



**Estudo das condições de cultivo para a
elaboração de uma bebida fermentada de
amora**

**Gabriela Marina Menghi
Luciana Gonzalez Martins de Magalhães**

Projeto Final de Curso

**Orientadores
Prof.^a Melissa Limoeiro Estrada Gutarra, D.Sc.
Prof.^a Karen Signori Pereira, D.Sc.**

Agosto de 2014

ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA A ELABORAÇÃO DE UMA BEBIDA FERMENTADA DE AMORA

Gabriela Marina Menghi
Luciana Gonzalez Martins de Magalhães

Projeto Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Aprovado por:

Dr. Bernardo Onagar Yépez Silva-Santisteban

Prof. Daniel Perrone Moreira

Prof. Lauro Luís Martins Medeiros de Melo

Orientado por:

Prof.^a Melissa Limoeiro Estrada Gutarra, D.Sc.

Prof.^a Karen Signori Pereira, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil
Agosto de 2014

Menghi, Gabriela Marina. Magalhães, Luciana Gonzalez Martins de.

Estudo das condições de cultivo para a elaboração de uma bebida fermentada de amora/Gabriela Marina Menghi; Luciana Gonzalez Martins de Magalhães. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2014.

xii, 63 p.;il.

(Projeto Final) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2014.

Orientadores: Melissa Limoeiro Estrada Gutarra e Karen Signori Pereira.

1. Fermentação alcoólica. 2. Amora-preta. 3. Condições de cultivo. 4. Projeto Final (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Melissa Limoeiro Estrada Gutarra e Karen Signori Pereira. I. Estudo das condições de cultivo para a elaboração de uma bebida fermentada de amora.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus avós, Esmilde (In memoriam), Héctor, Cláudia e Fernando, pelo amor que sempre me deram, pelos seus conselhos, por sempre me mostrarem a importância dos estudos e nunca me deixarem fraquejar.

Aos meus pais, Patricia e Daniel, que sempre me apoiaram em todas minhas decisões, acreditaram em mim nos momentos que nem eu mesma acreditei, me deram forças para nunca desistir e me mostraram que eu era capaz de superar cada dificuldade enfrentada ao longo da graduação.

Aos meus irmãos, Diana e Nicolas pelo carinho, companheirismo e incentivo.

A minha família, que mesmo de longe sempre me deu muita força e carinho.

As orientadoras Melissa e Karen, fundamentais para minha formação acadêmica, pela ajuda, dedicação, atenção e paciência ao longo destes anos e deste projeto.

Aos professores, que tive o prazer de conhecer, pela transmissão do conhecimento e ajuda ao longo dessa caminhada.

A Luciana, pela amizade, companheirismo e paciência ao longo da graduação e deste projeto.

Aos meus amigos, companheiros dessa jornada, pelo incentivo, apoio e por muitas vezes entenderem minha ausência.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia Industrial que nos receberam tão bem e nos ajudaram ao longo deste projeto.

Ao Thiago, Juliana, João, Fábio e Antônio pelo auxílio do desenvolvimento dos experimentos.

Muito obrigada!

Gabriela Marina Menghi

Aos meus familiares, por todo o apoio, carinho e incentivo. Em especial aos meus pais, que sempre acreditaram em mim e foram fundamentais para que essa etapa fosse concluída.

A todos os meus professores, que durante esses anos contribuíram de alguma forma para a minha formação.

Agradeço às orientadoras Melissa Gutarra e Karen Signori, por todo o conhecimento compartilhado. Obrigada pela ajuda, orientação e dedicação na elaboração deste trabalho.

Ao Mateus, por ser mais que um namorado, ser um grande amigo e companheiro. Por ter acompanhado de perto toda esta trajetória, me apoiado nos momentos difíceis, sempre me incentivando e ajudando.

Aos meus amigos, por todos os momentos que compartilhamos, pelo companheirismo e amizade.

Ao pessoal do laboratório 113. Obrigada por nos receberem bem e colaborarem para que a conclusão deste estudo fosse mais leve e divertida. Agradeço a Gabi por todo o companheirismo, paciência e parceria neste projeto.

Por último, mas não menos importante, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Especialmente a Juliana, Thiago e João, por todo o auxílio e atenção nos últimos meses.

Luciana Magalhães

Resumo do Projeto Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA A ELABORAÇÃO DE UMA BEBIDA FERMENTADA DE AMORA

Gabriela Marina Menghi
Luciana Gonzalez Martins de Magalhães

Agosto, 2014

Orientadores: Prof.^a Melissa Limoeiro Estrada Gutarra, D.Sc.
Prof.^a Karen Signori Pereira, D.Sc.

A amora-preta (*Rubus* spp.) é uma fruta rica em compostos bioativos, porém, devido a sua alta perecibilidade, a produção de bebida alcoólica é vista como uma alternativa para a redução de perdas e maior aproveitamento do fruto. O presente trabalho teve como objetivo estudar as condições de cultivo na produção de fermentado de amora. As variáveis analisadas foram temperatura, concentração de ativador de fermentação e de leveduras. Através de um planejamento experimental fatorial, a temperatura de 20°C, a concentração de ativador de fermentação de 0,2 g/L e de leveduras de 1,0 g/L foram as que apresentaram melhor resposta para a redução de °Brix. Nestas condições realizou-se um estudo cinético comparando diferentes chaptalizações, em uma e duas etapas. A fermentação conduzida com chaptalização única apresentou melhor desempenho obtendo rendimento de 95,26%, produtividade de 0,63 g/L.h de etanol e parâmetro cinético $Y_{P/S}$ de 0,49, enquanto que os mesmos parâmetros para o outro ensaio foram de 93,53%, 0,37 g/L.h e 0,48. Após 13 dias de fermentação, os teores alcoólicos alcançados foram de 14,8 %v/v para a fermentação com adição total de sacarose no início do processo e de 13,4 %v/v para o experimento com adição em duas etapas, e açúcares redutores totais de 14,06 e 55,91 g/L, respectivamente. Sendo assim, não houve inibição pelo substrato, e a amora-preta mostrou alto potencial como matéria-prima na elaboração de bebida fermentada.

Abstract of a Final Project presented to Escola de Química/UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Food Engineer.

STUDY OF THE CONDITIONS OF CULTIVATION FOR THE ELABORATION OF A BLACKBERRY FERMENTED BEVERAGE

Gabriela Marina Menghi
Luciana Gonzalez Martins de Magalhães

August, 2014

Supervisors: Prof.^a Melissa Limoeiro Estrada Gutarra, D.Sc.
Prof.^a Karen Signori Pereira, D.Sc.

The blackberry (*Rubus* spp.) is a fruit rich in bioactive compounds, however, due to its highly perishability, the production of alcoholic beverage is seen as an alternative to reduce losses and better use of the fruit. The present work aimed to study the conditions of cultivation for the production of blackberry fermented beverage. The variables analyzed were temperature, concentration of fermentation activator and concentration of yeast. Through a factorial design, the temperature of 20 °C, the concentration of fermentation activator of 0.2 g / L and the concentration of yeast of 1.0 g / L showed the best answer to reduce °Brix. Under these conditions we performed a kinetic study comparing different strategies of chaptalisation. The fermentation carried out with only one chaptalisation presented better performance obtaining 95.26 % of yield, productivity of 0.63 g / L.h of ethanol and kinetic parameter $Y_{P/S}$ of 0.49, while the same parameters for the experiment with two chaptalisations were 93.53%, 0.37 g / Lh and 0.48. After 13 days of fermentation, the alcohol levels achieved were 14.8 % v / v for fermentation with a total addition of sucrose early in the process and 13.4 % v / v for the experiment with addition in two stages, and total reducing sugars of 14.06 and 55.91 g / L, respectively. Thus, there was no substrate inhibition, and blackberry showed high potential as a raw material in the preparation of fermented beverage.

Sumário

1	Introdução.....	1
2	Objetivo.....	2
3	Revisão Bibliográfica.....	3
3.1	Mercado.....	3
3.1.1	Vinho.....	3
3.1.2	Fermentados de Frutas.....	5
3.1.2.1	Alternativa para o aproveitamento de frutos.....	5
3.1.3	Amora-preta (<i>Rubus</i> spp.).....	6
3.2	Bebidas fermentadas de frutos.....	7
3.2.1	Legislação de vinho.....	7
3.2.2	Legislação de fermentados de frutas.....	8
3.2.3	Estudos de fermentados de frutas.....	9
3.3	Amora (<i>Rubus</i> spp.).....	11
3.3.1	Características.....	11
3.3.2	Fermentado de amora.....	13
3.4	Compostos bioativos.....	14
3.4.1	Compostos fenólicos ou polifenóis.....	15
3.4.1.1	Flavonóides.....	16
3.4.1.2	Ácidos Fenólicos.....	17
3.4.2	Carotenóides.....	18
3.4.3	Capacidade antioxidante.....	18
3.5	Processo produtivo de bebida fermentada.....	19
3.5.1	Recepção da matéria-prima e extração do suco.....	20
3.5.2	Preparação do mosto.....	20
3.5.4	Fermentação alcoólica.....	22
3.5.4.1	Cinética de fermentação.....	23

3.5.4.2 Fatores que afetam a fermentação alcoólica.....	23
3.5.5 Trasega	24
3.5.6 Fermentação malolática	24
3.5.7 Clarificação.....	24
3.5.8 Filtração	25
3.5.9 Armazenamento.....	25
4 Materiais e Métodos	25
4.1 Materiais Utilizados	25
4.2 Contagem total de microrganismos	27
4.3 Condução das fermentações	28
4.3.1 Fermentação inicial	28
4.3.2 Fermentações para o estudo das condições de cultivo	28
4.3.2.1 Obtenção do mosto.....	29
4.3.2.2 Inoculação	30
4.3.2.3 Processo fermentativo.....	30
4.4 Estudo das condições de cultivo	30
4.4.1 Planejamento Fatorial.....	30
4.4.2 Fermentação na melhor condição de cultivo	31
4.5 Análises físico-químicas	32
4.5.1 Acompanhamento do pH.....	32
4.5.2 Teor de sólidos solúveis.....	32
4.5.3 Quantificação de açúcares redutores.....	33
4.5.4 Quantificação de etanol.....	34
4.6 Contagem de células de leveduras viáveis	34
4.7 Determinação de parâmetros cinéticos da fermentação	34
5 Resultados e Discussão.....	36
5.1 Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas.....	36

5.2 Fermentação inicial	36
5.3 Estudo das condições de cultivo	36
5.3.1 Planejamento experimental fatorial	40
5.4 Fermentações na melhor condição de cultivo.....	44
5.4.1 Células viáveis	44
5.4.2 Quantificação de açúcares redutores totais	45
5.4.3 Caracterização físico-química	45
5.4.4 Cinética	49
6 Conclusões	53
7 Estudos futuros	54

Lista de figuras

Figura 1: Produção mundial de vinho (1990-1992), por continente.	4
Figura 2: Produção mundial de vinho (2008-2010), por continente.	4
Figura 3: Perdas de frutas e hortaliças em diferentes etapas da cadeia produtiva, por continente.	5
Figura 4: Amora-preta (<i>Rubus</i> spp.).....	13
Figura 5: Subdivisão de compostos bioativos presentes em alimentos de origem vegetal. ...	15
Figura 6: Fluxograma do processo de produção de bebida fermentada.	19
Figura 7: Materiais utilizados na elaboração da bebida fermentada de amora.....	26
Figura 8: Variação de ° Brix ao longo do tempo de fermentação a 20°C.....	39
Figura 9: Variação de ° Brix ao longo do tempo de fermentação a 25°C.....	39
Figura 10: Variação de ° Brix ao longo do tempo de fermentação a 30°C.	40
Figura 11: Superfície de resposta para a redução de grau Brix em função da concentração de inóculo e da temperatura tendo a concentração de ativador de fermentação no nível -1 (0,2 g/l).	43
Figura 12: Perfil cinético de etanol e sólidos solúveis durante a fermentação alcoólica.	50
Figura 13: Produtividade e etanol (% v/v) ao longo do processo fermentativo.	51

Lista de quadros

Quadro 1: Limites estabelecidos para teor alcoólico em vinhos.....	7
Quadro 2: Limites estabelecidos para teor de açúcar em vinhos de mesa.	8
Quadro 3: Padrões de identidade e qualidade para fermentados de frutas.	9

Lista de tabelas

Tabela 1: Tabela nutricional da amora-preta da marca DeMarchi.	27
Tabela 2: Matriz do planejamento fatorial 2 ³	31
Tabela 3: Variações de °Brix durante o tempo para os 11 ensaios realizados.....	38
Tabela 4: Matriz do Planejamento fatorial 2 ³ para estudar a redução do °Brix após 240 horas dias de cultivo de fermentados de amora tendo como variáveis a temperatura, concentração de ativador de fermentação e concentração do inóculo.	41
Tabela 5: Efeito das variáveis temperatura, concentração de ativador de fermentação e concentração do inóculo sobre a redução do grau Brix em 10 dias em fermentados de amora.	42
Tabela 6: Efeito das variáveis temperatura, concentração de ativador de fermentação e concentração do inóculo sobre a redução do grau Brix em 10 dias em fermentados de amora.	42
Tabela 7: Açúcares redutores totais presentes nos pontos iniciais e finais das fermentações	45
Tabela 8: Parâmetros cinéticos da produção de bebida fermentada de amora.....	50
Tabela 9: Resultados das análises realizadas durante a elaboração do fermentado de amora com chaptalização única.....	46
Tabela 10: Resultados das análises realizadas durante a elaboração do fermentado de amora com chaptalização em duas etapas.....	46
Tabela 11: Comparação entre os fermentados de amora deste estudo e os fermentados de frutas da literatura.	48

1 Introdução

Entre as bebidas fermentadas de frutas, o vinho é uma das mais antigas e mais consumidas mundialmente. Além da uva, matéria-prima para a produção de vinho, outras frutas são utilizadas para a elaboração de bebidas fermentadas. Uma das mais conhecidas é a sidra, bebida obtida a partir da fermentação do mosto de maçã (*Malus domestica* Borkh). Fermentados de morango (*Fragaria vesca* L.), cereja (*Prunus avium* (L.) L.), jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), framboesa (*Rubus idaeus*) e amora-preta (*Rubus* spp.) também são amplamente consumidos em diversos países.

O Brasil, país com grande diversidade de frutas tropicais, é cenário de diversos estudos envolvendo fermentados de frutas como laranja, camu-camu, caju e mandacaru. Pesquisas relacionadas à obtenção de bebidas fermentadas a partir de amora ainda são escassas no Brasil, porém o mesmo não ocorre em países europeus, onde fermentados de amora são comumente estudados e comercializados.

