá, *Spondias mombin*, também foi objetivo deste trabalho. As polpas utilizadas neste experimento provieram do CEPEC/CEPLAC, Itabuna – BA, onde também foram caracterizadas. O experimento foi conduzido no Departamento de Biologia e no Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade Federal de Lavras. Ambas as polpas, de cacau e de cajá, foram chaptalizadas, com solução de sacarose, a 24 °Brix e 22 °Brix, respectivamente, pra constituir 20 litros de mosto. O mosto também foi desacidificado a pH 4,5 para ser submetido ao tratamento enzimático com solução de Ultrazym^R AFP-L (Novo DK). Foi utilizado SO₂, na forma de metabissulfito de potássio, como agente inibidor do crescimento bacteriano e como antioxidante. Os mostos foram adicionados de bentonite como agente colante, para facilitar o processo de clarificação. Depois destes tratamentos, os mostos foram inoculados com a levedura selecionada na concentração de 10⁷ cél./mL. A fermentação foi conduzida a 22 °C durante dez dias, com acompanhamento diário do grau Brix e da atividade fermentativa pela liberação de CO₂. Ao final da fermentação, os mostos foram armazenados a 10 °C. Depois de dez dias a esta temperatura foi feita a primeira trasfega. Uma outra, 30 dias após a primeira, foi feita antes da filtração em terra de diatomáceas e placa de celulose. Na bebida elaborada foram feitas as análises comumentes feitas em vinhos. A aceitação da bebida foi feita por 45 provadores não treinados, utilizando-se escala hedônica de 9 pontos. Os dados, avaliados pela análise de Mann Whitney, mostraram que as bebidas foram bem aceitas, podendo ser uma nova fonte de investimento para indústrias ou pequenos produtores.

*Comitê Orientador: Rosane Freitas Schwan - UFLA (Orientadora), Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA e Luiz Carlos Oliveira Lima - UFLA

2 ABSTRACT

DIAS, Disney Ribeiro. **Manufacture of a fermented alcoholic beverage starting from tropical fruits**. Lavras: UFLA, 2001, 130p. (Dissertation – Master Program in Food Science)*.

The elaboration of a fermentation process using musts obtained from the cocoa, *Theobroma cacao*, and cajá, *Spondias mombin*, pulps was the aim of the present work. The planning of a methodology to make the drinks starting from tropical fruits sought not only the innovation of the drink as well as a financial exit for the use of native fruits. The evaluation of the acceptance of the drink elaborated were also objective of this work. The fruit pulps used were extracted and characterised from fresh fruit at CEPLAC, Itabuna, Bahia. Both fruit pulps (cacao and yellow mombin) had their sugar content fixed at 24° and 22° Brix, respectively. The must was deacidified until it reached pH value of 4.5 and then enzymatically treated with Ultrazym AFP-L (Novo DK). Sulphur dioxide was used as an inhibitor of bacterial growth and as an antioxidant. Bentonite was also added to aid the must clarification. After these adjustments the must was inoculated with 10⁷ cell/ml of selected yeast. The fermentation was carried out at 22° C for 10 days, with daily monitoring of Brix and fermentation activity by the liberation of CO₂. At the end of the fermentation the fermented must was stored at 10° C for sedimentation of the yeasts. Another one was done 30 days after the first one and then the cells were separated from the fermented must using filtration with diatomaceous earth and a cellulose plate. The final product was submitted to chemical analysis normally done for white wines. Ethanol, glycerol, organic acids were measured by HPLC. GC was used to measure higher alcohols, methanol, esters, acetaldehyde and ethanol. All the metabolites were within the standards established by the Ministry of Agriculture. There was a high concentration of higher alcohols, which are usually responsible for the flavour found in alcoholic beverages. The acceptance of the drink was assessed by 45 panellists using the hedonic scale (1-9). The data were analysed by the Mann-Whitney non-parametrical method that showed good scores for both cacao and yellow mombin. Both beverages were well accepted and provide potential new products for small or medium enterprises.

* Guidance Committee: Rosane Freitas Schwan - UFLA (Major Professor), Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA and Luiz Carlos Oliveira Lima – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

A produção do vinho passou de somente arte para arte com embasamento científico, ampliando-se as pesquisas em vitivinicultura. Toda a tecnologia de produção do vinho é conhecida e cada vez mais estudada, buscando-se a melhor qualidade e a maior produtividade. A vitivinicultura tem sido difundida no Brasil com vistas a um crescimento de produção e valorização do vinho nacional. Como a uva, várias outras frutas podem ser utilizadas para a formulação de mostos que podem, posteriormente, ser submetidos à fermentação alcoólica por ação de leveduras. Entretanto, não há tecnologia totalmente voltada para a elaboração destas bebidas no que se diz respeito à levedura a ser utilizada, à temperatura ideal de fermentação e ao tipo de tratamento que o mosto da fruta, ou a própria fruta, deve sofrer na fase pré-fermentativa.

O Brasil é um dos países com maior produção mundial de frutas, incluindo a fruticultura tropical. Também no Brasil há grandes perdas pós colheita para algumas culturas, o que, notadamente, gera prejuízos. Existe a necessidade de novos processamentos serem desenvolvidos, visando diminuir estas perdas. Também seria interessante que, além da redução das perdas, a geração de lucro fosse aumentada. Uma das alternativas seria a produção de bebida alcoólica a partir de frutas nativas ou que facilmente se propaguem no solo brasileiro.

O cacau, *Theobroma cacao*, é mundialmente conhecido pela utilização de suas amêndoas para a fabricação do chocolate. Durante muito tempo, a comercialização das amêndoas de cacau alavancou a economia baiana e, por conseguinte, a economia brasileira. Em 1995 houve uma crise na agroindústria cacauífera e a utilização da polpa do cacau como fonte de renda passou a receber maior atenção, sendo atualmente, uma das formas através da qual esta fruta é

comercializada. O cajá, *Spondias mombin*, é uma outra fruta cuja industrialização está voltada para a produção de polpas.

A elaboração de uma metodologia, partindo das tecnologias enológicas para o processo de obtenção de bebida alcoólica fermentada a partir das polpas de cacau e cajá, bem como através de análises químicas na bebida obtida e da aceitação da mesma junto a provadores, foi o objetivo deste trabalho.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Cacau – *Theobroma cacao*

O cacauzeiro (*Theobroma cacao*) é uma fruteira de altura média e muito ramificada. Possui folhas alternas, curto-pecioladas e flores cuja coloração pode ser amarela, branca ou rósea. O formato do fruto é ovóide-oblongo, capsular, com cinco saliências longitudinais arredondadas, medindo até 21 cm de comprimento. Suas sementes são ovóides, envoltas por polpa aquosa e mucilaginosa, de coloração branca ou rósea (Gomes, 1985). Este mesmo autor cita que da fermentação da polpa obtém-se uma bebida vinosa, álcool e vinagre. Das sementes, produz-se o chocolate.

O cacau, assim como o cupuaçu, pertence à família *Sterculiaceae*, gênero *Theobroma* (Gomes, 1985; Schwan, Souza e Mendonça, 2000). O cacauzeiro ocorre em baixadas e florestas tropicais nas regiões de origem, em altitudes variáveis, entre 0 e 1000 m do nível do mar. Adapta-se bem a regiões com temperaturas médias superiores a 21°C; exige precipitações pluviométricas superiores a 1300 mm anuais, bem distribuídos ao longo do ano, como na região litorânea e Vale do Ribeira e grande parte do planalto paulista (Agrofauna, 2000). A cultura do cacauzeiro tem grande importância econômica porque seu principal produto, o chocolate, é um alimento energético muito consumido em países de clima frio. Quando os espanhóis chegaram ao México, os maias e os astecas já utilizavam o cacau como bebida e como moeda. Mas ele só começou a ser aceito na Europa quando se passou a colocar açúcar na bebida. Uma região no sul da Bahia, conhecida como "Região Cacauzeira", tendo como centro as cidades de Ilhéus e Itabuna, é responsável por cerca de 90% da produção brasileira, calculada em torno de 170000 t de amêndoas secas, que abastecem o mercado nacional e são exportadas principalmente para os Estados Unidos,

Rússia, Alemanha, Reino Unido e Japão. A Tabela 1 apresenta a caracterização do fruto de cacau.

TABELA 1 Caracterização do fruto de cacau maduro

Características	Médias
Peso Total (g)	543,00
Casca (%)	50,50
Polpa (%)	26,40
Sementes (%)	23,10
Comprimento (mm)	169,10
Diâmetro (mm)	94,60
Sólidos Solúveis Totais (°Brix)	20,55
Acidez Total Titulável (%)	1,00
Sólidos Solúveis/Acidez	20,55
PH	3,20
Açúcares Solúveis Totais (%)	17,40
Açúcares Redutores (%)	10,70
Amido (%)	0,16
Pectina Total (%)	0,57
Pectina Fracionada (% em relação aos SIA)	A.M.: 4,04 B.M.: 1,49 Prot.: 1,03
Fenólicos Solúveis em Água (%)	0,17
Fenólicos Solúveis em Metanol (%)	0,15
Fenólicos Solúveis em Metanol 50 % (%)	0,13

Fonte: Schwan, Souza e Mendonça, 2000. Obs.: S.I.A. = sólidos insolúveis em álcool; A.M. = alta metoxilação; B.M. = baixa metoxilação e Prot. = protopectina.