A amora-preta (*Rubus* spp.) é uma fruta rica em vitaminas, minerais, carboidratos e, principalmente, compostos fenólicos. Os que apresentam maior ênfase entre os compostos fenólicos são o ácido elágico e as antocianinas, devido à capacidade de reação dos mesmos com radicais livres (ARZARENA, ORTIZ, et al., 2012). Diversos estudos encontrados na literatura comprovam o poder destes compostos na prevenção de doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e de câncer, devido à sua alta capacidade antioxidante. Outras propriedades inerentes aos compostos fenólicos presentes na amora são as capacidades antiinflamatória e antialérgica.

O Brasil destaca-se por ser um dos países com maior produção mundial de frutas, porém, o desperdício pós-colheita é eminente. Nesse sentido, é clara a necessidade de processamento destes frutos, objetivando a redução das perdas e incremento do valor agregado (DIAS, SCHWAN e LIMA, 2010). Devido à fragilidade e alta perecibilidade da amora, produtos como geléias, sucos, xarope e bebidas alcoólicas podem ser considerados alternativas para a redução de sua perda.

2 Objetivo

Este trabalho teve como objetivo empregar a amora como matéria-prima para produção de um fermentado de fruta, avaliando seu potencial e estudando as melhores condições de cultivo para a elaboração desta bebida fermentada.

Os objetivos específicos estabelecidos são:

- 1) Avaliar a viabilidade do emprego da amora como matéria-prima para o desenvolvimento de um fermentado de fruta através da análise da qualidade microbiológica da matéria-prima; e fermentação inicial.
- 2) Estudar as condições de cultivo, temperatura, concentração de inóculo e concentração de ativador de fermentação para produção do fermentado de amora empregando a estratégia de planejamento estatístico de experimentos.
- 3) Estudar a cinética na melhor condição de fermentação, analisando formas distintas de chaptalização: única ou em duas etapas.
- 4) Caracterizar o fermentado obtido segundo o pH, etanol e °Brix.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Mercado

3.1.1 Vinho

O vinho é uma bebida de grande importância econômica. Ele figura entre as bebidas mais antigas e ao longo dos anos sempre esteve associado a rituais religiosos e pagãos. A simbologia em torno do vinho, associada à sua importância no mercado fizeram com que, atualmente, nenhuma bebida tenha a imagem tão associada à tradição quanto ele. Tal característica está diretamente relacionada ao crescimento do comércio internacional de vinho e à sua globalização (ROESE, 2008).

A existência de propriedades nutracêuticas e terapêuticas no vinho foram comprovadas há alguns anos. Este fato fez com que se iniciasse uma verdadeira revolução na produção, comercialização e consumo do mesmo mundialmente (GUERRA, 2010).

Hoje em dia, os principais países produtores de vinho são: China, Itália, Estados Unidos, Espanha e França. A Europa se destaca como o principal continente produtor da bebida. No período de 1990 até 2010, com exceção da Europa, todos os demais continentes apresentaram aumento na produção de vinho, conforme indicado nas figuras 1 e 2. No mesmo período, a produção total no mundo caiu de 27,7 bilhões de litros para 26,6 bilhões de litros, uma queda de 4% (MELLO, 2012).

No cenário internacional, o Brasil ocupava, em 2011, a 19ª posição em área cultivada com videiras, a 11ª em produção de uvas e era o 13º maior produtor mundial de vinhos (MELLO, 2012). Apesar de não se destacar no que diz respeito à produção de vinhos, o Brasil é pioneiro na implantação e viabilização da produção em regiões tropicais, próximas à linha do Equador (SILVA, et al., 2008).

A vitivinicultura é uma atividade importante para o desenvolvimento de algumas regiões brasileiras, principalmente em razão da geração de emprego. Na principal região produtora de vinhos no Brasil, a Serra Gaúcha, a atividade também está ligada fortemente ao turismo (MELLO, 2012).

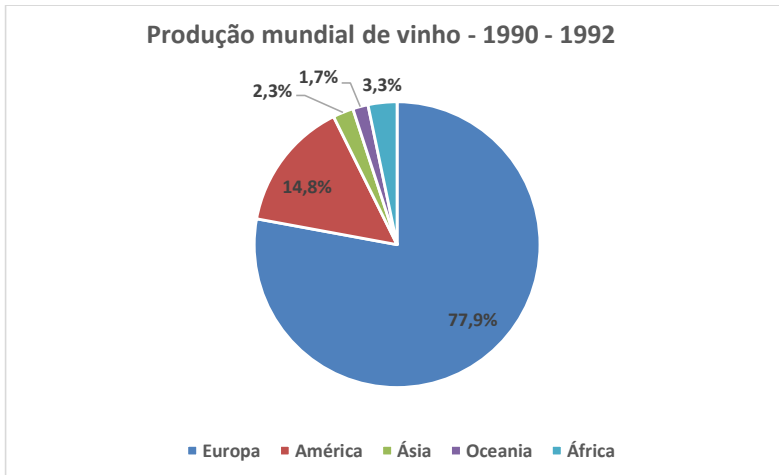


Figura 1: Produção mundial de vinho (1990-1992), por continente.
Fonte: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2012)

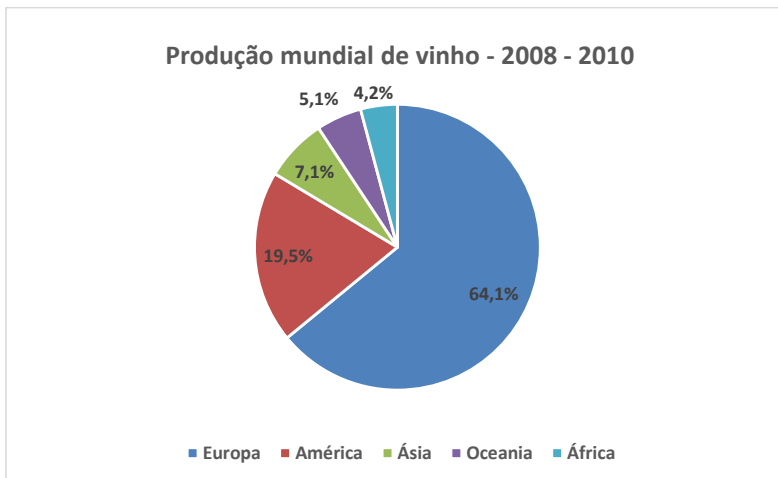


Figura 2: Produção mundial de vinho (2008-2010), por continente.
Fonte: FAO (2012)

3.1.2 Fermentados de Frutas

Muitos países, principalmente os europeus, produzem fermentados de frutas para a comercialização, sendo a maçã (*Malus domestica* Borkh), a pera (*Pyrus communis* L.), a groselha (*Ribes nigrum* L.), a framboesa (*Rubus idaeus*) e a cereja (*Prunus avium* (L.) L.) as mais empregadas (MUNIZ et al., 2002). No Brasil e em outros países tropicais, é comum encontrar trabalhos científicos com a utilização de frutas como laranja (*Citrus sinensis*) (CORAZZA, et al., 2001), caju (*Anacardium occidentale* L.) (GARRUTI, 2001) e abacaxi (*Ananas comosus* L.) (SILVA, et al., 2010).

3.1.2.1 Alternativa para o aproveitamento de frutos

As perdas de frutas pós-colheita ocorrem em número expressivo em todo o mundo (figura 3) e representam perda de valiosos e escassos recursos utilizados na produção, como área cultivada, água e energia. A produção de alimentos que não serão consumidos gera emissões desnecessárias de dióxido de carbono, devido às práticas agrícolas, além da perda do valor econômico dos alimentos produzidos (FAO, 2011).

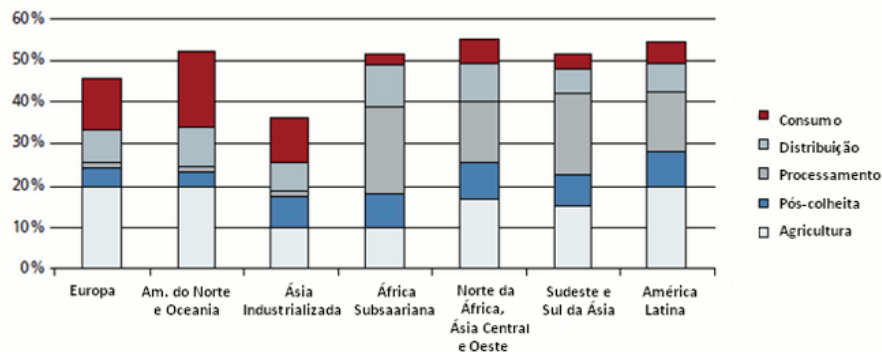


Figura 3: Perdas de frutas e hortaliças em diferentes etapas da cadeia produtiva, por continente. Fonte: FAO (2011)

O Brasil é um país de clima tropical e propício ao desenvolvimento da fruticultura com características próprias. Por essa razão, se destaca e ocupa a terceira posição

entre os maiores produtores de frutas do mundo. Entretanto, ocorre um grande desperdício após a colheita de muitas culturas, o que gera prejuízo econômico (GOMES et al., 2010).

Nesse sentido, existe a necessidade de alternativas que visem o aproveitamento e a consequente redução dos desperdícios e perdas ao mesmo tempo em que agreguem valor aos frutos. São consideradas como alternativas os produtos que possuem maior tempo de conservação e armazenamento obtidos por processos de industrialização desses frutos. Sendo assim, os fermentados de fruta se destacam como opção para se obter produtos derivados com maior vida útil e maior valor agregado (GOMES et al., 2010).

3.1.3 Amora-preta (*Rubus spp.*)

De acordo com dados da FAO (2008), a produção mundial de pequenas frutas (morango, mirtilo, framboesa e amora-preta) representa importante fonte de alimentação e de renda em todo o mundo. Devido às qualidades nutricionais desses frutos e aos benefícios que geram à saúde humana, os consumidores têm demonstrado cada vez mais interesse em consumi-los. O aumento na demanda, associado à importância econômica dessas culturas ocasionaram uma expansão na área de plantio na última década. Nos Estados Unidos da América, em 2010, a cadeia produtiva de pequenas frutas gerou mais de três bilhões de dólares em receita (ANTUNES, 2013).

Atualmente, os principais países produtores da amora-preta são os EUA e o México (ANTUNES e HOFFMAN, 2012), porém a América do Sul também tem se destacado no mercado mundial de pequenas frutas. O Chile e a Argentina são os principais produtores no continente, estando na frente do Brasil (ANTUNES, 2013).

No cenário brasileiro, apesar de pouco representativa, a produção de pequenas frutas é vista como uma oportunidade. Tal fato deve-se, principalmente, à diversidade climática existente de norte a sul do país, mão de obra qualificada e mercado consumidor ávido por frutas de qualidade e com atividades nutracêuticas (ANTUNES e HOFFMAN, 2012). Levando em consideração somente a amora-preta, segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2003), as agroindústrias têm sido as principais compradoras da fruta para a produção de geleias, sucos, polpas

de frutas e para os mais diversos usos. A comercialização da fruta “in natura” sofre redução a cada ano. O grande gargalo se encontra na oferta ao consumidor e na perecibilidade do alimento, que precisa chegar ao mercado no máximo 24 horas após a colheita.

3.2 Bebidas fermentadas de frutos

3.2.1 Legislação de vinho

Segundo o Art. 3º previsto na Lei Nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, o vinho é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples de uva sã, fresca e madura. Neste artigo também é determinado que a denominação vinho é privativa do produto fermentado a partir de uvas, sendo vedada a sua utilização para produtos obtidos de outras matérias-primas (BRASIL, 1988).

De acordo com a Lei Nº 10.970, de 12 de novembro de 2004, que altera dispositivos da Lei Nº 7.678, o vinho é classificado quanto à classe em: de mesa, leve, fino, espumante, frisante, gaseificado, licoroso e composto. No que diz respeito à cor, ele pode ser tinto, rosado (rosé ou clarete) ou branco. De acordo com o teor de açúcar, o vinho deve ser *nature*, *extra-brut*, *brut*, *seco* (*sec* ou *dry*), *meio doce* (meio seco ou *demi-sec*), suave ou doce (BRASIL, 1988, 2004).

No quadro 1 encontram-se os limites analíticos estabelecidos para o teor alcoólico em vinhos, de acordo com a Lei Nº 10.970. O quadro 2 contém os limites analíticos para teores de açúcares em vinhos de mesa, estabelecidos pelo Decreto Nº 8.198 de fevereiro de 2014 (BRASIL, 2004, 2014).

Quadro 1: Limites estabelecidos para teor alcoólico em vinhos.

Teor Alcoólico (°GL, %v/v a 20°C)		
Classificação	Limite Mínimo	Limite Máximo
Vinho de mesa	8,6	14,0
Vinho fino*	8,6	14,0
Vinho leve	7,0	8,5

*obtidos de *Vitis vinífera* L.
Fonte: Brasil (1988, 2004)

Quadro 2: Limites estabelecidos para teor de açúcar em vinhos de mesa.

Açúcares Totais (g.L-1, em glicose)		
Classificação	Limite Mínimo	Limite Máximo
Vinho seco	-	4,0
Vinho meio seco	4,1	25,0
Vinho suave	25,1	80,0

Fonte: Brasil (1988, 2014)

3.2.2 Legislação de fermentados de frutas

Segundo o Decreto N° 6.871, de 4 de junho de 2009, que regulamenta a Lei N° 8.918, de 14 de julho de 1994, fermentado de fruta é a bebida com graduação alcoólica de quatro a quatorze por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida da fermentação alcoólica do mosto de fruta sã, fresca e madura de uma única espécie, do respectivo suco integral ou concentrado, ou polpa, que poderá, nesses casos, ser adicionado de água. Neste decreto também é informado que o fermentado de fruta poderá ser adicionado de açúcares, água e outros aditivos definidos para cada tipo de fruta (BRASIL, 1994, 2009).

A instrução normativa N° 34, de 29 de novembro de 2012 estabelece a complementação dos padrões de identidade e qualidade para os fermentados de frutas, conforme indicado no quadro 3 (BRASIL, 2012).

Atualmente, a legislação brasileira para bebidas alcoólicas fermentadas limita a concentração de sacarose somente para a sidra. Tal fato permitiu o desenvolvimento de estudos tecnológicos em frutos com reduzidas concentrações de açúcares (MAEDA e ANDRADE, 2003).

Comentado [Im1]: Na bebida final ou no mosto? Ou seria "adição"?