4.2 Cajá – *Spondias mombim*

A cajazeira, também conhecida por taperebá ou cajazeira-mirim, é uma árvore com cerca de 20 metros de altura. Suas folhas possuem 20 cm a 30 cm de comprimento e 7 a 17 folíolos. O fruto, conhecido por cajá, taperebá ou cajá-mirim é uma drupa com até 6 cm de comprimento, casca amarelada e lisa, cuja polpa é mole e ácida. Cresce bem em quase todo o território brasileiro,

preferindo climas úmidos e subúmidos, quentes e temperados quentes(Gomes, 1985). Morton (1987) descreve o cajá, *Spondias mombin*, como sendo nativo de florestas tropicais que vão do Sul do México até o Peru e Brasil. Algumas das sinónimas para o cajá são: hog plum e spanish plum, no Caribe; caimito e ciruela amarilla, na Espanha; mombim franc ou prune mombim, na França; e cajá-mirim, acajá e taperebá, no Brasil. O cajazeiro alcança até trinta metros de altura, com tronco medindo entre 60 cm e 75 cm de diâmetro. Possui folhas penadas com 20 cm a 45 cm, contendo de 6 a 17 folíolos. Os frutos são ovais ou elípticos, com 3 cm a 4 cm de comprimento e 2,5 cm de largura, coloração amarela intensa e brilhante (Morton, 1987; Andersen e Andersen, 1988; Campbell, 1996).

Joas (1982), menciona que a polpa de cajá pode ser usada no preparo de bebidas levemente ácidas, com agradável sabor, que é muito apreciado pelos europeus. Gomes (1985) descreve o fruto da cajazeira como sendo saboroso e refrescante, apropriado para a produção de geléias, compotas, refrescos e sorvetes. Do suco se faz boa aguardente e um licor delicado. Cita, ainda, que a cajazeira é uma fruteira com potencial, mas é subestimada e merece um investimento maior na sua utilização. Morton (1987) acrescenta que, além do sorvete e do suco, na região amazônica o cajá é muito utilizado para a produção de vinho de fruta.

Arkcoll (1990), em um estudo sobre perspectiva de espécimes vegetais brasileiras, em especial as amazônicas (tropicais) com possível viabilidade comercial, cita, entre outras, o cajá, *Spondias lutea*, o capuaçu, *Theobroma grandiflorum*, a graviola, *Annona muricata*, e o araçá-boi, *Eugenia stipitata*. O cajá ou taperebá é uma das mais populares frutas das regiões Norte e Nordeste do Brasil, gerando ótimos sucos e sorvetes. O capuaçu, cuja polpa é muito apreciada na região Amazônica, é muito utilizado na fabricação de doces, sorvetes e sobremesas. A graviola, muito apreciada em vários países da América

Latina, principalmente pelo seu suco, é utilizada no fabrico de sorvetes e também iogurtes. Campbell (1996) comenta que o sabor do cajá é considerado inferior ao da siriguela (*Spondias purpurea*), tendo um melhor aproveitamento quando processado, em relação a ser ingerido fresco.

A Tabela 2 reapresenta a caracterização do fruto de cajá em dois estádios de maturação.

TABELA 2 Caracterização do fruto de cajá em dois estádios de maturação

Características	Predominantemente amarelo			Amarelo		
	A.M.	B.M.	Prot.	A.M.	B.M.	Prot.
Peso Total (g)		15,91			19,92	
Polpa + Casca (%)		81,58			81,65	
Semente (%)		18,42			18,34	
Comprimento (mm)		39,70			43,10	
Diâmetro (mm)		28,10			32,20	
Sólidos Solúveis Totais (°Brix)		10,30			11,56	
Acidez Total Titulável (%)		1,07			1,03	
Sólidos Solúveis/Acidez		9,56			11,23	
pH		3,10			3,17	
Açúcares Solúveis Totais (%)		7,22			8,41	
Açúcares Redutores (%)		6,28			7,65	
Amido (%)		1,92			0,52	
Pectina Total(%)		0,13			0,28	
Pectina Solúvel(%)		0,09			0,07	
Pectina Fracionada	A.M.	B.M.	Prot.	A.M.	B.M.	Prot.
(% - em relação aos SIA)	9,75	0,87	1,09	10,30	2,1	2,21
Pectinametilsterase (UAE)		305,22			362,31	
Poligalacturonase (UAE)		19,78			18,32	
Vitamina C Total (mg/100g)		36,87			36,86	
Fenólicos Solúveis em Água (%)		0,10			0,12	
Fenólicos Solúveis em Metanol (%)		0,10			0,11	
Fenólicos Solúveis em Metanol 50% (%)		0,13			0,14	

Fonte: Filgueiras, Moura e Alves, 2000. Obs.: S.I.A. = sólidos insolúveis em álcool; A.M. = alta metoxilação; B.M. = baixa metoxilação; U.A.E. = unidade de atividade enzimática e Prot. = protopectina.

4.3 Ação enzimática

4.3.1 Parede celular de frutos

A parede celular de frutos é uma das mais importantes estruturas que os constituem. É responsável pela manutenção da integridade celular. A composição da parede depende do tipo de fruto, ou vegetal, das condições agrônômicas e climáticas e dos processos de estocagem dos mesmos. É constituída de três estratos principais: lamela média, parede primária e parede secundária. A lamela média é constituída de pectina solúvel, principalmente, e atua mantendo a coesão entre as células; a parede primária, cujo componente principal é a protopectina, é uma rede rígida composta de feixes de celulose cristalina com lignina embebida. Esta matriz amorfa fica flutuando num gel aquoso composto de diferentes frações de hemiceluloses e pectinas, as quais estão ligadas a xiloglicanas. Do rompimento da parede celular obtém-se o suco e favorece-se a ação de enzimas cuja ação é clivar os polissacarídeos constitutivos da parede (Goodwin e Mercer, 1990; Taiz e Zeiger, 1991; Grassin e Fauquembergue, 1996).

4.3.2 Produção de enzimas

As enzimas utilizadas em vinificação são produzidas a partir de microorganismos selecionados, normalmente dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma*. A tecnologia de produção é variável com a companhia que as comercializa, sendo a fermentação submersa e a fermentação em superfície dois métodos básicos (Villettaz e Dubourdier, 1991). Segundo Godfrey e West (1996), cerca de 90% das enzimas para uso industrial são produzidas a partir da fermentação microbiana.

4.3.3 Utilização das enzimas

Vidal-Barraquer (1978) cita que as enzimas pectinolíticas têm grande influência na estabilização dos vinhos, visto que a grande maioria dos colóides, os quais podem interferir nesta estabilização, têm, em sua constituição, carboidratos (ácidos galacturônico e glicurônico, galactose, manose, arabinose, ramnose glicose e xilose) formando polímeros. Estas enzimas podem ser de origem endógena, presentes na uva, ou exógena, quando preparações industriais são adicionadas. A adição de enzimas pectinolíticas tem duas ações distintas: preventiva, no caso da termovinificação (em que as enzimas endógenas foram inativadas pelo calor), e curativa, que facilita a clarificação dos vinhos e também a filtração dos mesmos. Ough e Crowell (1979) demonstraram que os mostos de uva tratados com enzimas pécticas tiveram um aumento significativo no rendimento do suco e os vinhos, então elaborados, deram resultados qualitativos iguais ou superiores aos não tratados. Além disso, os processos de clarificação e filtração foram facilitados. Houve, entretanto, um aumento na concentração de metanol, o que era esperado. Segundo Lee, Smith e Nelson (1979), a pectinametilesterase (PME) hidrolisa os grupos metil-éster do carbono 6 das unidades de ácido galacturônico constituintes da pectina, liberando metanol. Esta reação é ótima num pH 7,5, ocorrendo, também, a pH 5,0. A formação de metanol será proporcional à quantidade desta enzima presente no mosto, bem como à concentração de pectina presente na casca da uva e ao pH e à temperatura do mosto.

A atuação de enzimas pécticas sobre o mosto promove o desdobramento da pectina em suas subunidades menores, o que leva à diminuição da viscosidade. Com a diminuição da viscosidade, alguns efeitos desejados, como melhores clarificação e filtração e maior extração do suco, são alcançados (Vogt, Jakob, Lemperle et al., 1986; Ough, 1996).

Villettaz e Dubourdier (1991) descrevem as enzimas como sendo peças de fundamental importância nos processos de vinificação. Sem elas, as uvas jamais se tornariam vinho. Recordam que nem todas as enzimas presentes naturalmente nas uvas, ou que são produzidas pelos microorganismos envolvidos na fermentação, são benéficas para a qualidade do vinho; algumas podem ocasionar defeitos na bebida. Algumas preparações enzimáticas comerciais estão sendo desenvolvidas para complementar a ação das enzimas naturais das uvas, melhorando a qualidade de sucos e vinhos e reduzindo custos operacionais.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Polpas

As polpas de cacau e cajá utilizadas neste trabalho provieram do CEPEC/CEPLAC (Centro Pesquisa do Cacau/Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira), Itabuna, BA. As polpas de cajá e cacau foram extraídas por meio de uma despulpadeira automática (ITAMETAL 0.5 DS, Itabuna - BA). Após esta fase, as polpas foram embaladas em sacos plásticos de 500g e 1000 g e congeladas a -70 °C, em nitrogênio líquido, não sendo adicionadas de qualquer aditivo químico. As polpas, congeladas e em caixas isolantes, foram enviadas, por via aérea, até Belo Horizonte, de onde foram encaminhadas para Lavras por transporte rodoviário. Foram estocadas, a -20 °C em congelador, no Laboratório de Microbiologia do DBI-UFLA.

Para a preparação do mosto, passo inicial da elaboração da bebida, as polpas foram descongeladas, por 24 h, à temperatura ambiente.

5.2 Preparo e correções do mosto

O preparo dos mostos a fermentar foi semelhante para as duas polpas de frutas testadas. Depois de descongeladas, por 24 h à temperatura ambiente, os sacos plásticos contendo as polpas foram limpos e secos. Um volume de polpa foi transferido para uma dorna fermentativa de aço inox. O grau Brix da polpa foi aferido por meio de um refratômetro. O passo seguinte foi chaptalizar o mosto para obter uma bebida cujo teor alcoólico estivesse entre 10 °GL e 13 °GL. O volume de mosto a fermentar, tanto para cajá quanto para cacau, foi de 20 litros.

5.2.1 Chaptalização

A chaptalização do mosto ocorreu a partir da observância do °Brix inicial das polpas. A partir deste valor, um volume da polpa foi adicionado de igual volume de solução de sacarose cuja concentração, em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, era calculada em função de obter-se o °Brix desejado no mosto (Cataluña, 1988; Rizzon, Zanus e Manfredini, 1994). Foi utilizada sacarose comercial, açúcar cristal, para o preparo da solução. Esta solução foi preparada segundo Cataluña (1988): cada 25 g de sacarose adicionados a um volume final de 1L elevam o °Brix do mosto em, aproximadamente, duas unidades. No preparo desta, a água foi aquecida a aproximadamente 30 °C para facilitar a dissolução do dissacarídeo. O °Brix final nos mostos foi de 24 para o de cajá e de 22 para o de cacau.

5.2.2 Desacidificação e tratamento enzimático

Houve a necessidade da desacidificação química do mosto em função do tratamento enzimático ao qual o mesmo foi submetido. O carbonato de cálcio (CaCO_3) foi empregado como agente desacidificante. Uma massa deste sal foi inicialmente dissolvida em 500 mL de mosto que, posteriormente, foi adicionado ao volume total a ser fermentado. O CaCO_3 foi adicionado até que o pH do mosto atingisse um valor de $4,5 \pm 0,5$, condição necessária para a atuação das enzimas. As variações de pH foram acompanhadas por medições em potenciômetro digital (marca Micronal, modelo B-474).

Para o tratamento enzimático, foi utilizada a preparação Ultrazym^R AFP-L (Novo Nordisk Ferment Ltd, Dinamarca). Esta solução é composta por duas enzimas, poligalacturonase (E.C.3.2.1.15) e celulase (E.C.3.2.1.4), sendo indicada para o tratamento de polpas de frutas, facilitando a clarificação da bebida. A concentração utilizada foi a sugerida pelo fabricante (Tabela 3). A solução de enzimas foi adicionada após as correções de acidez e temperatura. O

experimento foi conduzido à temperatura de 22 °C, utilizando-se 0,7 mL de Ultrazym^R AFP-L por Kg de mosto.

TABELA 3 Concentração de Ultrazym^R AFP-L a ser utilizada no mosto em função da temperatura e tempo de atuação.

Faixa de temperatura (°C)	Ultrazym ^R AFP-L (mL·Kg ⁻¹)	Tempo de ação (horas)	Faixa de pH
20 – 30	0,5 – 0,7	8 (pelo menos)	4,5 ± 0,5
40 – 50	0,3 – 0,5	2	

Fonte: Novo DK, 1998.

5.2.3 Sulfitação

O SO₂ foi adicionado ao mosto na forma de metabissulfito de potássio (K₂S₂O₅), um sal cristalino que, na prática, rende 50% de seu peso em dióxido de enxofre. A concentração máxima de SO₂ total no vinho, permitida por lei, é de 350 mg·L⁻¹ (Brasil, 1988). Neste experimento, foram utilizados 100 mg de SO₂ por litro de mosto, ou 200 mg de K₂S₂O₅·L⁻¹ de mosto. Esta massa de metabissulfito foi diluída em 500 mL de mosto e adicionada de uma só vez à dorna, logo após a correção do pH.

5.2.4 Colagem

A bentonite foi adicionada ao mosto na concentração de 1 g·L⁻¹, segundo Vogt et al. (1986), a partir de uma solução* estoque a 10% em água destilada. A solução foi adicionada ao mosto no início da fermentação, permanecendo durante todo o processo fermentativo.

* A solução estoque de bentonite a 10% deve ser preparada com, no mínimo, 24 horas de antecedência, para que haja dissolução da mesma. Após o preparo, a solução deve ser homogeneizada em moinho coloidal. Deve-se, também, homogeneizá-la no momento da coleta do volume para adição ao mosto.

Feita a colagem, a dorna foi levada à estufa para estabilização da temperatura a 22 °C.

5.2.5 Inoculação

A levedura *Sc₂*, selecionada anteriormente, foi utilizada para fermentar os mostos de cajá e cacau. A população inicial de 10⁷ células viáveis por mL foi obtida seguindo-se as orientações do fabricante. Para reativação da massa celular, 5 g de levedura liofilizada foram dissolvidas em 50 mL de água a 40 °C. Agitou-se por 30 min. Aguardou-se a estabilização da temperatura da solução de leveduras aos 22 °C, mesma temperatura do mosto, e adicionou-se a mesma aos 20 litros de mosto. Após a inoculação, foi feita uma contagem em câmara de Neubauer para confirmar a população celular.

5.3 Fermentação

Após o preparo e as devidas correções, bem como a inoculação, a dorna de inox foi vedada com lâminas de papel alumínio e os 20 litros de mosto foram levados a uma estufa tipo B.O.D., cuja temperatura foi estabilizada a 22°C (temperatura selecionada anteriormente). A cada dia da fermentação, foi coletada uma amostra do mosto para contagem de células e determinação do grau Brix, após centrifugação. Também foi observado o vigor da fermentação em função da liberação de CO₂. O final da fermentação foi determinado pela estabilização do valor do grau Brix, obtido pela leitura em refratômetro de Brix, segundo Ough (1996).

5.4 Trásfega

Ao final da fermentação, a temperatura da estufa foi regulada para 10 °C, para facilitar a sedimentação do material sólido proveniente da fermentação dos mostos de fruta tropical. Depois de 10 dias a esta temperatura, foi feita uma

trasfega na bebida, com aeração (Rizzon, Zanus e Manfredini, 1994). Após esta primeira trasfega, a bebida foi recolocada à temperatura de 10 °C por mais 30 dias. Ao final destes 30 dias, foi feita a segunda trasfega, sem aeração. A bebida ficou mais 10 dias à temperatura de 10 °C.

5.5 Filtração

Após a segunda trasfega e findos os últimos 10 dias da bebida à temperatura de 10 °C, a bebida foi filtrada sob vácuo em frasco tipo Kitassato, de 4 litros de volume, ao qual foi acoplado um funil tipo Büchner. Para a filtração foi utilizado, primeiramente, filtro de celulose. Após a primeira filtração, a bebida foi submetida à filtração em terra de diatomáceas entremeadas a filtros de celulose. Terminada a filtração, a bebida foi acondicionada em garrações de vidro com capacidade para 5 litros e armazenada a 12 °C, em B.O.D. Um volume de 1 litro das bebidas foi reservado para as análises químicas posteriores.

O atesto foi feito pelo preenchimento total da capacidade do garrafão, minimizando a quantidade de oxigênio. A presença deste agente oxidante poderia levar à formação de defeitos na bebida, como o avinagramento (Pato, 1982).

5.6 Análises na bebida

As bebidas foram analisadas à temperatura ambiente, após terem sido retiradas do refrigerador (12 °C) com pelo menos 24 horas de antecedência. Nos testes realizados na Colômbia, as amostras foram transportadas por via aérea, à temperatura ambiente.

5.6.1 Análises químicas

A caracterização química das bebidas é necessária para observar se há concordância entre os limites estabelecidos por lei e a concentração dos analitos no produto obtido. É lembrado que não há uma legislação específica para as bebidas de cajá e cacau. Entretanto, há para vinho e outras bebidas alcoólicas oriundas da fermentação, as quais foram tomadas como parâmetro. As análises ocorreram entre junho de 2000 e fevereiro de 2001.

Abaixo estão os laboratórios em que foram feitos os testes nas bebidas.

Laboratório de Enologia e Viticultura (Fazenda Experimental da EPAMIG, Caldas-MG, Brasil): Teor alcoólico (°GL), acidez total, acidez volátil, acidez fixa, dióxido de enxofre total, dióxido de enxofre livre e extrato seco a 100 °C.

Laboratório de Microbiologia (UFLA/DBI, Lavras-MG, Brasil): Determinações de pH, açúcares redutores (glicose, frutose), açúcares não redutores (sacarose), glicerol, etanol e ácidos orgânicos (acético, láctico, málico, succínico e tartárico).

Corpoica (Medelin, Colômbia): Acetaldeído, álcoois superiores (propanol, isobutanol, butanol, isoamílico, amílico e hexanol), ésteres (acetato de etila e acetato de metila) e metanol.