Quadro 3: Padrões de identidade e qualidade para fermentados de frutas.

Item	Parâmetro	Limite Mínimo	Limite Máximo	Classificação
1	Acidez fixa, em meq/L.	30
2	Acidez total, em meq/L.	50	130
3	Acidez volátil, em meq/L.	20
4	Anidrido sulfuroso total, em g/L.	0,35
5	Cloretos totais, em g/L.	0,5
6	Extrato seco reduzido, em g/L.	12
7	Gradação alcoólica, em % v/v a 20°C.	4	14
8	Pressão, em atm.	2	3	Gaseificado
9	Teor de açúcar em g/L	≤ 3	Seco
		> 3	doce ou suave

Fonte: Brasil (2012)

3.2.3 Estudos de fermentados de frutas

Diversos estudos de diferentes autores foram publicados, envolvendo a obtenção de bebidas fermentadas a partir de grande variedade de frutos.

Maeda e Andade (2003) elaboraram uma bebida fermentada a partir de camu-camu (*Myrciaria dubia*), a qual foi avaliada quanto ao teor de ácido ascórbico, acidez

total, pH, açúcares redutores e compostos fenólicos, além de ter o seu grau alcoólico determinado. Foi analisado o efeito do branqueamento e da agregação da casca nos componentes da bebida fermentada após seis meses de armazenamento. A acidez variou entre 0,47% e 0,55% em ácido cítrico, para quatro amostras diferentes. Os açúcares redutores variaram entre 1,03 e 1,16 g/100 mL, o pH após os seis meses foi 2,70, o mesmo para as quatro amostras. O teor de sólidos solúveis, em °Brix, e o álcool, em °GL, também foram os mesmos para as quatro amostras e os resultados foram 4,50 e 11,0 respectivamente.

Coelho e outros (2013) estudaram a elaboração de fermentado alcoólico a partir do suco extraído da carambola (*Averrhoa carambola*). Foram analisados no fermentado: pH, teor de sólidos solúveis, teor alcoólico e acidez total titulável. Segundo os resultados apresentados, o teor de sólidos solúveis total encontrado foi 6,80 °Brix, o pH foi 4,10, a acidez titulável total 6,51 g/100 mL e o teor alcoólico 7,00 °GL. Neste estudo, os teores de açúcares redutores e não redutores no fermentado não foram significativos.

A obtenção de bebida fermentada a partir da laranja (*Citrus sinensis*) foi estudada por diversos autores. Corazza e outros (2001) produziram um fermentado caseiro de laranja, o qual teve as variações de °Brix, pH, densidade, acidez total e temperatura do mosto acompanhadas por 153 horas. No mesmo trabalho, a bebida obtida através da fermentação da laranja foi comparada ao vinho em relação aos seguintes aspectos: turbidez, pH, °Brix, grau alcoólico e odor assimilado. Os parâmetros pH, °Brix e grau alcoólico encontrados para o fermentado de laranja foram muito próximos aos do vinho em comparação. Porém, o fermentado de laranja apresentou turbidez dez vezes maior que a do vinho. O odor assimilado também variou entre as bebidas, o que era esperado. O vinho teve o odor assimilado da uva e o fermentado teve o odor assimilado da laranja. Mendes e outros (2001) também elaboraram uma bebida fermentada a partir do suco de laranja. Neste estudo, foram observados o desenvolvimento do processo fermentativo e o rendimento da bebida obtida. Foram avaliadas as propriedades sensoriais, no que diz respeito à cor, limpidez, odor e sabor. Análises de densidade, grau alcoólico, °Brix, extrato seco a 100°C, cinzas, pH, acidez total, acidez volátil e fixa também foram realizadas. Os resultados das análises foram comparados aos parâmetros estabelecidos pela legislação vigente. Após as análises realizadas, Mendes e outros (2001) constataram

que o fermentado apresentou aspectos sensoriais aceitáveis e os parâmetros bromatológicos se encontraram dentro dos limites da legislação. Corazza e outros (2001) encontraram, ao final da fermentação, pH igual a 3,2, °Brix 7,0 e teor alcoólico 10,6 °GL. Já o fermentado de laranja de Mendes e outros (2001) apresentou pH 3,8, °Brix igual a 15,0 e teor alcoólico 8,0 °GL.

Andrade e outros (2013) conduziram uma fermentação alcoólica do mosto de morango (*Fragaria vesca* L.). O fermentado de morango foi produzido e caracterizado, a cinética de fermentação foi acompanhada com produção máxima de etanol em 720 horas, e por último realizaram análise sensorial da bebida obtida. As análises físico-químicas realizadas no trabalho foram: °Brix, pH, acidez total, álcool e turbidez. A bebida obtida foi comparada a outros fermentados de frutas da literatura. Após 30 dias de fermentação, alguns resultados encontrados foram: °Brix igual a 8,0, pH igual a 3,51 e o teor alcoólico final foi 9,62% em volume.

A elaboração de fermentados a partir do suco extraído de pseudofrutos de caju (*Anacardium occidentale* L.) foi conduzida por Garruti (2001). O trabalho contou com o estudo sobre a influência da temperatura e da sulfitação na fermentação. As duas temperaturas comparadas foram 18°C e 30°C e o metabissulfito foi adicionado para atingir 0, 50, 100 e 200 ppm de SO₂ livre. Para as amostras em diferentes temperaturas e concentrações de SO₂, os compostos voláteis foram isolados e analisados por cromatografia. Também foram realizadas, em todas as amostras, análises físico-químicas de densidade, teor alcoólico, acidez total, acidez volátil, pH, índice de cor, extrato seco e extrato seco reduzido, cinzas e alcalinidade das cinzas, açúcares redutores, dióxido de enxofre livre e total. Os melhores resultados foram obtidos com a temperatura igual a 18°C e o teor de metabissulfito de potássio igual a 100 ppm.

3.3 Amora (*Rubus* spp.)

3.3.1 Características

A amoreira-preta pertence ao gênero *Rubus*, que por sua vez pertence à família Rosaceae. Dentre as diversas cultivares existentes de amoreira-preta, as mais comuns encontradas no Brasil são 'Tupy', 'Guarani', 'Negrita', 'Caingangue' e 'Ébano'

(ANTUNES, 2002). Na América, Europa, África e Ásia estimam-se existir entre 400 e 500 espécies de amoreira-preta (BASSOLS, 1980; POLING, 1996, *apud* ANTUNES, 2002).

As plantas possuem porte ereto ou rasteiro, o fruto da amoreira é denominado de minidrupa ou drupete, que possui uma pequena semente e essa junção forma o fruto agregado. A amora é formada por 75 a 86 drupetes e varia de quatro a sete gramas, possui coloração negra e gosto ácido a doce-ácido (SHOEMAKER, 1978; FACHINELLO et al., 1994; POLING, 1996, *apud* ANTUNES, 2002).

A amora-preta contém 85% de água, 10% de carboidratos, vitaminas A, B e C, minerais, cálcio (POLING, 1996, *apud* ANTUNES, 2002) e compostos fenólicos com destaque para o ácido elágico e antocianinas. Nas amoras, as antocianinas localizam-se na polpa enquanto que os elagitaninos estão distribuídos em todas as partes da fruta, com maior concentração nas sementes (ARZARENA, ORTIZ, et al., 2012).

Os compostos fenólicos presentes em uma fruta variam de acordo com a estação, variedade, condições climáticas e ambientais, tipo de solo, localização geográfica e maturidade (SELLAPPAN, AKOH e KREWER, 2002).

Mota (2006) caracterizou a polpa das cultivares Tupy, Guarani, Caingangue, Comanche, Cherokee e Seleção 97, e obteve valores de pH entre 3,2 e 3,4; sólidos solúveis totais entre 6,93 e 10,37 °Brix; acidez total titulável expressa como porcentagem de ácido cítrico entre 1,24 e 1,50%; carboidratos entre 4,23 e 5,92%; antocianinas entre 110,21 e 194,59 mg/100 g da polpa extraída dos frutos e umidade entre 90,47 e 91,77%. Observa-se na figura 4, a amora-preta (*Rubus* spp.).



Figura 4: Amora-preta (*Rubus* spp.)

Fonte: <http://chabeneficios.com.br/cha-de-folhas-de-amora-conheca-seus-beneficios/>

3.3.2 Fermentado de amora

Dentre as bebidas fermentadas de frutas, o fermentado de amora é um produto tradicional e popular no leste europeu, com destaque para a Croácia, mais especificamente na região continental. Diversos foram os estudos realizados neste país. O fermentado é comumente servido em pequenas proporções como uma bebida de sobremesa, e é tido como uma fonte natural de compostos fitoquímicos e de minerais essenciais, promotores da saúde humana através da prevenção de várias doenças. As cultivares mais comumente usadas para a produção de fermentado de amora são: “Thornless Logan”, “Thornfree”, “Black Satin” e “Tayberry” (KLARIĆ, KLARIĆ e MORNAR, 2011).

Um grande produtor de fermentados de frutas é o estado de Illinois nos Estados Unidos. Johnson e Mejia (2012) mencionam que os fermentados de frutas conferem benefícios únicos à saúde quando comparados ao vinho devido aos diferentes componentes na fruta e aqueles formados durante o processo fermentativo.

Fermentados comerciais de amora foram analisados por Johnson e Mejia (2012), que encontraram uma média de pH de 3,4 que variou entre 3,1 e 3,7 e uma média de °Brix de 16,4 que variou entre 14,6 e 18,0. Além disso, avaliaram parâmetros de qualidade como concentração glicose-frutose, acidez total, ácido málico e acidez volátil em ácido acético, em g/L. Obtiveram concentrações de glicose-frutose entre 77,5 g/L e 124,8 g/L; a acidez total foi acompanhada durante o processo de vinificação e durante a fermentação variando entre 3,6 e 8,1 g/L. O ácido málico presente nos fermentados de amora teve uma média de 3,5 g/L. Além do ácido málico encontram-se na bebida o ácido tartárico e em menor quantidade o ácido cítrico, provenientes da fruta, enquanto que os ácidos láctico, acético e succínico foram produzidos durante o processo de fermentação alcoólica. (ZOECKLEIN et al., 1995 *apud* JOHNSON e MEJIA, 2012).

Em um estudo realizado por Arozarena, Ortiz, et al. (2012) foram elaborados vinte e oito fermentados de amora (*Rubus glaucus* Benth.), utilizando a fruta oriunda do Equador, com diferentes condições de processamento (uso de *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae* e *oviformis*, com e sem a presença das frutas durante a fermentação e diferentes proporções de água e fruta no mosto) e avaliaram-se o conteúdo total de compostos fenólicos, elagitaninos, antocianinas, cor e atividade antioxidante.

A acidez fixa ou não volátil presente no fermentado de amora varia consideravelmente dependendo da acidez presente na fruta, da levedura ou bactéria utilizada na fermentação, do clima e das condições de crescimento da fruta. É de extrema importância a quantificação da acidez, pois esta influencia na estabilidade e na qualidade do fermentado. Além disso, a concentração de etanol auxilia na estabilidade dos fermentados e contribui para as suas propriedades sensoriais (JOHNSON E MEJIA, 2012).

3.4 Compostos bioativos

A motivação para o estudo de diversos alimentos de origem vegetal nos últimos anos foram os componentes com propriedades funcionais. Muitas frutas são estudadas, principalmente as chamadas “berries” ou “pequenos frutos”, em sua grande maioria pela sua cor vermelho-escuro e roxo, sendo estas a amora (*Rubus*

spp.), framboesa (*Rubus idaeus*), mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.) e morango (*Fragaria vesca* L.), conhecidas pela sua elevada concentração de compostos fenólicos, fitoquímicos com um alto potencial antioxidante (SOUZA, 2008). Na figura 5, observa-se a subdivisão de compostos bioativos presentes em alimentos de origem vegetal.

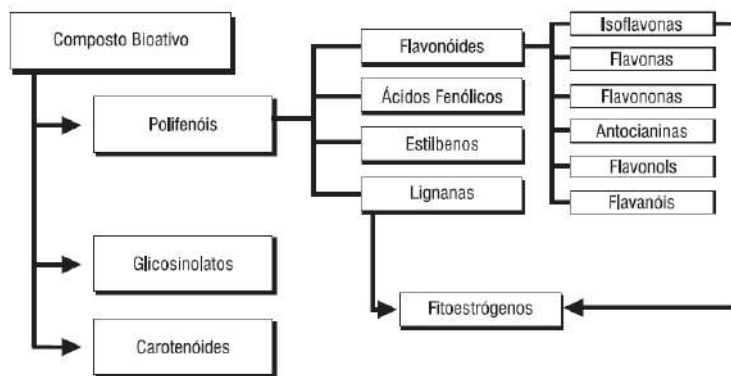


Figura 5: Subdivisão de compostos bioativos presentes em alimentos de origem vegetal.
Fonte: (HORST e LAJOLO, 2007).

3.4.1 Compostos fenólicos ou polifenóis

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de diversas plantas, e estão presentes em frutas, vegetais, folhas, nozes, sementes, flores e cascas (SELLAPPAN, AKOH e KREWER, 2002).

Estes são classificados como flavonóides e não flavonóides, e contribuem de forma significativa para as características sensoriais do **vinho**, principalmente cor, sabor, adstringência e amargor. Estes compostos são amplamente estudados pelo papel que possuem na prevenção de doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares e câncer, devido à atividade antioxidante elevada. Em destaque, os flavonóides e as antocianinas possuem grande capacidade de reagir com radicais livres. A amora-preta apresentou o maior conteúdo de compostos fenólicos totais quando comparada a frutas da mesma família botânica, como a framboesa e o morango (KUSKOSKI, ASUERO, et al., 2005; GRANATO, KATAYAMA e DE CASTRO, 2011).

3.4.1.1 Flavonóides

Os flavonóides são pigmentos naturais, que nas pequenas frutas encontram-se ligados a açúcares, formando complexos chamados glicosídeos, que se dividem em subgrupos: antocianinas, flavanas, flavanonas, flavonas, flavonóis, e isoflavonóides. Dentre os mais diversos compostos fenólicos, os flavonóides são os que possuem maior ação terapêutica por possuírem grande capacidade de reagir com radicais livres e desta forma são capazes de exercer efeitos protetores para o cérebro, retardando o envelhecimento e doenças relacionadas, além de possuírem atividade antioxidante, anticancerígena e antiinflamatória (SOUZA, 2008).

Antocianinas

As antocianinas, compostos classificados como flavonóides, pertencem a um grupo de pigmentos vegetais hidrossolúveis, que conferem as várias nuances entre laranja, vermelho e azul, exibidas pelas frutas, hortaliças, folhas, flores e raízes. Ultimamente, relatos científicos têm demonstrado que as antocianinas apresentam efeitos fisiológicos capazes de reduzir o risco de doenças (SOUZA, 2008).

As frutas do gênero *Rubus* são conhecidas por serem fontes naturais de antocianinas, glicosídeos de cianidina e em alguns casos glicosídeos de pelargonidina (MORENO-ALVAREZ, MATOS, et al., 2002). A cianidina foi detectada como o pigmento predominante em cinco cultivares de amora-preta, contribuindo com aproximadamente 66-80% do total de antocianinas (HASSIMOTTO, 2004 *apud* MOTA, 2006).

As antocianinas encontradas em maior proporção nos fermentados de amora foram cianidina-3-rutinosídeo e cianidina-3-glicosídeo, seguidas por outros compostos em menores proporções. Apenas duas das antocianinas encontradas eram originárias da amora, enquanto os demais compostos derivados de antocianinas foram gerados durante e após a fermentação alcoólica (ARZARENA, ORTIZ, et al., 2012). A cianidina-3-glicosídeo, principal antocianina nas amoras, é responsável pela atividade antioxidante nas frutas e previne a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade em humanos (WANG, BOWMAN e DING, 2008; SATUÉ-GARCIA, HEINONEN e FRANKEL, 1997).

As antocianinas encontradas em amora-preta por Ferreira (2008) no cultivar Tupy foram cianidina-3-glucosídeo, cianidina-3-dioxalil-lucosídeo, cianidina-3-malonil-glucosídeo e cianidina-3-rutinosídeo. A principal antocianina na fruta é a cianidina-3-glucosídeo, representando 92,7% das antocianinas totais.

Flavanóis

Os flavanóis analisados na amora-preta por Sellapan, Akoh e Krewer (2002) foram a catequina e epicatequina, sendo a catequina encontrada em altas concentrações, enquanto que a epicatequina não estava presente em quantidades detectáveis.

Flavonóis

Os flavonóis encontrados na amora-preta são a miricetina, quercetina e caempferol, sendo que caempferol encontra-se em quantidades não significativas no estudo realizado por Sellapan, Akoh e Krewer (2002).

3.4.1.2 Ácidos Fenólicos

São encontrados os seguintes ácidos fenólicos na amora-preta: gálico, hidroxibenzóico, cafeico, cumárico, ferúlico e elágico, e seus derivados (SELLAPPAN, AKOH e KREWER, 2002).

O principal ácido fenólico da amora-preta é o ácido elágico, um hidrólito de elagitanina, que ocorre naturalmente, especialmente em frutas e nozes. Este constituinte químico possui ações antimutagênica e anticancerígena, além disso, este ácido e alguns elagitaninos têm mostrado propriedades inibidoras contra replicação do vírus *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) (ANTUNES, 2002).

Os ácidos fenólicos de diversas variedades de mirtilo e de amora foram identificados por Sellapan, Akoh e Krewer (2002). As amoras tiveram o menor conteúdo de ácido *p*-cumárico, quantidades moderadas de ácido ferrúlico e cafeico, maiores concentrações de ácido gálico, e elevadas concentrações de ácido elágico, sendo este o principal ácido fenólico encontrado na amora.

3.4.2 Carotenóides

Além das antocianinas, os carotenóides são importantes pigmentos naturais com diversas funções e ampla distribuição e diversidade estrutural. Estes compostos possuem a capacidade de desativar o oxigênio singleto caracterizando-o como um composto com poder antioxidante. A atividade provitamínica A é outra das suas funções, essencial para a visão, para o crescimento ósseo, na reprodução e na integração do sistema imunológico (OLIVER e PALOU, 2000; RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1996).

O teor total de carotenóides na amora-preta não é representativo como em outras frutas, isto ocorre devido ao elevado conteúdo de antocianinas totais. Apesar disso, foi encontrada uma grande variedade de carotenóides em um estudo realizado por Marinova e Ribarova (2007) ao analisar através de CLAE carotenóides em pequenos frutos, dentre eles a amora-preta, sendo os pigmentos encontrados a luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, α -caroteno, β -caroteno, todos em baixas concentrações.

3.4.3 Capacidade antioxidante

Em comparação com o morango, framboesa, mirtilo e cereja, a amora apresentou a maior atividade antioxidante e o maior valor de fenólicos, flavonóides, antocianinas e carotenóides (SOUZA, PEREIRA, et al., 2014).

Os efeitos antioxidantes e vasodilatadores de fermentados de amora, vinhos tintos e brancos foram comparados por Mudnic, Budimir, et al. (2012), e observou-se que embora os fermentados de amora apresentassem menor conteúdo de compostos fenólicos totais que os vinhos tintos, a sua capacidade antioxidante era maior, o que poderia estar relacionado com um conteúdo de compostos não flavonóides maior nos fermentados de amora, tendo o ácido gálico em maior quantidade.

Já o estudo realizado por Johnson e Mejia (2012) mostra que os fermentados de amora e mirtilo possuem capacidades antioxidantes similares ao vinho tinto, reforçando o potencial benefício à saúde destas bebidas alcoólicas.

3.5 Processo produtivo de bebida fermentada

Observa-se na figura 6 o diagrama do processo de produção de bebida fermentada.

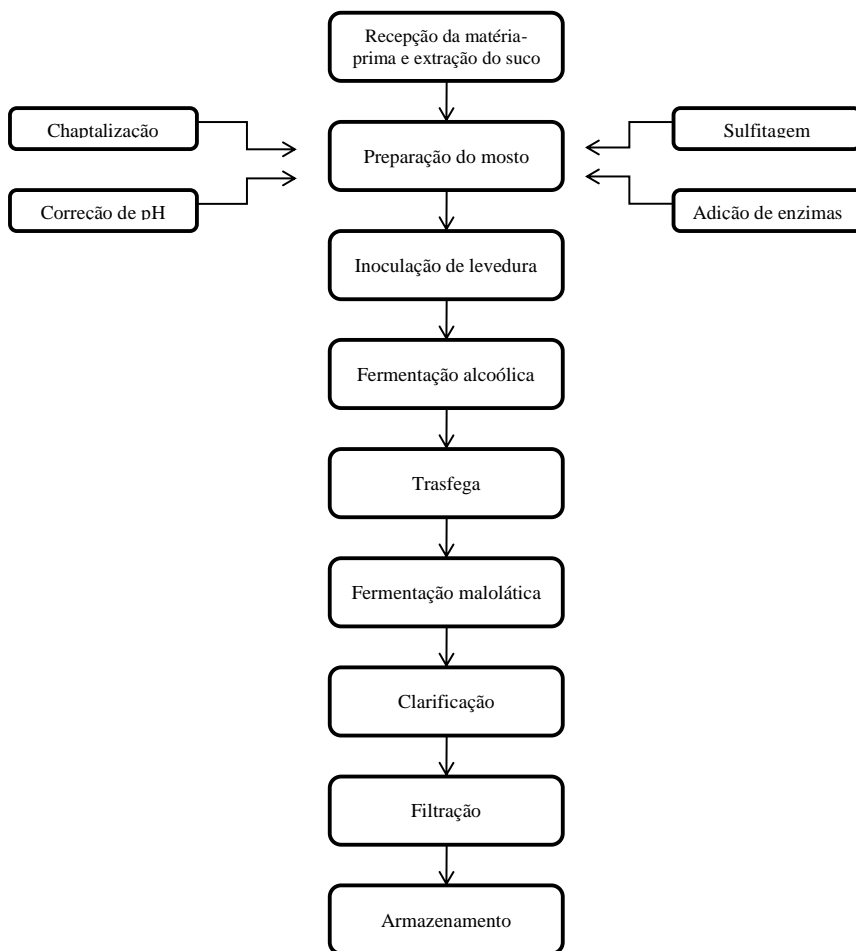


Figura 6: Diagrama do processo de produção de bebida fermentada.
Fonte: elaborado pelas autoras

3.5.1 Recepção da matéria-prima e extração do suco

O transporte das frutas é realizado em caixas de 1 m³ ou a granel, em caminhões e carretas. As frutas devem ser lavadas e selecionadas antes de serem processadas. Água corrente é utilizada na lavagem das frutas, em sistemas de canais onde elas flutuam e, em movimento, são conduzidas até a etapa de desintegração para a extração do suco. A extração de suco da polpa ocorre em prensas operadas por pressão, e podem ser de diferentes tipos como a prensa horizontal, prensa vertical, prensa de parafuso, prensa de banda ou de cinto (HASHIZUME, 2008).

3.5.2 Preparação do mosto

Chaptalização

A chaptalização consiste na correção do teor de açúcar presente no mosto. A adição de sacarose varia de acordo com o grau alcoólico que se pretende obter na bebida final, respeitada a legislação para fermentados de frutas, conforme descrito no item 3.2.2. Para a obtenção de cada 1,0 °GL de álcool, são necessários 17 g/L de açúcar (DIAS, PANTOJA e SCHWAN, 2010).

Correção de pH

Um baixo pH impede a multiplicação de bactérias não desejadas. Quando se utilizam frutas pouco ácidas recomenda-se ajustar o valor de pH entre 3,4 e 4,0 pois esta é a condição ótima para as leveduras utilizadas na fermentação dos mostos (KOLB, 2002 *apud* MORALES e HENRÍQUEZ, 2006, p. 7). O carbonato de cálcio (CaCO₃) é normalmente utilizado para a desacidificação química do mosto (DIAS, PANTOJA e SCHWAN, 2010). Em mosto deficiente de acidez, é realizado o processo de acidificação com a adição de ácido tartárico, e essa prática é denominada de tartaragem. Outra forma de diminuir o pH, seria a adição de ácido cítrico (HASHIZUME, 2008).

Sulfitagem

Após a correção do pH é realizada a adição de metabissulfito de potássio empregado como agente antioxidante (DIAS, PANTOJA e SCHWAN, 2010). O anidrido sulfuroso ou dióxido de enxofre (SO₂) ao ser acrescentado ao mosto possui diversas vantagens, como efeito antioxidante ao constituir uma barreira entre o oxigênio do ar e o mosto; efeito antioxidásico ao destruir a oxidase, catalisadora da oxidação; efeito antisséptico por exercer uma ação inibidora polivalente sobre os microorganismos (leveduras, bactérias acéticas, bactérias lácticas); efeito estimulante sobre as leveduras e ativar a transformação do açúcar; e efeito seletivo por selecionar as leveduras, favorecendo o desenvolvimento das leveduras elípticas e inibindo as espécies pouco alcoogênicas (HASHIZUME, 2008).

Adição de enzimas

Pectinases, hemicelulases, glucanases e glicosidades são normalmente empregadas nos processos de vinificação, com o objetivo de melhorar a decantação das borras ao final da fermentação, melhorar a estabilidade da cor da bebida e acelerar a clarificação do vinho (GUERRA, 2010).

3.5.3 Inoculação de levedura

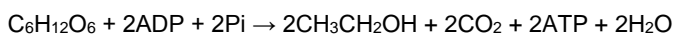
Culturas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* são utilizadas na elaboração de bebidas fermentadas, apresentando características desejáveis como a rápida iniciação da fermentação, conversão eficiente de açúcares fermentescíveis a etanol, manutenção das células por todo o período de fermentação, tolerância ao etanol, viabilidade durante a estocagem, resistência ao dióxido de enxofre, formação de componentes do buquê e capacidade de floculação. Porém as *Saccharomyces* apresentam algumas características indeseáveis, como sintetizar derivados sulfitados ou mercaptanas, produzir excesso de acetaldeído, ácido acético e alcoóis superiores, capacidade de formar espuma e produção de uréia, a qual pode ser convertida a carbamato de etila, que tem ação tóxica no organismo humano (DIAS, PANTOJA e SCHWAN, 2010).

Em um estudo realizado por Eglinton et al. (2000), ao comparar a *Saccharomyces cerevisiae* e a *Saccharomyces bayanus* na produção de vinho a partir de uvas Chardonnay, ele observou que o vinho produzido com a *Saccharomyces bayanus* apresentou maiores quantidades de ácido succínico, glicerol, acetaldeído e SO₂; e menores quantidades de ácido acético, ácido málico e acetato de etila que o vinho produzido com a *Saccharomyces cerevisiae*.

3.5.4 Fermentação alcoólica

O processo fermentativo é composto por um conjunto de reações enzimaticamente controladas, através das quais uma molécula orgânica é degradada em compostos mais simples e com liberação de energia (NELSON e COX, 2002).

A equação geral da fermentação alcoólica é:



O gênero *Saccharomyces* pode utilizar mais de uma fonte de carbono para realizar a fermentação alcoólica, como sacarose, maltose, galactose, manose, frutose e glicose. Porém os açúcares metabolizados de forma mais eficiente são a frutose e a glicose. A levedura no processo fermentativo produz além do etanol, glicerol e ácido acético, compostos responsáveis pelo aroma e sabor da bebida, como ésteres, aldeídos, alcoóis superiores e ácidos orgânicos. Compostos indesejáveis como mercaptanas e gás sulfídrico também podem ser formados, originando aromas desagradáveis na bebida e diminuindo sua qualidade (DIAS, PANTOJA e SCHWAN, 2010).

Antes do início da fermentação são adicionados compostos que atuam como ativadores de fermentação, são estes a tiamina e o fosfato de amônio. O uso de ativadores de fermentação tem como objetivo favorecer uma rápida multiplicação das leveduras, o aumento da população, do potencial enzimático e da velocidade da fermentação (WITT, 2006 *apud* NAVARRE, 1997). A tiamina, conhecida como vitamina B1, é de grande importância assim como a biotina. Ela ativa e fornece maior

regularidade à fermentação, e as leveduras realizam melhor a transformação do açúcar (WITT, 2006). O fosfato de amônio é a fonte das substâncias nitrogenadas necessárias para o crescimento das leveduras, e estes compostos são indispensáveis à atividade e multiplicação celular, os quais as leveduras não sintetizam. Estes compostos diminuem a fase de latência das leveduras (WITT, 2006 *apud* NAVARRE, 1997).

3.5.4.1 Cinética de fermentação

Segundo Viegas (2003), o objetivo básico do estudo da cinética de processos microbianos se encontra na quantificação do crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto. Neste tipo de estudo também é interessante avaliar a influência de fatores como pH, temperatura e inibidores destas taxas.