5.6.1.1 Etanol e glicerol

A concentração de etanol nas amostras foi determinada de duas maneiras distintas:

Alcoômetro de Gay-Lussac

O teor alcoólico, ou grau alcoólico, foi obtido seguindo-se a metodologia proposta por Brasil (1985), segundo a qual um volume da amostra é destilado e três quartos do volume são recuperados e recompostos ao volume tomado para análise. Este volume foi resfriado a 20 °C e o grau alcoólico foi determinado

usando-se um alcoômetro de Gay-Lussac, cuja escala variava de 0 °GL a 30 °GL, aferido àquela temperatura.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A concentração de etanol ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A metodologia utilizada foi modificada a partir de Shimadzu (1998) e Schwan et al. (2001). Foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu, modelo LC-10Ai (Shimadzu Corp., Japão), equipado com detectores de índice de refração, modelo RID-10A, e de ultravioleta, modelo SPD-10Ai. A coluna utilizada foi o modelo Shim-pack SCR-101H (Shimadzu).

A coluna operou à temperatura ambiente, tendo como fase móvel o ácido perclórico na concentração 100 mM a um fluxo de $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Os resultados foram detectados através do detector de índice de refração.

A quantificação foi realizada a partir da comparação com curvas de calibração, determinadas utilizando padrões certificados da marca Supelco.

Para as análises cromatográficas, as amostras foram tratadas do seguinte modo: retiradas do refrigerador a 10 °C e colocadas à temperatura ambiente por, aproximadamente, 4 h antes da análise em CLAE. Depois de estabilizada a temperatura, 100 μL das amostras foram diluídos 100 vezes, em água mili-Q, e filtrados em membrana ultrafiltrante (nitrato-celulose) de porosidade 0,20 μm , marca Sartorius. Foram utilizados 20 μL da amostra para a corrida cromatográfica, injetados manualmente.

A concentração de glicerol ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) nas amostras foi determinada desta mesma maneira.

5.6.1.2 Álcoois superiores, metanol, acetaldeído e ésteres

Os álcoois superiores (propanol, isobutanol, butanol, isoamílico, amílico e hexanol), metanol, acetaldeído e ésteres (acetato de metila e acetado de etila)

nas amostras das bebidas foram determinados por cromatografia gasosa (CG). Os valores destes compostos foram determinados por cromatografia gasosa, utilizando uma metodologia modificada a partir de Boscolo et al (2000). O cromatógrafo utilizado foi da marca Chromopack, modelo 511, equipado com detector de chama ionizada. As condições da corrida foram as seguintes: detector e injetor operando a 250 °C, coluna capilar (marca Wasc, modelo 52 CB) operando em gradiente de temperatura (55 °C durante 5 min; elevação de 2 °C·min⁻¹ até chegar aos 100 °C. 100 °C por 3 min; elevação de 5 °C·min⁻¹ até a temperatura de 190 °C. 190 °C durante 30 min; elevação de 5 °C·min⁻¹ até a temperatura de 220 °C. 220 °C durante 15 min), tendo como gás de arraste o hidrogênio a um fluxo de 1,2 mL·min⁻¹. Para as análises, 100 µL das amostras foram diluídos 20 vezes, em água mili-Q, e filtrados em membrana ultrafiltrante (nitrato-celulose) de porosidade 0,20 µm, marca Sartorius. Foi utilizado 1,0 µL da amostra para a corrida cromatográfica. As quantificações foram determinadas a partir da comparação com curvas de calibração (padrão interno) dos analitos.

5.6.1.3 Ácidos orgânicos

Os ácidos acético, láctico, málico, succínico e tartárico foram determinados pela técnica de CLAE, modificada a partir de Shimadzu (1998) e Schwan et al. (2001), como fora descrito no item 5.6.1.1. Para a determinação dos ácidos orgânicos, a coluna operou à temperatura de 50 °C, a fase móvel também foi ácido perclórico 100 mM, a um fluxo de 1,0 mL·min⁻¹, operando à temperatura ambiente. Neste caso utilizou-se o detector de ultravioleta, com comprimento de onda selecionado em 210 nm. O detector utilizado para o registro dos picos dos ácidos foi o de ultravioleta (U.V), modelo SPD-10Ai.

5.6.1.4 Acidez total

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

5.6.1.5 Acidez volátil

Um volume da amostra foi destilado por arraste de vapor e recolheram-se dez vezes o volume de destilado num frasco tipo Erlenmeyer. O destilado foi, então, titulado com solução de hidróxido de sódio 0,1 N, tendo solução alcoólica de fenolftaleína 1% como indicadora. A análise foi realizada conforme Brasil (1985) e os resultados foram expressos em miliequivalentes de ácido acético por litro de bebida ($\text{meq}\cdot\text{L}^{-1}$).

5.6.1.6 Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH das amostras foi determinado diretamente, a 20°C. O potenciômetro utilizado foi da marca Micronal, modelo B-474, calibrado com soluções tampão ácida e neutra, com valores de pH, respectivamente, 4,00 e 7,00 (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

5.6.1.7 Anidrido sulfuroso total e anidrido sulfuroso livre

Os valores de dióxido de enxofre total e livre foram determinados pelo método de Ripper, descrito por Ough (1996). Utilizou-se solução de iodo a 0,02 N como titulante da amostra tratada e, como indicadora do ponto final de titulação, solução de amido 1%. Os valores foram apresentados em gramas de dióxido de enxofre por litro de bebida ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

5.6.1.8 Açúcares redutores (glicose e frutose) e não redutores (sacarose)

As concentrações de glicose, frutose e sacarose (todos em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando uma metodologia modificada a partir de Shimadzu (1998) e Schwan et al. (2001), como já descrito no item 5.6.1.1, utilizando-se o detector de índice de refração, modelo RID-10A, para registro dos picos.

5.6.1.9 Açúcares totais

O valor de açúcares totais foi determinado pela soma algébrica dos valores anteriormente encontrados para glicose, frutose e sacarose. Os valores foram expressos em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

5.6.2 Análise sensorial

Seleção dos provadores

Para a execução dos testes de aceitabilidade das bebidas, foram selecionados 45 provadores não treinados. Para a seleção, foi feita uma triagem em que os provadores foram questionados quanto a *gostar* ou *não gostar* de bebidas alcoólicas secas (cujo teor de açúcares é inferior a $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Os provadores que constituíram o grupo dos que *não gostavam* de bebida seca não participaram da análise, obviamente. O corpo de provadores constituiu-se de alunos e professores das instituições Fundação Educacional de Lavras (FELA-UEMG) e Universidade Federal de Lavras (UFLA), com faixa etária entre 18 anos e 58 anos, do sexo masculino e do sexo feminino.

Degustação

Cada um dos provadores experimentou 20 mL de cada uma das bebidas, que foram codificadas como 1 e 2 para cajá e cacau, respectivamente. As amostras foram servidas, separadamente, à temperatura de $10 \text{ }^\circ\text{C}$ aproximadamente, às 10.30 horas, em copos plásticos descartáveis. Foi

solicitado aos provadores que tomassem água antes de provar a segunda amostra. Para cada uma das amostras, os provadores preencheram uma ficha (Figuras 1A e 2A) de avaliação na forma de escala hedônica de nove pontos (Moraes, 1993). Em um primeiro julgamento (Figura 1A), os provadores avaliaram os atributos separadamente (aparência, aroma e sabor). O segundo julgamento (Figura 2A) foi em relação à aceitação global da bebida.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Preparo do mosto

Neste experimento, as polpas de cacau e cajá foram processadas para obter um mosto fermentescível, a partir do qual a bebida alcoólica foi obtida. Os mostos sofreram algumas correções ou preparos prévios antes do processo fermentativo ser, de fato, iniciado.

6.1.1 Chaptalização

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

A correção do valor de açúcares no mosto foi calculada para um valor final de 24 °Brix para o mosto de cajá e 22 °Brix para o mosto de cacau. A partir da observação do °Brix dos polpas de cacau e cajá, respectivamente 16 e 12, utilizou-se uma solução de sacarose para a correção. Como foram preparados 20 L de mosto, partindo-se de 10 L de polpas das frutas, os quais foram adicionados de 10 L de solução de sacarose, o grau Brix das polpas foi fundamental para a chaptalização. A Tabela 4 mostra as correções com sacarose feitas nos mostos de cacau e cajá. Os valores do °Brix final, obtidos nos mostos de cacau e cajá, são concordantes com os descritos por Catalunã (1988) e Rizzon, Zanus e Manfredini (1994).

Notou-se, porém, uma ligeira diferença quando comparados os valores de grau alcoólico final da bebida, sendo observado que para cacau e cajá os valores de etanol final foram 52% e 50%, respectivamente, do teor de sólidos solúveis, °Brix, em contraste com valores teóricos de 60% descritos por

Cataluña (1988) e Hashizume (1993) para o rendimento alcoólico a partir dos mostos de uva.

TABELA 4 Utilização de sacarose para chaptalização dos mostos de cacau e cajá.

Fruta	°Brix da polpa	Volume de polpa	Sacarose adicionada (g/L)	Volume de mosto	°Brix do mosto	Grau alcoólico da bebida (°GL)
Cacau	16	10 L	350	20 L	22	11,5
Cajá	12	10 L	450	20 L	24	12,0

Estes resultados podem ter sido em função da própria composição química das frutas. Quando observada a concentração de açúcares solúveis totais nas três frutas em questão, cacau, cajá e uva, percebem-se maiores valores para esta última, seguida pelo cacau e, finalmente, pelo cajá. Os valores médios de açúcares solúveis são os seguintes: 250,0 g·L⁻¹ na uva (Vogt et al., 1986), 174,0 g·L⁻¹ no cacau (Schwan, Souza e Mendonça, 2000) e 84,1 g·L⁻¹ no cajá (Filgueiras, Moura e Alves, 2000). Salienta-se que estes valores de açúcar nas frutas estão estritamente relacionados ao estágio de maturação das mesmas, bem com da cultivar avaliada. Neste aspecto, segundo Camargo (1994) e Rizzon, Manfroi e Meneguzzo (1998), todo um estudo há para a produção do vinho, bem como seleção de cultivares de uva para mesa e para a obtenção de suco.

Como a determinação do Brix refratométrico indica sólidos solúveis, não necessariamente constituídos de açúcares na sua totalidade, os valores obtidos para cacau e cajá inferem que no °Brix inicial estão substâncias não fermentescíveis, as quais, como já comentado, podem ter diminuído o rendimento alcoólico final da bebida.

6.1.2 Tratamento enzimático

O tratamento enzimático de sucos, polpas e mostos de frutas já é utilizado a algum tempo no setor industrial. Como apontado por Colagrande, Silva e Fumi. (1994), o uso de enzimas endógenas adicionadas ao mosto tem a função de suprir as deficiências enzimáticas, sejam de fruta, sejam do microrganismo, quando da existência de um processo fermentativo. Kashyap et al. (2001) mencionam que o uso de enzimas pécticas foi utilizada pela primeira vez, em 1930, na preparação de vinhos e sucos de frutas.

Na elaboração das bebidas de cacau e cajá, o tratamento enzimático do mosto favoreceu a clarificação da bebida. Para o tratamento enzimático, foi necessária a correção da acidez do mosto, visto que o complexo enzimático Ultrazym^R AFP-L (Novo DK), constituído de poligalacturonases e celulases, tem uma ação ótima em pH $4,5 \pm 0,5$ e os valores de pH dos mostos de cacau e cajá foram, respectivamente, de 3,58 e 2,56. A correção foi feita com CaCO_3 cristalino. A Figura 1 mostra volumes de mosto de cacau e cajá para os quais uma parcela sofreu tratamento enzimático e a outra parcela não sofreu, antes do início da fermentação, sob temperatura de 22 °C durante oito horas. A adição de Ultrazym AFP-L na concentração de $0,7 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ de mosto trouxe uma melhora visual nos mostos tratados em função da ação das poligalacturonases, que são pectinases, sobre as cadeias de ácido poligalacturônico de pectinas presentes nas polpas que originaram os mostos e que podem ser responsáveis pela turbidez do suco ou bebida. Esta turbidez é gerada pelas fibras vegetais insolúveis, *e.g.* celuloses, hemiceluloses e pectinas. Gómez-Ruiz, Garcia-Garibay e Barzana (1988), obtiveram resultados semelhantes no aspecto visual de sucos de maçã tratados com endopoligalacturonases.

Observou-se, a partir da Figura 1, que a parte líquida do mosto de cacau tratado ficou na parte inferior do tubo, enquanto o inverso foi observado no mosto de cajá. Uma das razões pode ser o fato de a polpa de cacau conter menor

quantidade de pericarpo em relação à de cajá. Uma outra influência pode ter sido o excesso de mucilagem, heteropolissacarídeos, presentes no mel de cacau, que em função da coesão e das características químicas, apresentam uma maior densidade que o próprio material particulado.

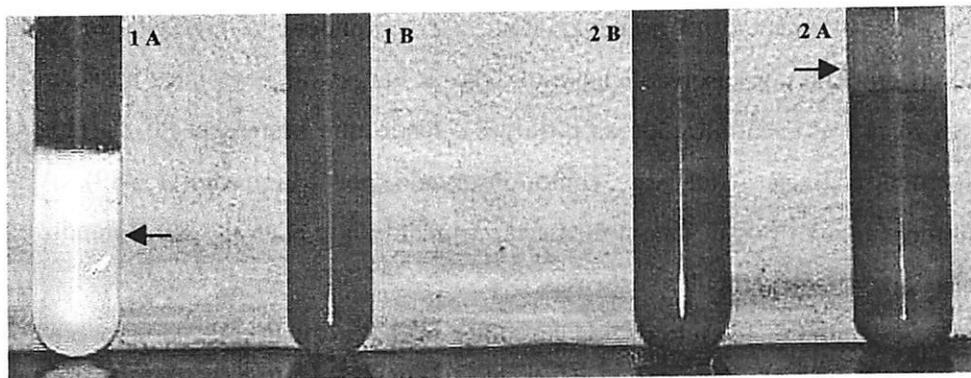


FIGURA 1 Tratamento enzimático dos mostos de cacau e cajá em pH 4,5. 1A, cacau com enzima e 1B, cacau sem enzima; 2A, cajá com enzima e 2B, cajá sem enzima.

Após este experimento inicial, as enzimas foram adicionadas ao mosto no início da fermentação, que ocorreu a 22 °C, não sendo inativadas por ação do calor. O tratamento enzimático facilitou o processo de clarificação por promover a cisão dos polissacarídeos presentes no mosto, provavelmente liberando dextrinas.

6.1.3 Colagem

Como descrito por Puig-Deu et al. (1999), a adição das chamadas colas, agentes que promovem a sedimentação de material particulado em suspensão nos vinhos, visa, com o processo de tratamento enzimático, facilitar a

clarificação do produto final. Além disso, elas promovem o aumento da estabilidade da bebida contra alterações de temperatura e oxidações, seja durante o envelhecimento da bebida, seja na vida de prateleira da mesma.

Visando estes benefícios, as bebidas de cacau e cajá foram adicionadas de bentonite na concentração de 1%. A bentonite utilizada partiu de uma solução aquosa da mesma na concentração de 10%, o que facilitou a dispersão da argila no mosto a fermentar. O principal efeito da bentonite é a precipitação do material protéico por adsorção e neutralização de cargas (as bentonites possuem cargas negativas, neutralizando as positivas), sendo que neste aspecto ela atua inativando enzimas oxidativas, como observado por Manfredini (1989). A bentonite também possui uma ação física, à medida que ela vai sedimentando, carrega consigo as partículas suspensas.

A bentonite foi introduzida aos mostos de cacau e cajá na fase pré-fermentativa. Sua ação proporcionou uma melhor clarificação da bebida por facilitar a sedimentação da parte sólida do mosto, tornando mais fáceis as trasfegas e a filtração.

6.1.4 Sulfitação

Este procedimento tem por base atuar sob vários aspectos do controle da obtenção de bebidas (antioxidante, antimicrobiano, clarificante). A sulfitação pode ocorrer pelo uso de várias formas químicas de dióxido de enxofre. As duas principais formas utilizadas nos processos de vinificação são a forma líquida, SO₂ líquido, que rende 100% de SO₂ (este também pode ser liberado na forma gasosa), e a forma cristalina (metabissulfito de potássio), para a qual o rendimento em SO₂ é próximo de 50%.

Os mostos de cacau e cajá foram sulfitados partindo-se de metabissulfito de potássio cristalino (K₂S₂O₅ 98% puro). A concentração utilizada foi de 100 mg de SO₂ por litro de mosto, cerca de 200 mg de K₂S₂O₅. Estes valores,

considerados elevados para iniciar a fermentação, foram adotados pois, segundo Hashizume (1993), dependendo do valor do pH do mosto, a quantidade de SO_2 deve ser alterada, sendo necessário mais SO_2 a pH mais elevado, e.g. 3,0 g de $\text{SO}_2 \cdot \text{hL}^{-1}$ a pH 3,0 e 20 g de $\text{SO}_2 \cdot \text{hL}^{-1}$ a pH 3,8. Como os mostos de cacau e cajá tiveram seu valor de pH corrigido para $4,5 \pm 0,5$, o teor inicial de metabissulfito de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$) utilizado foi superior àqueles normalmente preconizados, porém não proporcionais aos descritos por Hashizume (1993).

Nesta concentração de SO_2 utilizada ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de mosto, ou $10 \text{ g} \cdot \text{hL}^{-1}$ de mosto), foi observado um atraso no início da fermentação de cerca de 12 horas, concordando com o que foi descrito por Gerbaux e Meurgues (1995). Estes autores obtiveram um atraso no início da fermentação quando trataram o mosto de uvas com concentrações de SO_2 superiores a $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Também foi observado que após o início da fermentação, o transcurso da mesma não foi afetado, o que mostrou resultados concernentes aos apontamentos também feitos pelos autores supracitados.

Nesta concentração utilizada, $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, o SO_2 mostrou uma eficiência no controle microbiano. Durante as contagens de células, no transcurso da fermentação, não foi observada a presença de bactérias. Uma outra evidência da ausência de contaminação, neste caso pelas bactérias do ácido lático, foi a não detecção de ácido lático e a presença de ácido málico nas bebidas de cacau e de cajá nas análises feitas em CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência). A partir destas observações, constatou-se que mesmo no pH inicial elevado, o SO_2 manteve sua atividade, não necessariamente nos valores propostos por Hashizume (1993).