A avaliação da cinética do processo fermentativo é de extrema importância. É através dos resultados desta avaliação que estratégias de operação são desenvolvidas, com o objetivo de se alcançarem sistemas mais produtivos (SIQUEIRA FILHO, 1997).

3.5.4.2 Fatores que afetam a fermentação alcoólica

Temperatura

Alta temperatura é prejudicial para as leveduras, microrganismos mesófilos, e benéfica para as bactérias que causam danos ao fermentado. Visto que a fermentação alcoólica é um processo que produz calor, a temperatura de fermentação deve ser mantida entre 18 e 20°C (KOLB, 2002 *apud* MORALES e HENRÍQUEZ, 2006, p. 7). À medida que a temperatura aumenta no processo fermentativo, aumenta a velocidade da fermentação, mas favorece a contaminação bacteriana, ao mesmo tempo que a levedura fica mais sensível à toxidez do etanol (LIMA, BASSO e DE AMORIM).

Concentração de açúcares

O aumento da concentração de açúcares promove o aumento da velocidade de fermentação e da produtividade, o menor crescimento do fermento e a menor

formação de glicerol por unidade de substrato processado. Porém elevados valores de açúcar provocam um estresse osmótico da levedura, portanto há uma faixa de concentração considerada ideal (HASHIZUME, 2008).

3.5.5 Trasfega

Esta prática consiste em transferir o sobrenadante para outro tanque fermentativo, com a finalidade de separá-lo dos resíduos depositados no fundo (ASQUIERI, et al., 1997). Estes resíduos são partículas grosseiras provenientes das frutas, leveduras selvagens, enzimas oxidantes, colóides e sedimentos, que podem além de turvar a bebida, modificar os aspectos sensoriais (PUIG-DEU, et al., 1996).

3.5.6 Fermentação malolática

A fermentação malolática, também conhecida como fermentação lenta, é responsável pela conversão enzimática do ácido L-málico em ácido L-láctico, sendo as bactérias lácticas dos gêneros *Oenococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc* os principais microrganismos desta etapa (MILLER e FRANZ, 2011).

Esta fermentação contribui para a redução da acidez da bebida fermentada, aumenta a estabilidade microbiana e melhora significativamente o aroma. Normalmente esta etapa ocorre após o término da fermentação alcoólica, quando a autólise das leveduras se intensifica. Há duas formas de ocorrer: de forma espontânea ou através da inoculação de bactérias lácticas ao fermentado (GUERRA, 2010).

3.5.7 Clarificação

Após o processo de produção, o fermentado pode apresentar uma turbidez elevada, devido principalmente a proteínas que sofreram desnaturação e formaram agregados protéicos insolúveis (POCOCK, SALAZAR e WATERS, 2011). Este problema é resolvido através da clarificação ou afinamento do fermentado, que consiste na adição de agentes de colagem como gelatina, caseína, ovalbumina, glúten parcialmente hidrolisado e bentonita, resultando em uma bebida límpida e brilhante (TOLEDO, TEIXEIRA e CONAGIN, 1962).

3.5.8 Filtração

A filtração consiste na retirada de micropartículas inorgânicas e orgânicas através de filtros à vácuo, usando-se como elemento filtrante perlita ou terra diatomácea e filtros de placas dispostas em série, com ou sem o uso de perlita ou terra diatomácea como elemento filtrante (GUERRA, 2010).

3.5.9 Armazenamento

O armazenamento visa evitar que a bebida entre em contato com o ar atmosférico durante a estocagem, o que pode acarretar o seu avinagramento, devido a ação de bactérias acéticas. Tal etapa consiste em encher totalmente o recipiente em que o produto será armazenado. O recipiente é então hermeticamente fechado, podendo usar rolhas de cortiça, no caso de garrafas, ou tanques herméticos (GARRUTI, 2011).

4 Materiais e Métodos

4.1 Materiais Utilizados

Para a condução das fermentações, foi utilizada na elaboração do mosto a amora madura congelada da marca DeMarchi, comprada no CADEG – Centro de Abastecimento do Estado da Guanabara, Rio de Janeiro. As informações nutricionais são apresentadas na tabela 1, cedidas pelo fabricante. A amora escolhida foi a congelada devido à alta perecibilidade da fruta. O congelamento garante maior qualidade microbiológica e auxiliou no desenvolvimento deste estudo. As amoras compradas pertenciam ao mesmo lote, para a padronização, bem como para reduzir a carga contaminante inicial.

O fermento utilizado foi a levedura desidratada ativada da marca Perdomini-IOC® (Blastocel Delta). A cepa adicionada foi a *Saccharomyces cerevisiae bayanus* que, segundo o fabricante, tolera uma ampla faixa de temperaturas de fermentação (entre 12 e 35°C), produz uma pequena quantidade de ácidos voláteis, acetaldeído, assim como SO₂ e H₂S.

Foram usados como aditivos o metabissulfito de potássio e o ativador de fermentação, ambos adquiridos em empresa especializada (Vêneto Mercantil), além da sacarose P. A. cristalizada.

Os materiais utilizados na elaboração do fermentado de amora estão apresentados na figura 7.



Figura 7: Materiais utilizados na elaboração da bebida fermentada de amora.

Tabela 1: Tabela nutricional da amora-preta da marca DeMarchi.
Fonte: <http://www.demarchi.com.br/industrial/frutas-congeladas/amora>

Informação Nutricional Porção de 163g (1 1/2 copo)		
Quantidade por porção		%VD(*)
Carboidratos	16g	5%
Valor energético	70 kcal = 294 kJ	3%
Proteínas	2,3g	3%
Gorduras Totais	0,6g	1%
Gorduras Saturadas	0g	%
Gorduras Trans	0g	-
Fibra Alimentar	2,7g	11%
Sódio	16,3mg	0%

* Valores Diários com base em uma dieta de 2.000 kcal ou 8400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas.

4.2 Contagem total de microrganismos

Com o objetivo de avaliar a qualidade microbiológica das amoras que seriam usadas para as fermentações, foi realizada a contagem total de microrganismos.

As amoras foram colocadas em um homogeneizador de amostras a fim de obter uma homogeneização mais adequada. Foram pesados 25 g de amostra e transferiu-se para 225 mL de água esterilizada, correspondendo a diluição 10^{-1} . A partir desta diluição foram preparadas as diluições subsequentes de 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . Foi utilizada a técnica de plaqueamento por profundidade, onde 1mL de cada diluição foi transferida para placas de Petri estéreis, adicionando-se aproximadamente 15 mL de PCA – Plate Count Agar, seguida de incubação a 36°C por 24 h. Após o período de incubação, procedeu-se para a contagem das colônias com o auxílio de um contador de colônias manual (Phoenix Luferco) (Swanson et al., 2001).

4.3 Condução das fermentações

4.3.1 Fermentação inicial

Anteriormente à fase de condução das fermentações estudadas para a escolha da melhor condição de cultivo, foi realizada uma fermentação inicial. Este ensaio foi conduzido como uma primeira tentativa de fermentação, que se bem sucedida seria usada como base para a definição de um plano de ação a partir de seus resultados.

Foi avaliada a necessidade de diluição da fruta para o preparo do mosto e foi avaliado o grau Brix inicial para avaliar a necessidade de chaptalização. Para a fermentação inicial, foram pesados 250 g de amora e adicionados a 250 mL de água. A partir do suco obtido, 500 mL foram utilizados para a elaboração do mosto, que posteriormente foi dividido em dois erlenmeyers com 200 mL de mosto em cada. As concentrações de ativador de fermentação e leveduras foram iguais a 0,15 g/L, definidas seguindo as indicações dos rótulos dos produtos. O metabissulfito de potássio foi adicionado em quantidade suficiente para alcançar a concentração de 50 ppm. A quantidade de açúcar adicionada, 28 g em cada duplicata, foi calculada para que se alcançasse o teor de sólidos solúveis igual a 18 °Brix, sendo que o mosto inicial apresentou 4 °Brix. A fermentação foi conduzida por 5 dias a 22 °C. Após este período foram medidos, o ° Brix e o teor de etanol, conforme descrito posteriormente. As etapas desde a obtenção do mosto até a inoculação estão detalhadas no próximo item deste trabalho.

4.3.2 Fermentações para o estudo das condições de cultivo

Nesta etapa, foram realizados 11 ensaios diferentes, variando a temperatura, concentração de ativador de fermentação e de leveduras. O objetivo final era a realização de um planejamento estatístico para a definição da melhor entre as condições avaliadas.

4.3.2.1 Obtenção do mosto

Suco de amora: Primeiramente foi preparado o suco de amora. Foram pesados 500 g da amora já descongelada e homogeneizadas em liquidificador comum de cozinha com 500 mL de água destilada.

Chaptalização: Baseado na medida de °Brix das amostras do suco de amora, descrita no item 4.5.2 foi possível estimar a quantidade de açúcar necessária para a correção dos mostos, a fim de atingir o grau alcoólico desejado no produto final. Segundo a literatura, uma boa estimativa para o fator de conversão de açúcar em álcool é o índice 2. A chaptalização foi feita com a intenção de se obter um fermentado com teor alcoólico em torno de 14%, o máximo permitido pela legislação (quadro 3). Nesse sentido, buscou-se alcançar um mosto final com 28 °Brix usando o cálculo descrito a seguir.

Cálculo:

$$Q = A \times 2 - B$$

Q = Quantidade de açúcar a ser adicionado (g/hL)

A = Teor de álcool desejado (%)

B = °Brix do mosto antes da adição de açúcar

A partir do cálculo apresentado, foram adicionados 250 g de açúcar em 1 L de mosto, tendo em vista o que o valor inicial encontrado no mosto foi de 4 °Brix.

Sulfitação: Nesta etapa, os mostos sofreram a adição de metabissulfito de potássio em concentração igual a 50 ppm, o que corresponde a 25 ppm de SO₂ livre. Para tal, foi preparada uma solução 10% (m/v) em água, pesando 0,1 g de metabissulfito de potássio com posterior diluição em 1 mL de água destilada. 0,5 mL desta solução foram adicionados aos mostos de 1 L. A sulfitação é importante para prevenir o desenvolvimento de bactérias e leveduras selvagens, além de oxidações indesejáveis, sem atrapalhar a atividade do inóculo.

Adição do ativador de fermentação: A suplementação do mosto com nutrientes é importante para permitir uma velocidade de crescimento máxima e/ou diminuir a fase de adaptação. O ativador de fermentação utilizado no presente estudo é composto por: fosfato de amônio bi-básico, perlita e cloridrato de tiamina (B1). Diferentemente das etapas anteriores nas quais quantidades fixas de açúcar e metabissulfito de potássio foram adicionadas, a adição de ativador de fermentação foi diferente para cada ensaio (ver item 4.4.1).

4.3.2.2 Inoculação

O fermento utilizado foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* desidratada. Assim como o ativador de fermentação, a concentração do inóculo variou para cada experimento (ver item 4.4.1). As leveduras foram reidratadas em volumes de água destilada correspondentes a 5% de cada solução, a temperatura de 40°C. Durante a reidratação, a levedura foi mantida em repouso por 10 minutos, em seguida sofreu leve agitação para então repousar por mais 10 minutos e ser adicionada ao mosto. Posteriormente uma alíquota deste inóculo foi avaliada quanto a sua viabilidade celular, conforme descrito no item 4.5.3.

4.3.2.3 Processo fermentativo

Após as etapas descritas acima, os mostos inoculados foram acondicionados em estufa ou shaker, com o controle de temperatura e sem agitação. As fermentações foram acompanhadas por 240 horas, sendo coletadas amostras em 0, 72, 144 e 240 horas para a posterior análise do °Brix.

4.4 Estudo das condições de cultivo

4.4.1 Planejamento Fatorial

Com o intuito de analisar as melhores condições de cultivo para a elaboração de um fermentado de amora, foi feita uma análise do efeito das variáveis temperatura, concentração de inóculo e concentração de ativador de fermentação, e da interação entre elas sobre a resposta redução do °Brix, utilizando o planejamento experimental do tipo fatorial completo 2³. As variáveis foram avaliadas nos seguintes níveis: temperatura de 20, 25 e 30°C, concentração de ativador de fermentação de 0,2; 0,6; 1,0 g/l e concentração de inóculo de 0,2; 0,6; 1,0 g/l. Para o planejamento, foram conduzidas no total 11 fermentações sendo 8 do planejamento fatorial e 3 ensaios no ponto central (tabela 2). A análise do planejamento foi realizada empregando o software Statistica 7.0 e foi utilizado nível de significância de 0,1 (90% de confiança).

Tabela 2: Matriz do planejamento fatorial 2³.

Ensaio	Temperatura (°C)	Ativador de fermentação (g/L)	Leveduras (g/L)
1	20	0,2	0,2
2	20	0,2	1,0
3	20	1,0	0,2
4	20	1,0	1,0
5	30	0,2	0,2
6	30	0,2	1,0
7	30	1,0	0,2
8	30	1,0	1,0
9	25	0,6	0,6
10	25	0,6	0,6
11	25	0,6	0,6

4.4.2 Fermentação na melhor condição de cultivo

Após o planejamento fatorial realizado com os 11 ensaios, foi selecionada a melhor condição de cultivo para a elaboração de um fermentado de amora no que diz respeito à concentração de ativador de fermentação, concentração de leveduras e temperatura de acondicionamento.

Foram realizadas duas fermentações nas condições escolhidas, em duplicata, para o estudo da cinética. As fermentações se diferenciaram na etapa de chaptalização do mosto. Em uma das fermentações, a correção do °Brix foi feita como

nos experimentos anteriores, adicionando todo o açúcar ao mosto no início da fermentação. Na segunda, foi adicionado açúcar no início da fermentação em quantidade necessária para alcançar 15 °Brix e 24 horas depois foi adicionado o restante para obter o teor de sólidos solúveis próximo a 28 °Brix no total. Tal procedimento foi adotado para avaliarmos a possível inibição das leveduras pelo alto teor de açúcar inicial no mosto. Sendo assim, a sacarose foi adicionada em uma primeira etapa para ativar as leveduras e 24 horas depois foi adicionado o restante.

Assim como nos experimentos anteriores, o suco de amora foi elaborado e após a adição de açúcar, os dois mostos de 500 mL foram divididos em dois erlenmeyers de 250 mL, totalizando quatro erlenmeyers com 200 mL de mosto em cada, para cada estratégia de chaptalização.

O mosto inoculado foi acondicionado durante 13 dias, havendo o controle da temperatura. Amostras foram coletadas de 48 em 48 horas para que fosse realizado um estudo cinético, As amostras foram analisadas para determinação do grau Brix, concentração de etanol, concentração de açúcar redutor e pH.