6.2 Fermentação do mosto

Depois das correções feitas aos mostos, o passo seguinte foi iniciar a fermentação dos mesmos. Para isto foram utilizados alguns parâmetros

anteriormente selecionados, como a temperatura de fermentação e a estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* que constituiria o inóculo inicial.

A temperatura selecionada anteriormente, de 22 °C, foi utilizada para a fermentação dos mostos de cacau e cajá. Em relação à estirpe da levedura, os resultados evidenciaram não haver diferenças significativas quanto à produção de etanol e de glicerol em função da biomassa das *S. cerevisiae* testadas. Sob estas condições, empregou-se a estirpe Sc₂ para a elaboração das bebidas. O inóculo empregado rendeu um número de cel. \cdot mL⁻¹ próximo de 10⁷, ideal para iniciar uma fermentação, segundo Amerine e Cruess (1960) e Pato (1982). A condução do experimento em estufa tipo B.O.D. permitiu a estabilidade dos 22 °C, verificados por tomada diária da temperatura em termômetro de mercúrio.

A Figura 2 representa o fluxograma da elaboração das bebidas de cacau e cajá.

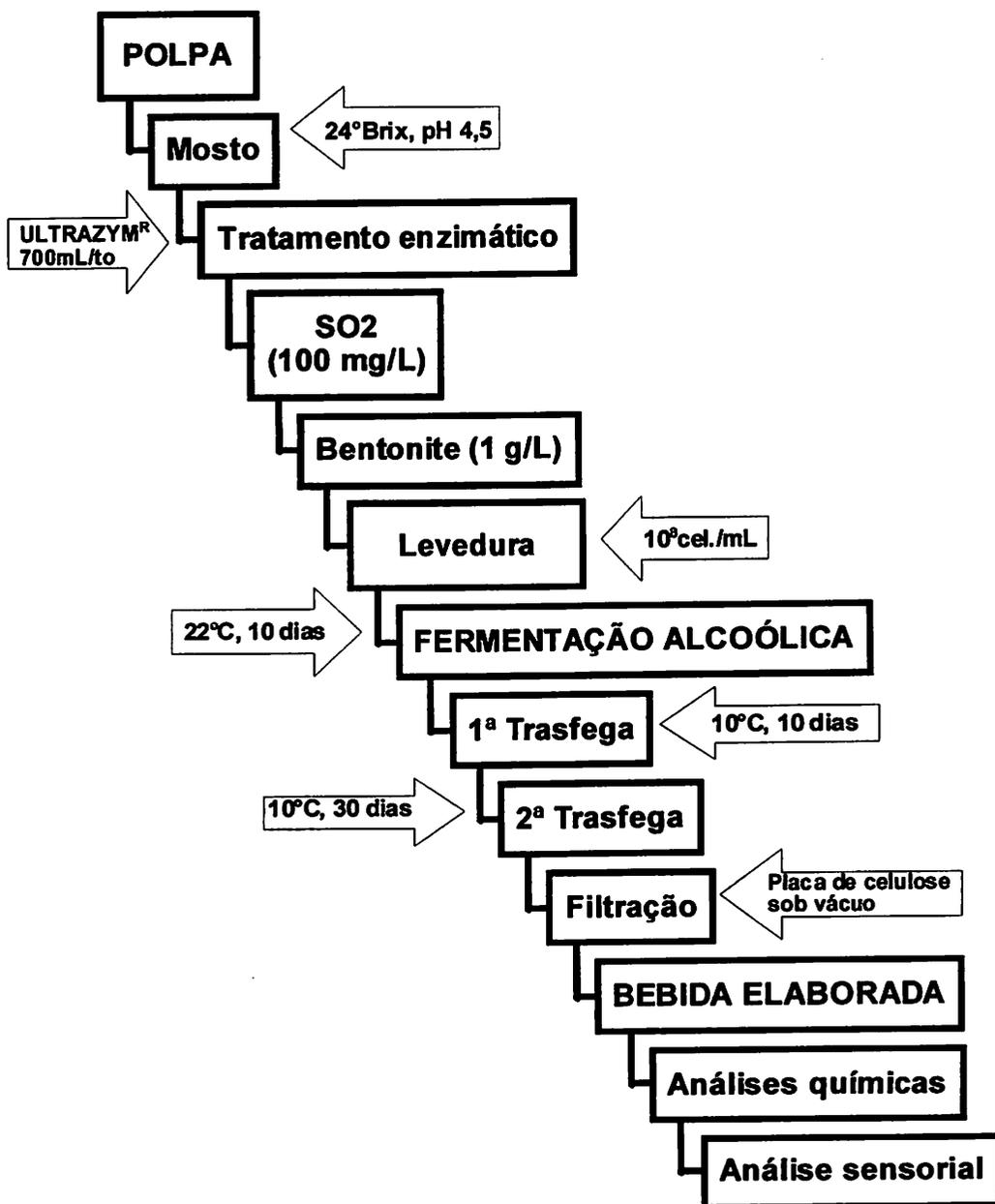


FIGURA 2 Fluxograma do processo de elaboração de bebida fermentada de frutas tropicais.

6.3 Análises químicas das bebidas

As análises químicas realizadas nas bebidas de cacau e cajá mostraram resultados próximos àqueles estabelecidos para vinhos de mesa (Tabela 5). Observou-se que dentro dos parâmetros analisados, as duas bebidas estariam em conformidade com a legislação para vinhos. Apesar de serem frutas bem diferentes, os índices utilizados para a qualificação da bebida estão muito envolvidos com os cuidados tomados durante o processo de elaboração das mesmas, apontando que dentro das condições tratadas no experimento os resultados foram satisfatórios em relação à metodologia proposta.

As bebidas obtidas seriam, quanto à concentração de açúcares, classificadas como secas. A análise de açúcares totais por cromatografia líquida de alta eficiência não detectou presença de sacarose, glicose ou frutose. Este resultados concordam com Pato (1982) e Ough (1996). Segundo estes autores, se a fermentação for conduzida até o final, sem ser interrompida e sem ser chaptalizada durante o processo, os açúcares presentes no mosto serão convertidos a etanol e outros metabólitos.

A ausência de metanol na bebida indica que, provavelmente, a levedura utilizada, a *Sc₂*, não possui a enzima pectinametilesterase, responsável pela liberação de grupos metil das cadeias de pectina.

TABELA 5 Valores analíticos encontrados nas bebidas alcoólicas fermentadas de cacau e cajá.

Índices ^a	Limites		Bebidas Elaboradas	
	Máximo	Mínimo	Cacau	Cajá
Álcool etílico (°GL)	13,0	10,0	11,5	12
Álcool metílico (g/L)	0,35	-	-	-
Acidez total (meq/L)	130,0	55,0	98,5	29
Acidez volátil (meq/L)	20,0	-	6,5	5,5
Sulfatos totais, em K ₂ SO ₄ (g/L)	1,0	-	na	na
Cloretos totais, em NaCl (g/L)	0,20	-	na	na
Anidrido sulfuroso (SO ₂) total (g/L)	0,35	-	na	na
Cinzas (g/L)				
Vinhos comuns:				
Tinto	-	1,5	na	na
Rosado e branco	-	1,3	na	na
Vinhos finos e especiais:				
Tinto	-	1,5	na	na
Rosado e branco	-	1,0	na	na
Relação álcool em peso/extrato seco reduzido				
Vinhos comuns:				
Tinto	4,8	5,2	na	na
Rosado	6,0	6,5	na	na
Branco	6,5	6,7	na	na
Vinhos finos e especiais:				
Tinto	5,2	-	na	na
Rosado	6,5	-	na	na
Branco	6,7	-	na	na
Açúcares totais:				
Vinho seco	5,0	-	-	-
Vinho meio seco	20,0	4,0	na	na
Vinho suave ou doce	-	20,1	na	na

^a Fonte: Ministério da Agricultura, 1988. na = parâmetro não avaliado.

A Tabela 6 representa os resultados da análise de compostos orgânicos. À exceção do metanol, os demais compostos são caracterizadores do aroma. Os valores de álcoois superiores totais encontrados tanto para a bebida de cacau quanto para a bebida de cajá, 0,632 g·L⁻¹ e 0,7 g·L⁻¹, respectivamente,

mostraram-se superiores aos valores médios para vinho citados por Vogt et al. (1986), que variam entre 0,1 g·L⁻¹ e 0,3 g·L⁻¹.

TABELA 6 Concentração de compostos orgânicos (aldeídos, ésteres, e álcoois) nas bebidas de cacau e cajá.

Compostos	Concentração na bebida de Cacau (mg·L ⁻¹)	Concentração na bebida de Cajá (mg·L ⁻¹)
<i>Aldeídos</i>		
Acetaldeído	nd	nd
<i>Ésteres</i>		
Acetato de metila	nd	nd
Acetato de etila	350,7761	250,2066
<i>Álcoois</i>		
Metanol	nd	nd
<i>Álcoois Superiores (A. S.)</i>		
Propanol	44,8450	nd
Isobutanol	90,3675	nd
Butanol	nd	30,9010
Álcool Isoamílico	497,7730	676,3455
Álcool Amílico	nd	nd
Hexanol	nd	7,8138
<i>Total de A. S.</i>	<i>632,9855</i>	<i>715,0603</i>

É necessário lembrar que as polpas de frutas foram diluídas em igual volume de solução de sacarose, o que pode ter diminuído a concentração dos compostos formadores de aroma, uma vez que estes derivam principalmente do metabolismo de aminoácidos. Os limites de acetaldeído (Tabela 6), não detectados na análise por cromatografia gasosa, podem ter sido função do elevado pH do mosto, 4,5, como observado também por Cleto (2000). O

acetaldeído pode ser formado, também, pela oxidação do mosto em função da aeração excessiva, um cuidado tomado durante a estabilização das bebidas.