4.5 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas realizadas nas amostras de mostos e fermentados de amora foram:

4.5.1 Acompanhamento do pH

O pH foi acompanhado durante os dias 0, 3, 6 e 10 nas fermentações analisadas no estudo estatístico e também a cada dois dias, durante os 13 dias nas fermentações realizadas a partir das condições escolhidas. O pH foi determinado por potenciometria, utilizando um pHmetro de bancada digital, modelo SP 1800 e marca Sensoglass, previamente calibrado com soluções tampão (pH = 4,0 e pH = 7,0).

4.5.2 Teor de sólidos solúveis

Assim como o pH, o teor de sólidos solúveis foi acompanhado nos dias 0, 3, 6 e 10 nas fermentações iniciais, além de ter sido acompanhado a cada dois dias nas fermentações conduzidas nas melhores condições de cultivo. Amostras de 1,5 mL dos

mostos foram centrifugadas e os sobrenadantes foram utilizados para a medição do teor de sólidos solúveis. Este foi determinado através da leitura em refratômetro de mão, marca Quimis, modelo Q 667. O refratômetro fornece os valores em °Brix e são necessárias no máximo três gotas da amostra para a medição.

4.5.3 Quantificação de açúcares redutores

Primeiramente, foi realizada a hidrólise ácida das amostras, devido a presença de açúcares não redutores. A seguir a quantificação de açúcares redutores totais (ART) foi realizada através do método DNS, segundo Miller modificado (1959). O teste de DNS (ácido dinitrosalicílico) baseia-se na reação entre o açúcar redutor e o ácido 3,5-dinitrosalicílico (cor amarelo), que é reduzido a um composto colorido avermelhado, o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, oxidando o monossacarídeo redutor (MALDONADE, CARVALHO e FERREIRA, 2013).

Curva padrão de glicose

Para a determinação das concentrações de açúcares redutores totais foi construída uma curva padrão através de soluções padrão de glicose em concentrações conhecidas variando de 0,18 a 1,44 g/L, a partir de uma solução com concentração de glicose de 1,8 g/L. O branco utilizado para calibrar o aparelho foi obtido utilizando 1 mL de água. Em cada tubo de ensaio adicionou-se 1 mL de DNS e estes foram incubados em banho-maria a 100°C por 5 minutos. A seguir, adicionaram-se 13 mL de água à mistura e realizou-se a leitura da absorbância no comprimento de onda de 540 nm em espectrofotômetro Biospectro®, modelo SP-220.

Hidrólise ácida

A hidrólise ácida foi realizada adicionando-se 1 mL da amostra e 1 mL de HCl 2 M em tubo de ensaio. Incubaram-se os tubos em um banho-maria a 70°C por 10 minutos. Após esfriarem, adicionaram-se 3 mL de NaOH 1 M com o objetivo de interromper a hidrólise ácida, neutralizando a solução.

Análise de ART

Após a hidrólise ácida, foram realizadas as devidas diluições de acordo com o limite de detecção do espectrofotômetro e do intervalo medido na curva padrão de glicose. De cada diluição, retirou-se uma alíquota de 1 mL, e a esta foi adicionado 1 mL de DNS e os tubos de ensaio foram incubados em banho-maria a 100°C por 5 minutos. A seguir, adicionaram-se 13 mL à mistura e realizou-se a leitura da absorbância no comprimento de onda de 540 nm em espectrofotômetro Biospectro®, modelo SP-220.

4.5.4 Quantificação de etanol

O etanol foi quantificado através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-RID). As amostras foram diluídas e filtradas em um microfiltro de PVDF 0,22 µm (Millipore Millex – GV). As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent Technologies 1260 Infinity. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna HPX-87H (BioRad) mantida a 60°C. A fase móvel constituiu de uma solução de H₂SO₄ 0,005 M preparada com água milliQ (filtrada e sonicada em banho de ultra-som) e o fluxo foi mantido a 0,600 mL/min. O volume injetado foi de 20 µL e os compostos foram detectados através do detector de índice de refração (RID). Os dados adquiridos foram processados pelo software ChemStation.

4.6 Contagem de células de leveduras viáveis

Foi realizada a contagem de células de leveduras viáveis em câmara de Neubauer, utilizando o azul de metileno como corante vital. O procedimento foi adotado para avaliar a viabilidade das leveduras após passarem pela desidratação.

4.7 Determinação de parâmetros cinéticos da fermentação

A partir dos dados de produção de etanol e quantificação de açúcares redutores da fermentação nas melhores condições, os parâmetros cinéticos descritos abaixo foram calculados:

Cálculo do rendimento, produtividade e do parâmetro cinético da fermentação alcoólica ($Y_{p/s}$)

O rendimento (%) e a produtividade (g/L.h) para a produção de bebida fermentada de amora, foram calculados pelas equações 1 e 2:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{Q_{\text{exp}}}{Q_{\text{teo}}} \times 100 \text{ (\%)} \quad (1)$$

$$\text{Produtividade (g/L.h)} = \frac{Q_{\text{exp}}}{t} \quad (2)$$

Onde:

Q_{exp} = concentração de etanol experimental (g/L)

Q_{teo} = concentração de etanol teórico (g/L) = quantidade de açúcares consumidos \times 0,511

t = tempo de fermentação (h)

O parâmetro cinético $Y_{p/s}$ foi calculado através da equação 3:

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (3)$$

Onde:

S = concentração final de substrato (g/L)

S_0 = concentração inicial de substrato (g/L)

P = concentração final de produto (g/L)

P_0 = concentração inicial de produto (g/L)

$Y_{P/S}$ (rendimento em produto) = quantidade de produto formado em relação à quantidade de substrato limitante consumido.

5 Resultados e Discussão

5.1 Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas

A legislação brasileira não determina limites específicos para a contagem total de aeróbios mesófilos, porém esta contagem é considerada necessária para frutas e polpas de frutas por ser um indicador geral de qualidade dos alimentos, indicando se as condições de processamento, manuseio e estocagem foram realizadas de forma adequada.

A contagem total de bactérias aeróbias mesófilas nas amoras após um período de incubação de 24 h a 36°C foi de $5,2 \times 10^2$ UFC/g. A partir deste resultado concluiu-se que a amora apresentou contaminação microbiológica inicial baixa, e que a fruta pode ser utilizada para a produção do fermentado, visto que a levedura que será inoculada dominará facilmente esta contaminação, e o metabissulfito de potássio adicionado atua na prevenção do crescimento de bactérias e leveduras selvagens, sem atrapalhar a atividade do inóculo.

5.2 Fermentação inicial

Foi realizada uma primeira fermentação com o objetivo de avaliar a viabilidade da matéria-prima escolhida para elaboração do fermentado, Para esta primeira fermentação o teor de sólidos solúveis foi ajustada para 18 °Brix e a fermentação foi conduzida a 22°C por 5 dias. Os resultados desta primeira fermentação foram bastante satisfatórios. Em 5 dias de fermentação, o teor de sólidos solúveis foi reduzido de 18 °Brix para 6 ° Brix e o teor de etanol obtido foi 8,5% v/v. Sendo assim, não se fez necessária a condução de outra fermentação e esta, juntamente com resultados da literatura, seguiu de embasamento para a determinação das variáveis a serem estudadas (temperatura, concentração de inóculo e ativador de fermentação) e os níveis de cada uma das variáveis.

5.3 Estudo das condições de cultivo

As três diferentes concentrações de ativador de fermentação e leveduras, assim como as temperaturas, foram definidas a partir dos resultados da fermentação

inicial e de estudos da literatura.

Foi observada grande variação entre os trabalhos da literatura no que diz respeito à concentração ideal de leveduras no mosto em g/L. Garruti, Casimiro e Abreu (2011) recomendam, para a elaboração de bebidas fermentadas, concentração de leveduras entre 0,1 e 0,2 g/L. Andrade e outros (2013) utilizaram concentração igual a 1,65 g/L na elaboração de uma bebida fermentada de morango. Na produção de um fermentado de Umbu, Gomes e outros utilizaram concentração de leveduras igual a 2,35 g/L de mosto. Por sua vez, Corazza, Rodrigues e Nozaki (2000) utilizaram concentração muito superior às dos trabalhos citados, adicionando 10 g de leveduras em 1 L de mosto. Sendo assim, a partir dessas informações e do rótulo do produto, o qual recomenda a concentração de leveduras entre 0,15 e 0,25 g/L de mosto, foram definidas as seguintes concentrações: 0,2 g/L, pois está inclusa na faixa de recomendação de Garruti (2011), além de se encontrar dentro da faixa indicada do rótulo; 1,0 g/L, para se aproximar mais das concentrações usadas na literatura, sem ser um valor muito superior ao indicado no rótulo e reduzir os tempos de fermentação; a escolha do 0,6 g/L foi consequência, visto que se trata do ponto central do planejamento.

Os valores definidos para as concentrações do ativador de fermentação no mosto foram os mesmos das concentrações de leveduras inoculadas. O nível mais baixo foi escolhido seguindo a indicação no rótulo do produto, a qual era a mesma tanto para o ativador de fermentação quanto para as leveduras (entre 0,15 e 0,25 g/L). Optou-se por aumentar os valores da concentração de ativador de fermentação uma vez que também foi aumentada a concentração de inóculo inicial.

Segundo Garruti, Casimiro e Abreu (2011), a faixa de temperatura ideal para a fermentação é entre 18 e 20°C. Fontan e outros (2011) conduziram a fermentação para a obtenção de um fermentado de melancia a $28 \pm 0,1^\circ\text{C}$, assim como Andrade e outros (2013), que elaboraram um fermentado de morango a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Segundo essas informações foram definidas as temperaturas 20 °C, 25 °C e 30 °C.

Na tabela 3 são apresentadas as variações de °Brix ao longo do tempo de fermentação nas temperaturas de 20, 25 e 30°C, e posteriormente mostradas na forma de gráfico nas figuras 8, 9 e 10 respectivamente.

Tabela 3: Variações de °Brix durante o tempo para os 11 ensaios realizados.

Ensaio	Temperatura (°C)	Ativador de fermentação (g/L)	Leveduras (g/L)	°Brix			
				0 h	72 h	144 h	240 h
1	20	0,2	0,2	23,2	21,4	16,6	10,0
2		0,2	1,0	23,2	18,2	11,4	7,2
3		1,0	0,2	23,2	20,2	16,0	12,4
4		1,0	1,0	23,2	17,8	12,8	8,8
5	30	0,2	0,2	26,4	20,6	13,6	11,0
6		0,2	1,0	26,4	17,4	12,0	11,0
7		1,0	0,2	26,4	19,8	13,0	11,4
8		1,0	1,0	26,4	16,8	12,0	11,4
9	25	0,6	0,6	25,2	20,4	15,6	9,8
10		0,6	0,6	25,2	22,6	14,4	8,0
11		0,6	0,6	25,2	20,4	15,4	9,0

Na tabela 3 observa-se que a maior redução do °Brix foi de 23,2 para 7,2 °Brix empregando a temperatura de 20 °C, concentração de ativador de fermentação de 0,2 g/L e concentração de inóculo de 1 g/L no ensaio 2. Para a mesma condição de concentração de ativador de fermentação e inóculo e temperatura de 30 °C observa-se um valor de teor de sólidos suspensos residual maior. O perfil de redução de grau Brix pôde ser melhor observado nas figuras 8, 9 e 10 onde para a temperatura de 20 e 25 °C a redução é linear até 240 horas, enquanto que na temperatura de 30 °C a redução estabiliza de 144 a 240 horas. Isso indica que a fermentação a 30 °C ocorreu com uma velocidade muito alta nas primeiras horas e que a alta concentração de etanol gerada possa ter inibido a levedura, observando para todas as condições nesta temperatura valores de grau Brix em torno de 11 em 240 horas (tabela 3).

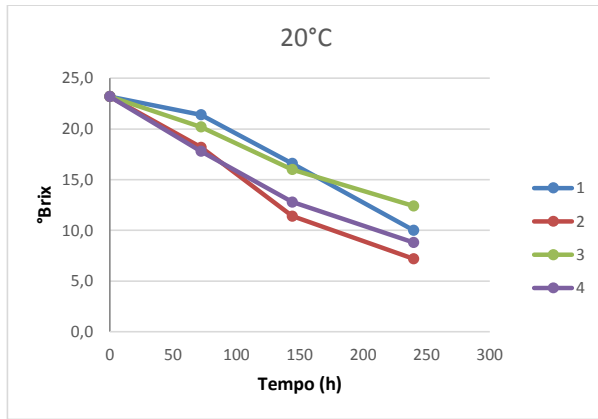


Figura 8: Variação de ° Brix ao longo do tempo de fermentação a 20°C.

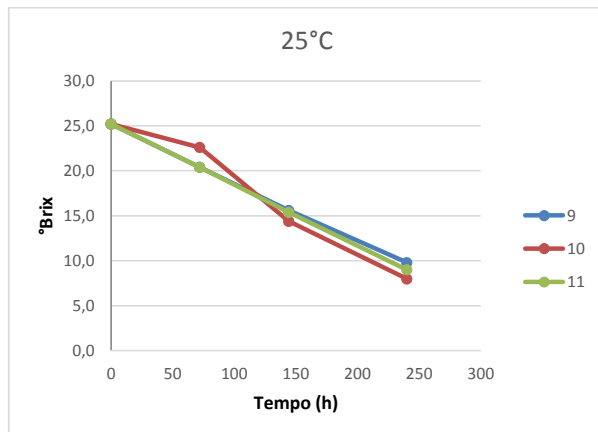


Figura 9: Variação de ° Brix ao longo do tempo de fermentação a 25°C.

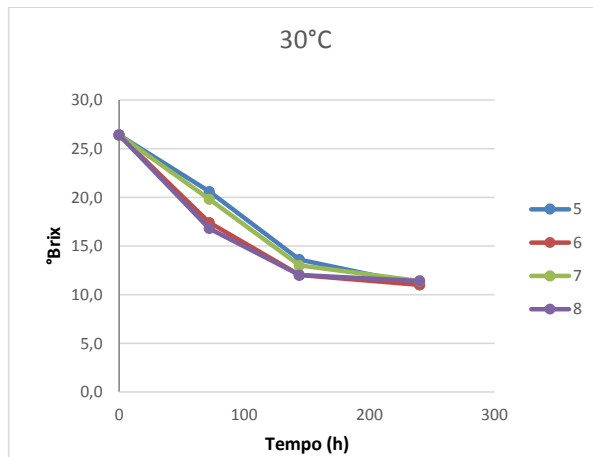


Figura 10: Variação de °Brix ao longo do tempo de fermentação a 30°C.

5.3.1 Planejamento experimental fatorial

Os dados apresentados na tabela 3 foram utilizados para avaliação dos efeitos das variáveis temperatura, concentração de inóculo e de ativador de fermentação e suas interações sobre a variável resposta % redução de °Brix, através da análise do planejamento experimental fatorial 2³. O intuito foi definir os melhores valores destas variáveis para operação do processo.

Na tabela 4 está a matriz do planejamento, na qual encontram-se os níveis codificados e reais para os onze ensaios realizados, bem como as respostas obtidas de valores de redução de grau Brix em 240 horas.

Tabela 4: Matriz do Planejamento fatorial 2³ para estudar a redução do °Brix após 240 horas dias de cultivo de fermentados de amora tendo como variáveis a temperatura, concentração de ativador de fermentação e concentração do inóculo.

	Temperatura (°C)	Concentração de ativador de fermentação (g/L)	Concentração de inóculo (g/L)	Redução de °Brix (%)
1	-1 (20)	-1 (0,2)	-1 (0,2)	56,9
2	-1 (20)	-1 (0,2)	1 (1,0)	69,0
3	-1 (20)	1 (1,0)	-1 (0,2)	46,6
4	-1 (20)	1 (1,0)	1 (1,0)	62,1
5	1 (30)	-1 (0,2)	-1 (0,2)	46,2
6	1 (30)	-1 (0,2)	1 (1,0)	46,2
7	1 (30)	1 (1,0)	-1 (0,2)	44,7
8	1 (30)	1 (1,0)	1 (1,0)	44,7
9	0 (25)	0 (0,6)	0 (0,6)	53,2
10	0 (25)	0 (0,6)	0 (0,6)	60,3
11	0 (25)	0 (0,6)	0 (0,6)	56,4

A tabela 5 apresenta os efeitos de cada variável de entrada e suas interações sobre a variável resposta. Foi possível concluir que a temperatura, assim como a concentração de ativador de fermentação e a interação entre a temperatura e a concentração de inóculo, apresentou efeito negativo sobre a % de redução de °Brix. Por outro lado, a concentração de inóculo e as interações entre temperatura e ativador de fermentação, e inóculo e ativador de fermentação apresentaram efeito positivo sobre o objetivo do estudo.

Foram considerados estatisticamente significativos os parâmetros que apresentaram valor de p inferior a 0,1 ($p < 0,1$), incluindo a temperatura que apresentou o maior efeito e o menor valor de p , a concentração de inóculo e a interação entre temperatura e concentração de inóculo. O efeito da temperatura foi negativo indicando em temperaturas mais próximas de 20 °C a redução do °Brix será mais alta. A concentração de inóculo teve um efeito positivo, significando que quanto maior o inóculo maior será a redução do °Brix, dentro da faixa estudada. A interação entre T°C_i teve um efeito negativo, o que indica que quando uma variável for usada no nível inferior a outra deve estar no nível superior para um melhor resultado.

Os parâmetros que obtiveram $p > 0,1$, C_n*C_i e T°C_n, foram retirados da equação. Apesar da variável C_n ter valor de $p > 0,1$, ela foi considerada marginalmente significativa por ser uma das variáveis de entrada e pelo seu valor de p não ter ficado tão distante de 0,1 quanto o das demais variáveis eliminadas do estudo. A variável

concentração de ativador de fermentação apresentou um efeito negativo indicando uma maior resposta com seus valores inferiores.

A tabela 6 apresenta os efeitos e os coeficientes da equação para os termos estatisticamente significativos ($p < 0,1$) ou marginalmente significativos.

Tabela 5: Efeito das variáveis temperatura, concentração de ativador de fermentação e concentração do inóculo sobre a redução do °Brix em 10 dias em fermentados de amora.

Variáveis	Efeito	Erro Padrão	t (4)	p	Coeficiente
T	-13,1661	3,016436	-4,3648	0,012017	-6,58307
C _n	-5,0679	3,016436	-1,6801	0,168235	-2,53396
C _i	6,8966	3,016436	2,28632	0,084197	3,44828
T*C _n	3,5528	3,016436	1,1778	0,304164	1,77638
T*C _i	-6,8966	3,016436	-2,28632	0,084197	-3,44828
C _n *C _i	0,8621	3,016436	0,28579	0,789228	0,43103

Tabela 6: Efeito das variáveis estatisticamente significativas ou marginalmente significativas sobre a redução do °Brix em 10 dias em fermentados de amora.

Variáveis	Efeito	Erro Padrão	t (6)	p	Coeficiente
T	-13,1661	2,87984	-4,57183	0,003803	-6,58307
C _n	-5,0679	2,87984	-1,75979	0,128932	-2,53396
C _i	6,8966	2,87984	2,39477	0,053676	3,44828
T*C _i	-6,8966	2,87984	-2,39477	0,053676	-3,44828

Equação obtida a partir da regressão linear dos dados experimentais:

$$\text{Redução do } ^\circ\text{Brix (\%)} = 53,3 - 6,6 * T - 2,5 * C_n + 3,5 * C_i - 3,5 * T * C_i.$$

Aplicando na equação os resultados da análise estatística, T = -1, C_n = -1, C_i = +1, obteve-se um percentual de redução de °Brix igual a 69,4%. Tal resultado condiz com o analisado durante a fermentação na melhor condição, cuja redução de °Brix foi de 23,2 para 7,2, 69,0%.

Segundo a análise do efeito das variáveis e a equação, conclui-se que a melhor condição de cultivo entre as estudadas, foi a menor temperatura (20°C), a maior C_i (1,0 g/L) e a menor C_n (0,2 g/L).

A validade da equação gerada foi avaliada através do coeficiente de determinação (R^2) que foi de 0,89 e da análise de variância ANOVA onde o F calculado da regressão pelo resíduo (8,87) foi superior ao F tabelado ($F_{4,6; 0,1} = 3,18$).

Na figura 11, encontram-se as superfícies de resposta, mostrando os efeitos das variáveis temperatura e concentração de inóculo sobre o percentual de redução dos °Brix. A variável concentração de ativador de fermentação foi fixada por ser a única marginalmente significativa entre as três estudadas. Pode-se observar que, com a diminuição da temperatura e aumento da concentração de inóculo, há um aumento da redução de °Brix, chegando a um valor máximo de 69,4%. Com a condição inversa, chega-se ao valor mínimo de redução de °Brix, 44,2%. É possível concluir que concentrações de inóculo de 0,7 a 1 g/L e temperaturas de 20 a 22 °C, dentre as condições estudadas, seriam consideravelmente favoráveis.

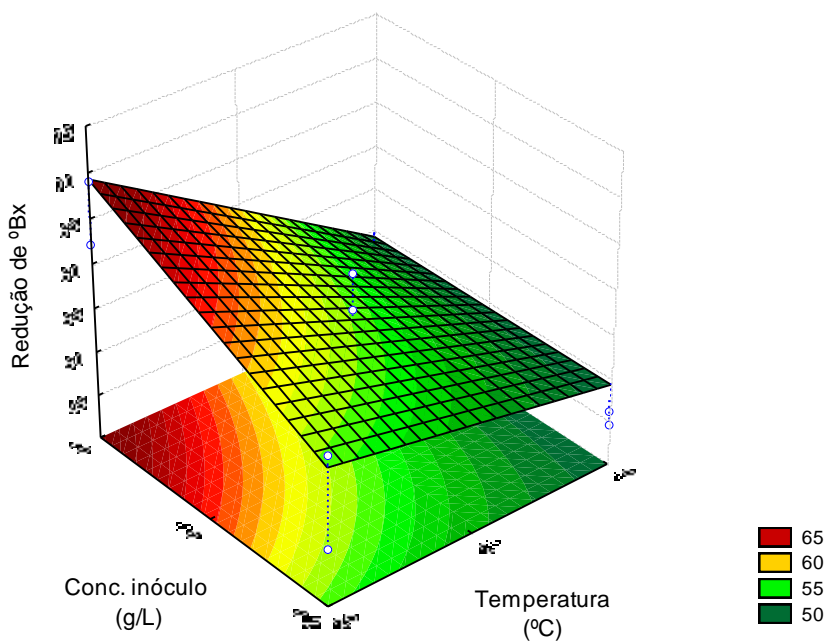


Figura 11: Superfície de resposta para a redução de °Brix em função da concentração de inóculo e da temperatura tendo a concentração de ativador de fermentação no nível -1 (0,2 g/l).

5.4 Fermentações na melhor condição de cultivo

5.4.1 Células viáveis

Após determinada a melhor condição de concentração de inóculo para a redução do grau Brix, a viabilidade deste inóculo foi determinada assim como a quantificação do número de células viáveis. Durante a determinação das células viáveis em câmara de Neubauer, não foi detectada a presença de células inviáveis. Sendo assim, é possível inferir que a desidratação das leveduras foi realizada de maneira satisfatória.

A quantidade determinada de células viáveis foi $1,06 \times 10^{10}$ por mL. Segundo Amerine e Joslyn (1970), a quantidade ideal de leveduras se encontra na faixa de 10^6 até 10^8 células de levedura/mL. Porém, neste estudo foi constatado que a concentração de leveduras teve efeito positivo sobre a redução do teor de sólidos solúveis totais. Segundo os resultados deste trabalho, a concentração de leveduras que obteve o melhor resultado frente ao objetivo final, redução do ° Brix, foi a maior entre as estudadas. Portanto, a que possuía o maior número de células viáveis, considerando que a desidratação foi efetiva nesse sentido.

A alta concentração de células de leveduras viáveis por mL de mosto pode ser considerada adequada por reduzir a possibilidade de aumento da população de contaminantes, visto que o mosto não passou pelo processo de esterilização. Esta alta concentração de leveduras colabora para acelerar o processo fermentativo, gerando maior produção de etanol e possível inibição de outros microrganismos. A competição entre a *Saccharomyces cerevisiae* inoculada e outros microrganismos, poderia causar a diminuição da produtividade do etanol e do rendimento da fermentação alcoólica, além de favorecer a obtenção de compostos indesejáveis na bebida elaborada. A adição de maior concentração de inóculo também influencia na velocidade de crescimento podendo tornar o tempo de cultivo mais curto e aumentar a produtividade.

5.4.2 Quantificação de açúcares redutores totais

Através do método de DNS, foram quantificados os açúcares redutores totais, utilizando uma curva padrão. Na tabela 7 estão apresentados os resultados para os pontos iniciais e finais das fermentações.

Tabela 7: Açúcares redutores totais presentes nos pontos iniciais e finais das fermentações.

Fermentações	ART (g/L)
A1 inicial	253,68
A2 inicial	277,18
A1 final	14,06
A2 final	55,91

A1: Fermentação com chaptalização única

A2: Fermentação com chaptalização em duas etapas

O refratômetro mede os sólidos solúveis presentes na bebida fermentada representados por uma escala de °Brix, que indica a quantidade de açúcares em 100 mL da bebida. Esta escala do refratômetro é constituída para uma solução de água e açúcar.

À medida que ocorre o processo fermentativo, a redução de açúcares provoca uma redução do índice de refração na bebida fermentada enquanto que a produção de etanol provoca um aumento (SCHIEBER). Portanto a presença de álcool torna a medida imprecisa. Após a análise de ART, comprovou-se o que foi dito anteriormente, pois apesar dos valores de 8,0 e 11,1 °Brix ao final das fermentações com chaptalização única e em duas etapas respectivamente, foram quantificadas concentrações baixas de açúcares redutores totais, 14,06 e 55,91 g/L, indicando que quase todo o açúcar foi consumido, restando açúcares infermentescíveis e a medida do refratômetro foi mascarada pela produção de etanol.

5.4.3 Caracterização físico-química

Os resultados obtidos nos experimentos realizados para a elaboração do fermentado de amora com diferentes estratégias de chaptalização, estão apresentados nas tabelas 9 e 10.

Tabela 8: Resultados das análises realizadas durante a elaboração do fermentado de amora com chaptalização única.

Tempo de fermentação (h)	pH	°Brix	Etanol (%v/v)
0	3,08	25,2	NA
24	3,05	25,0	NA
72	2,93	18,5	NA
120	2,97	15,1	9,5
168	3,18	9,8	13,3
216	3,14	9,0	14,5
264	3,18	7,9	15,6
312	3,15	8,0	14,8

NA = Não Analisado

Tabela 9: Resultados das análises realizadas durante a elaboração do fermentado de amora com chaptalização em duas etapas.

Tempo de fermentação (h)	pH	°Brix	Etanol (%v/v)
0	3,08	14,8	NA
24	3,05	24,7	NA
72	2,92	22,5	NA
120	2,92	19,6	5,7
168	3,08	16,9	7,8
216	3,02	14,6	10,0
264	3,07	13,1	10,6
312	3,17	11,1	13,4

NA = Não Analisado

A amora apresentou teor de sólidos solúveis igual a 8,5 °Brix, enquanto que o suco de amora utilizado para a fermentação apresentou teor igual a 4 °Brix. Na tabela 9 são apresentados os resultados referentes ao pH, °Brix e etanol obtidos durante a fermentação alcoólica com uma única chaptalização. Na tabela 10 verificam-se os mesmos parâmetros presentes na tabela 9, porém estes são resultados da fermentação com duas etapas de chaptalização.

A partir dos resultados expostos, é possível observar que as oscilações do pH foram bastante próximas nas duas fermentações, variando de 3,08 para 3,15 na fermentação com uma chaptalização e oscilando de 3,08 para 3,17 na fermentação com duas chaptalizações. Sendo assim, é cabível que não tenha havido excesso de produção de ácidos orgânicos em ambas as fermentações. O pH, apesar de baixo,

encontrou-se em uma faixa aceitável para vinhos e fermentados de frutas. O baixo pH confere ao fermentado maior resistência às contaminações por microrganismos, além de reforçar a estabilidade química do mosto fermentado.

O teor de sólidos solúveis decresceu de 25,2 para 8 °Brix, momento no qual ocorreu a estabilização na fermentação com uma chaptalização. Para a fermentação com duas chaptalizações, o teor de sólidos solúveis foi reduzido de 24,7 °Brix para 11,1 °Brix. Diferentemente da primeira, esta fermentação não foi cessada ao chegar em 11,1 °Brix. O decréscimo do °Brix do meio é consequência da multiplicação microbiana e do consumo do açúcar para produção de etanol pela levedura. A fermentação ocorre satisfatoriamente até o ponto em que os açúcares foram todos consumidos ou quando os açúcares que restarem não forem fermentescíveis. Além dos abordados, é possível que ocorra a estabilização da fermentação por outros motivos, como: as leveduras não conseguirem mais fermentar os açúcares disponíveis por falta de nutrientes e pelo excesso de álcool no meio.