Os valores de acetato de etila (Tabela 6) superam aqueles descritos por Berry e Watson (1987) com sendo limites para a sensibilidade e aproximam-se dos valores encontrados por Cleto (2000) na elaboração de aguardente.

Como pode ser observado na Tabela 7, não foram detectados açúcares nas bebidas fermentadas de cacau e cajá, o que as caracterizaria como bebidas secas (Ministério da Agricultura, 1988). A concentração de glicerol (Tabela 7), cerca de 4 g/L na de cacau e 6 g/L na de cajá, está com valor próximo de conferir corpo e textura à bebida, segundo Vogt et al. (1986), que citam valores entre 6 g/L e 10 g/L.

TABELA 7 Concentração de compostos orgânicos (ácidos, açúcares e álcoois) nas bebidas de cacau e cajá obtidos por análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Compostos	Concentração na bebida de Cacau (g·L ⁻¹)	Concentração na bebida de Cajá (g·L ⁻¹)
<i>Carboidratos</i>		
Sacarose	nd	nd
Glicose	nd	nd
Frutose	nd	nd
<i>Álcoois</i>		
Etanol	156,3914	183,3598
Glicerol	0,4607	0,5964
<i>Ácidos</i>		
Acético	1,1224	0,9033
Cítrico	5,5013	0,4649
Lático	nd	nd
Málico	1,4465	0,6932
Oxálico	nd	nd
Succínico	2,0602	1,3346
Tartárico	0,7444	0,1948

6.4 Análise sensorial das bebidas

Após as análises químicas, as bebidas foram submetidas à análise sensorial para verificar sua aceitação junto ao público. O teste de Mann-Whitney, não paramétrico, reflete a preferência dos 45 provadores em relação aos atributos separadamente e à bebida como um todo (Tabela 8). Os dados indicam uma diferença altamente significativa no atributo aparência, valorizando a bebida de cajá. Este teste mostrou não diferirem entre si as bebidas, quando do julgamento dos aspectos gerais. No atributo aroma, houve uma diferença significativa entre as bebidas, valorizando a de cacau. A mesma diferença foi observada no atributo sabor, rendendo melhor resultado à bebida de cajá.

TABELA 8 Frequência e médias das notas para os atributos de análise sensorial para as bebidas de cacau e cajá, testados através do teste de Mann-Whitney.

Atributos	Cacau									Cajá									U	p		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Média	1	2	3	4	5	6	7	8			9	Média
Aparência	-	-	-	-	2	5	14	12	12	7,60	-	-	-	-	1	1	4	24	15	8,13	730,5	**
Aroma	-	-	-	3	-	1	14	11	16	7,73	-	-	-	-	-	3	3	16	23	8,31	754,5	*
Sabor	-	2	-	1	-	5	9	17	11	7,47	-	-	2	1	1	8	15	13	5	7,04	770	*
Aspectos Gerais	-	-	-	1	2	4	11	19	8	7,53	-	-	-	-	-	5	17	17	6	7,53	951	n.s.

Onde: ** - altamente significativa; * - significativa; n.s. – não significativa.

A Tabela 9 apresenta as porcentagens de aceitação das bebidas em função das notas atribuídas pelos provadores. Pode-se observar que em relação a aparência, nenhum dos provadores desgostou das bebidas. Em relação ao sabor, houve a mesma porcentagem de recusa para as duas bebidas. Quanto ao aroma, houve um desgosto maior pela bebida de cacau. Em relação à aparência e ao

aroma, houve uma convergência para a bebida de cajá, com 86,7% dos provadores gostando muito ou gostando extremamente.

TABELA 9 Porcentagem de aceite e recusa das bebidas de cacau e cajá conforme análise de escala hedônica de 9 pontos respondida por 45 provadores não treinados respondendo

Aributo	Bebida	(1-4)	(8-9)
Aparência	Cacau	0,0%	53,3%
	Cajá	0,0%	86,7%
Aroma	Cacau	6,7%	60,0%
	Cajá	0,0%	86,7%
Aspectos Gerais	Cacau	2,2%	60,0%
	Cajá	0,0%	51,1%
Sabor	Cacau	6,7%	62,2%
	Cajá	6,7%	40,0%

Um outro teste não paramétrico, conhecido como faces de Chernoff, foi realizado para constatação da aprovação das bebidas pelos provadores (Figura 2). Este teste torna mais nítidas as diferenças obtidas entre as bebidas por utilizar um reconhecimento visual, não numérico.

Uma das razões da baixa aceitação da aparência da bebida de cacau, 53,3% (Tabela 9), é que nem toda a viscosidade, possivelmente proveniente do excesso de mucilagem da bebida, foi retirada com o processo de filtração, gerando uma bebida não muito límpida (Figura 3). Uma das possíveis razões para as baixas porcentagens de aceite (Tabela 9) para o aroma da bebida de cacau e para o sabor de ambas, é o desconhecimento das próprias frutas por parte dos provadores. A Figura 3 apresenta as bebidas obtidas após a fermentação dos mostos de cacau e cajá.

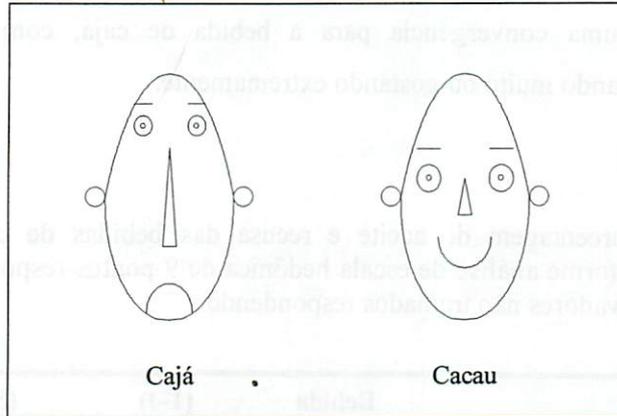


FIGURA 2 Representação da aceitação das bebidas de cacau e cajá através das faces de Chernoff, onde; Aspectos gerais = largura da face; Aroma = comprimento do nariz; Sabor = curvatura da boca e Aparência = altura dos olhos.



FIGURA 3 Produto final obtido da fermentação alcoólica dos mostos de cacau (esquerda) e cajá (direita).

7 CONCLUSÕES

A partir dos processos utilizados para a elaboração das bebidas neste trabalho, pôde ser concluído que:

1. Os processos comumente empregados na fabricação de bebidas alcoólicas, mais especificamente em enologia, podem ser adaptados para a elaboração de bebidas fermentadas de frutas tropicais.

2. A levedura Sc_2 , testada neste experimento, mostrou-se capaz de fermentar todos os açúcares fermentescíveis do mosto.

3. A diluição das polpas com solução de sacarose, para melhorar a fluidez do mosto, diminuiu a concentração dos componentes formadores de aroma da bebida, não interferindo na produção de etanol, visto que as vias de formação seguem rotas distintas.

4. A utilização do complexo enzimático e da solução de bentonite durante todo o processo fermentativo trouxe resultados satisfatórios para a clarificação da bebida.

5. A análise sensorial revelou uma boa aceitação, principalmente ao se levar em conta o desconhecimento, por parte dos provadores, das frutas que originaram as bebidas.

6. A metodologia obtida foi simples, podendo ser implantada em um espaço físico relativamente pequeno.

7. Observou-se que a partir da aceitabilidade das bebidas, esta tecnologia pode ser uma das alternativas para a utilização do excedente de safras ou um novo ramo para a fruticultura industrial.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROFAUNA. **Cacau**. Disponível em: <<http://www.agrofauna.com.br/cacau.htm>>. Acesso em: 12 de jun. 2000.
- AMERINE, M. A.; CRUESS, W. V. **The technology of winemaking**. Westport: Avi, 1960. 709p.
- ANDERSEN, O.; ANDERSEN, V. U. **As frutas silvestres brasileiras**. 2.ed. Rio de Janeiro: Globo, 1988. 203p. (Coleção do Agricultor. Fruticultura).
- ARKCOLL, D. New crops from Brazil. In: JANICK, J.; SIMON, J. E. (eds.). **Advances in new crops**. Portland: Timber Press, 1990. v.1 p.367-371. <URL><http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1990/V1-367.html>. Arquivo capturado em 06/10/2000.
- BERRY, D. R.; WATSON, D. C. Production of organoleptic compounds. In: BERRY, D. R.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G (eds). **Yeast biotechnology**. London: Allen & Unwin, 1987. cap.11.
- BRASIL. **Lei n. 7678 – 08 out. 1988**. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br/leis.asp?lei=7678>>. Acesso em: 09 de fev. de 2001.
- CAMARGO, U. A. **Uvas do brasil**. Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPUV, 1994. 90p. (EMBRAPA-CNPUV. Documentos, 9).
- CAMPBELL, R. J. South American fruits deserving further attention. In: JANICK, J. (ed.). **Progress in new crops**. Arlington: ASHS Press, 1996. v.3, p.431-439. <URL><http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1996/V3-431.html>. Arquivo capturado em 06/10/2000.
- CATALUÑA, E. **As uvas e os vinhos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Globo, 1988. 207p.
- COLAGRANDE, O.; SILVA, A.; FUMI, M. D. Recent applications of biotechnology in wine production. **Biotechnology Progress**, Washington, v.10, n.1, p.2-18, Mar. 1994. (Review).

- FILGUEIRAS, H. A. C.; MOURA, C. F. H.; ALVES, R. E. Cajá (*Spondias mombin* L.). In: ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C.; MOURA, C. F. H. (coords.). **Caracterização de frutas nativas da América Latina**. Jaboticabal: Funep, 2000. v.9, p.27-30. (Série Frutas Nativas). Edição comemorativa do 30º aniversário da Sociedade Brasileira de Fruticultura.
- GERBAUX, V.; MEURGUES, O. Influence du sulfitage et du débouillage des moûts sur l'élaboration et la qualité des vins de chardonnay. **Revue des Œnologues**, Paris, n.78, p.15-18, 1995.
- GODFREY, T.; WEST, S. I. Introduction to industrial enzymology. In: GODFREY, T.; WEST, S. I. (eds). **Industrial Enzimology** .2.ed. Great Britain: Macmillan Press, 1996. cap.1.
- GOMES, R. P. **Fruticultura brasileira**. 11.ed. São Paulo: Nobel, 1985. 446p.
- GOMEZ-RUIZ, L.; GARCIA-GARIBAY, M.; BARZANA, E. Utilization of endo-polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis* in the clarification of apple juice. **Journal of Food Science**, Chicago, v.53, n 4, p.1236-1237, 1240, July/Aug. 1988.
- GOODWIN, T. W.; MERCER, E. I. **Introduction to plant biochemistry**. 2.ed. 4.rep. Great Britain: Pergamon, 1990. 677p.
- GRASSIN, C.; FAUQUEMBERGUE, P. Fruit juice. In: GODFREY, T.; WEST, S. (eds). **Industrial enzimology**. 2.ed. Great Britain: Macmillan Press, 1996a. cap.2.13.
- GRASSIN, C.; FAUQUEMBERGUE, P. Wine. In: GODFREY, T.; WEST, S. (eds). **Industrial Enzimology** .2.ed. Great Britain: Macmillan Press, 1996b. cap.2.22.
- HASHIZUME, T. Fundamentos de tecnologia do vinho. In: AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. (coords.). **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher, 1993. v.5, cap.2. (Série Biotecnologia).
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do instituto adolfo lutz: Métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. 3.ed. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado, 1985. v.1, 533p.
- JOAS, J. Les mombins: des possibilités technologiques intéressantes. **Fruits**, Paris, v.37, n.11, p.727-729, Nov. 1982.

- KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**. Davis, v.77, n.3, p.215-227, May 2001. (Review Paper).
- LEE, C. Y.; SMITH, N. L.; NELSON, R. R. Relationship between pectin methylesterase activity and the formation of methanol in concord grape juice and wine. **Food chemistry**, Oxford, v.4, n.2, p.143-148, June 1979.
- MANFREDINI, M. Coadiuvanti enologici: bentonite. **Vignevini**, Bologna, v.4, p.43-46, 1989.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Portaria n. 229, de 25 de outubro de 1988. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, p.20948-20950, 31 maio 1988.
- MORAES, M. A. C. **Métodos para avaliação sensorial dos alimentos**. 8.ed. Campinas: Unicamp, 1993. 93p. (Série Manuais).
- MORTON, J. Yellow mombin. In: MORTON, J. F. **Fruits of warm climates**. Miami, 1987. p.245-248. Disponível em: http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/yellow_mombin_ars.html. Acesso em: 06 de out. 2000.
- OUGH, C. S. **Tratado básico de enología**. Tradução de Concepción Llaguno Marchena e María Dolores Cabezudo Ibañes. Zaragoza: Acribia, 1996. 294p. Tradução de: Winemaking basics. New York: Haworth Press, 1992.
- OUGH, C. S.; CROWELL, E. A. Pectic-enzyme treatment of white grapes: temperature, variety and skin-contact time factors. **American Journal Enology and Viticulture**, Davis, v.30, n.1, p.22-27, Jan./Mar. 1979.
- PATO, O. **O vinho: sua preparação e conservação**. 7 ed. Lisboa: Livraria Clássica Editora, 1982. 433 p. (Coleção Técnica Agrária).
- PUIG-DEU, M.; LÓPEZ-TAMAMES, E.; BUXADERAS, S.; TORRE-BORONAT, M. C. Quality of base and sparkling wines as influenced by the type of fining agent added pre-fermentation. **Food Chemistry**, Oxford, v.66, p.35-42, Mar. 1999.
- RIZZON, L. A.; MANFROI, V.; MENEGUZZO, J. **Elaboração de suco de uva na propriedade vitícola**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 1998. 24p. (EMBRAPA Uva e Vinho. Documentos, 21).

- RIZZON, L. A.; ZANUS, M. C.; MANFREDINI, S. **Como elaborar vinho de qualidade na pequena propriedade**. Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPUV, 1994. 36p. (EMBRAPA-CNPUV. Documentos, 12).
- SCHWAN, R. F.; MENDONÇA, A. T.; SILVA JÚNIOR, J. J.; RODRIGUES, V.; WHEALS, A. E. Microbiology and physiology of *cachaça* (*aguardente*) fermentations. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.79, p.89-96, Dec. 2001.
- SCHWAN, R. F.; SOUZA, S. M. M.; MENDONÇA, M. A. S. Cacau (*Theobroma cacao* L.). In: ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C.; MOURA, C. F. H. (coords). **Caracterização de frutas nativas da América Latina**. Jaboticabal: Funep, 2000. v.9, p.15-18. (Série Frutas Nativas). Edição comemorativa do 30º aniversário da Sociedade Brasileira de Fruticultura.
- SHIMADZU. **Application data book**. Japan: Shimadzu, 1998? 104p. (Catálogo C190-E001).
- TAIZ, L. ; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. California: Benjamin Cummings, 1991. 565p.
- VIDAL-BARRAQUER, J. M. Problemas de estabilización de los vinos destinados a embotellado. In: "EXPOSÉ" DE LA ASAMBLEA GENERAL DEL OFFICE INTERNACIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN, 58, 1978, Atenas. **Problemas de estabilización de los vinos destinados a embotellado**. Vilafranca del Penedès: Isart, 1981. 45p.
- VILLETAZ, J. C.; DUBOURDIEU, D. Enzymes in winemaking. In: FOX, P. F. **Food enzymology**. London: Elsevier, 1991. v.1, cap.11.
- VOGT, E.; JAKOB, L.; LEMPERLE, E.; WEISS, E. **El vino: obtención, elaboración y análisis**. Tradução de Jaime Esain Escobar. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1986. 294p. Tradução de: Der Wein: bereitung, behandlung, untersuchung. 9 ed. Stuttgart: Eugen Ulmer, 1984.

ANEXOS

ANEXO A		Página
FIGURA 1 A	Ficha modelo para avaliação sensorial de aceitação da bebida alcoólica de frutas tropicais em relação ao Aroma, ao Sabor e à Aparência da bebida.....	129
FIGURA 2A	Ficha modelo para avaliação sensorial da aceitação global da bebida alcoólica fermentada de frutas tropicais.....	130

Nome: _____

Idade: _____ anos

Sexo: M () ; F ()

Data: / /

Nº da amostra: _____

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

APARÊNCIA	AROMA	SABOR
<input type="checkbox"/> Gostei extremamente	<input type="checkbox"/> Gostei extremamente	<input type="checkbox"/> Gostei extremamente
<input type="checkbox"/> Gostei muito	<input type="checkbox"/> Gostei muito	<input type="checkbox"/> Gostei muito
<input type="checkbox"/> Gostei moderadamente	<input type="checkbox"/> Gostei moderadamente	<input type="checkbox"/> Gostei moderadamente
<input type="checkbox"/> Gostei ligeiramente	<input type="checkbox"/> Gostei ligeiramente	<input type="checkbox"/> Gostei ligeiramente
<input type="checkbox"/> Não gostei, nem desgostei	<input type="checkbox"/> Não gostei, nem desgostei	<input type="checkbox"/> Não gostei, nem desgostei
<input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente	<input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente	<input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente
<input type="checkbox"/> Desgostei moderadamente	<input type="checkbox"/> Desgostei moderadamente	<input type="checkbox"/> Desgostei moderadamente
<input type="checkbox"/> Desgostei muito	<input type="checkbox"/> Desgostei muito	<input type="checkbox"/> Desgostei muito
<input type="checkbox"/> Desgostei extremamente	<input type="checkbox"/> Desgostei extremamente	<input type="checkbox"/> Desgostei extremamente

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

Mais gostei:

Menos gostei:

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

Nome: _____
Idade: _____ anos.
Sexo: M (); F ().
Data: / /
Nº da amostra: _____

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

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

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

Mais gostei:

Menos gostei:

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