Quanto ao teor de etanol expresso em % de volume à 20°C, é possível constatar que na fermentação com única chaptalização, o etanol final obtido se encontrou fora dos limites expostos pela legislação vigente. Na segunda fermentação, pode-se notar que o valor final de etanol está de acordo com a legislação brasileira de fermentados de frutas. Com estes resultados, é possível constatar que apesar de não estar de acordo com a legislação, o fermentado obtido com única adição de sacarose apresentou melhores resultados de decréscimo de °Brix e produção de etanol. Tal fato mostra que não ocorreu inibição pelo substrato na fermentação com adição única de sacarose no fermentado de amora. Além disso, o fermentado encontra-se com seu teor alcoólico dentro da legislação até 168 horas de fermentação, indicando que este seria um bom ponto para interromper o processo.

Na tabela 11 são apresentados os resultados das análises físico-químicas realizadas nos fermentados de amora deste estudo, comparados com os obtidos a partir de outros fermentados de frutas da literatura.

Verifica-se que os valores de pH de todos os fermentados expostos na tabela 11 são consideravelmente próximos. A faixa de oscilação do pH entre os diferentes fermentados vai de 2,90 até 3,50, desconsiderando o fermentado de melancia que obteve o maior pH, 4,10, devido às correções que foram feitas no mosto por FONTAN, et. al (2001). Os fermentados de amora obtiveram resultados de pH iguais a 3,15 e

3,17, valores muito próximos à 3,20, média obtida entre os fermentados expostos na tabela 11, novamente desconsiderando o de melancia. O fermentado que obteve o pH mais próximo dos fermentados de amora deste trabalho foi o de amora analisado por Johnson e Mejira (2012). Tal fato é bastante positivo, pois Johnson e Mejira (2012) analisaram fermentados de amora comercializados no mercado.

Tabela 10: Comparação entre os fermentados de amora deste estudo e os fermentados de frutas da literatura.

Fermentado	pH	° Brix	Etanol (%v/v)
Amora 1	3,15	8,0	14,8
Amora 2	3,17	11,1	13,4
Amora (JOHNSON e MEJIA, 2012)	3,30	15,6	12,2
Morango (ANDRADE, <i>et al.</i> , 2013)	3,50	8,0	9,6
Mirtilo (VIAN, 2011)	2,90	6,6	9,6
Mandacaru (ALMEIDA, <i>et al.</i> , 2006)	2,90	5,6	10,4
Caju (TORRES NETO, <i>et al.</i> , 2006)	3,50	3,6	11,5
Melancia (FONTAN, <i>et al.</i> , 2001)	4,10	6,0	10,0

Amora 1: Fermentação chaptalização em etapa única

Amora 2: Fermentação com chaptalização em duas etapas

Analisando os valores de °Brix, observou-se que o resultado da amora 1 foi exatamente igual ao do fermentado de mirtilo e ficou próximo ao valor do °Brix obtido para o fermentado de morango, as três frutas são classificadas como pequenos frutos e possuem características semelhantes. O fermentado de amora de Johnson e Mejira (2012), apresentou resultado relativamente próximo ao do fermentado de amora 1 deste estudo, porém não é possível comparar ao certo, pois o fermentado analisado por Johnson e Mejira (2012) é comercial. Sendo assim, a quantidade excessiva de açúcar no mosto e no produto pode ter sido intencional, devido, principalmente, aos aspectos sensoriais. Os fermentados de mandacaru, caju e melancia foram os que obtiveram os menores teores de sólidos solúveis remanescentes entre as bebidas expostas.

Observou-se que todas as bebidas apresentadas na tabela 11, com exceção da amora 1, se encontram dentro dos limites exigidos pela legislação vigente, no que diz respeito à concentração de etanol. Segundo a legislação, a graduação alcoólica de fermentados de fruta deve estar entre 4% v/v e 14% v/v. As bebidas que obtiveram os maiores resultados dentre as apresentadas em relação à concentração

de etanol foram os três fermentados de amora. No panorama geral, os resultados de etanol obtidos para todos os fermentados foram próximos, estando somente os fermentados de morango e de mirtilo com a graduação alcoólica menor que 10,0% v/v à 20°C. Os dois fermentados, inclusive, apresentaram o mesmo teor de etanol, 9,6% v/v.

5.4.4 Cinética

Durante o processo fermentativo foi observado o comportamento cinético das concentrações de sólidos solúveis totais (SST) e etanol (produto). Analisando a figura 12, verificou-se uma redução do teor de sólidos solúveis em função do consumo dos açúcares pelos microrganismos. A redução de sólidos solúveis na fermentação com uma única chaptalização apresentou um comportamento linear e um decaimento rápido até aproximadamente 170 h de fermentação, e após houve uma estabilização, provavelmente pela presença de açúcares infermentescíveis ou pela inibição pelo produto. Enquanto que a fermentação com chaptalização em duas etapas apresentou comportamento linear até o final da fermentação, com um decaimento lento. A adição de sacarose ao mosto após 24 h ocasionou um aumento na concentração de sólidos solúveis.

O mesmo comportamento foi observado na produção de etanol, onde a fermentação com chaptalização única apresentou comportamento linear e aparentemente uma maior velocidade até aproximadamente 170 h de fermentação e após houve uma estabilização da produção de etanol. Enquanto que a fermentação com chaptalização em duas etapas apresentou comportamento linear até o final da fermentação. Ao final de 312 h de fermentação obteve-se uma concentração de etanol de 116,65 g/L para a fermentação com chaptalização única e 105,76 g/L para a fermentação com chaptalização em duas etapas, resultando em fermentados com 14,8 e 13,4 % de etanol em volume respectivamente.

A fermentação com chaptalização em duas etapas foi realizada para verificar uma possível inibição do microrganismo pelo substrato, porém verificou-se que esta prática não foi vantajosa, pois tornou o processo fermentativo mais lento quando comparada a fermentação com chaptalização única.

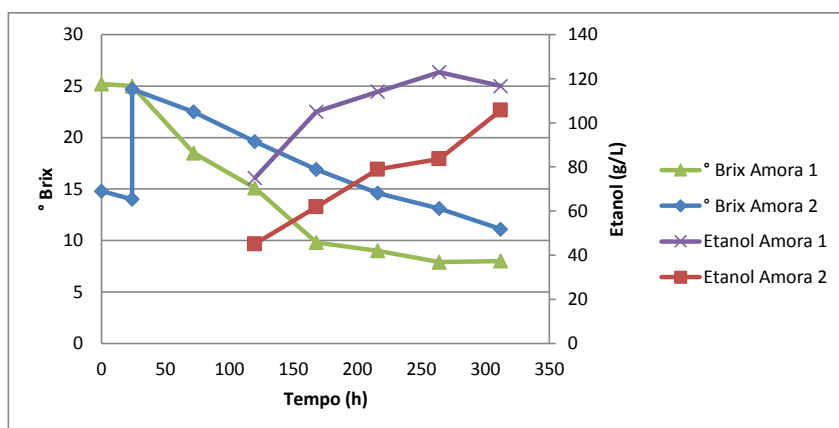


Figura 12: Perfil cinético de etanol e sólidos solúveis durante a fermentação alcoólica.
 Amora 1: Fermentação com chaptalização única
 Amora 2: Fermentação com chaptalização em duas etapas

O desempenho do processo fermentativo foi avaliado através dos valores de rendimento, produtividade da fermentação alcoólica e o parâmetro cinético $Y_{P/S}$ (fator de conversão do substrato em produto) para as fermentações com chaptalização única e em duas etapas. Estes valores são apresentados na tabela 8.

Tabela 11: Parâmetros cinéticos da produção de bebida fermentada de amora.

Parâmetros	Fermentação com chaptalização única	Fermentação com chaptalização em duas etapas
Rendimento (%)	95,26	93,53
Produtividade máxima (g/L.h)	0,63	0,37
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,49	0,48

Analisando os dados obtidos, pode-se constatar que o rendimento na fermentação com chaptalização única (95,26%) foi maior que na fermentação com

chaptalização em duas etapas (93,53%), porém ambos valores foram altos e satisfatórios. Portanto, a levedura utilizada apresentou bom desempenho no processo de fermentação alcoólica.

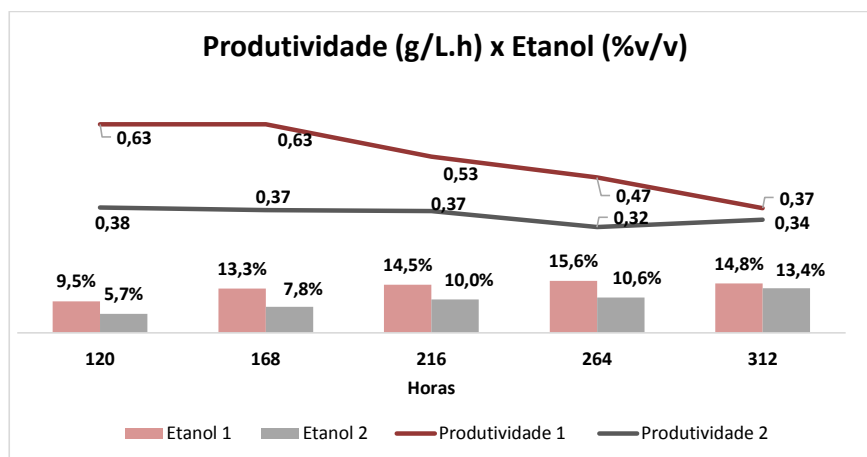


Figura 13: Produtividade e etanol (% v/v) ao longo do processo fermentativo.
 1 – Fermentação com chaptalização única
 2 – Fermentação com chaptalização em duas etapas

A fermentação com chaptalização única obteve produtividade máxima de 0,63 g/L.h após 168 h de fermentação. Esta fermentação poderia ter sido interrompida após 120 h ou 168 h de fermentação, pontos que apresentam produtividades iguais, porém após 120 h de fermentação a bebida apresentou apenas 9,5% v/v de etanol, enquanto que após 168 h de fermentação ela apresentou 13,3% v/v de etanol, valor alcoólico normalmente presente nas bebidas fermentadas.

A fermentação com chaptalização única obteve produtividade máxima 70% maior que a produtividade máxima da fermentação com chaptalização em duas etapas, reforçando os resultados obtidos no comportamento cinético ao avaliar o processo fermentativo conduzido com chaptalização em duas etapas como um processo lento de produção de etanol.

A produtividade na fermentação com chaptalização única (0,63 g/L.h) apresentou valor próximo a produtividade de 0,74 g/L.h encontrada por Bortolini et al. (2001) ao estudar a fermentação alcoólica de kiwi e de 0,78 g/L.h encontrada por Silva (2004) em fermentado de caju.

O rendimento em produto ($Y_{P/S}$) encontrado nas duas fermentações deste trabalho foi bem similar, 0,49 g/g na fermentação com chaptalização única e 0,48 g/g na fermentação com chaptalização em duas etapas. Estes valores se assemelham a valores encontrados na literatura. Na fermentação de mandacaru, Almeida et. al (2006) obteve o valor de $Y_{P/S}$ igual a 0,461 g/g, Andrietta e Stuppiello (1990) obtiveram um $Y_{P/S}$ de 0,455 g/g ao estudarem a fermentação alcoólica de caldo de cana, enquanto que Silva (2004) na fermentação de caju obteve 0,3 de rendimento em produto.

6 Conclusões

A partir dos resultados obtidos, é possível concluir que:

- A amora apresentou alto potencial como matéria-prima para a elaboração de um fermentado de fruta, com baixa contaminação inicial e resultados satisfatórios nas fermentações.
- Para a maior redução de °Brix, as melhores condições entre as estudadas foram: temperatura = 20°C, concentração de ativador de fermentação = 0,2 g/L e concentração de leveduras = 1,0 g/L.
- No que diz respeito aos parâmetros cinéticos, o processo fermentativo com chaptalização única apresentou o melhor desempenho. Concluímos que não houve inibição do microrganismo pelo substrato e o processo de chaptalização em duas etapas foi o mais lento.
- Apesar do etanol final ter ficado fora da legislação, concluímos que o processo fermentativo poderia ter sido interrompido antes ou ter sido adicionado menos sacarose. O pH foi semelhante ao de outros estudos da literatura e o °Brix apresentou bons resultados, porém a sua acuracidade é incerta, devido a influência do etanol.

7 Estudos futuros

- Condução de fermentação malolática, a partir da inoculação de culturas lácticas. A fermentação malolática reduz a acidez total do fermentado, ao mesmo tempo em que garante maior estabilidade biológica e complexidade em seu sabor e aroma.
- Medir a acidez total dos fermentados durante a fermentação e comparar com a variação do pH durante o processo. Analisar os resultados de acordo com a legislação vigente.
- Quantificação dos compostos fenólicos totais dos fermentados. Poderia ser feita a comparação entre o teor de compostos fenólicos totais na amora e no fermentado de amora. Os compostos fenólicos contribuem significativamente para as características organolépticas dos fermentados, além de ajudarem na prevenção de uma série de doenças.
- Analisar o perfil de açúcares no mosto durante a fermentação, através de cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC. Detectar a presença ou ausência de açúcares não fermentescíveis.
- Analisar sensorialmente os fermentados produzidos nas diferentes condições de cultivo. Seria interessante a realização de testes de aceitação avaliando atributos como aparência, cor, acidez, sabor e aceitação global.

Referências Bibliográficas

ALMEIDA, M. M. D. et al. CINÉTICA DA PRODUÇÃO DO FERMENTADO DO FRUTO DO MANDACARU. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, 8, 2006. 35-42.

AMERINE, M. A.; JOSLYN, M. A. **The Technology of Their Production**, vol. 2. Califórnia, Berkeley: University of California Press, 1970.

ANDRADE, M. B.; PERIM, G. A.; SUBTIL, G. W.; IZIDIO, L. L.; dos SANTOS, T. R. T.; MARQUES, R. G. **Caracterização do vinho de morango no processo de fermentação alcoólica**. In: Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar, 8, 2013, Maringá.

Andrietta, S. R.; Stupiello, J. P. Simulação e modelagem para processo de fermentação alcoólica (II) contínua. **Stab Açúcar, Álcool e subprodutos**. Piracicaba, v.9, p. 45-51, set./dez., 1990.

ANTUNES, L. E. C. AMORA-PRETA: NOVA OPÇÃO DE CULTIVO NO BRASIL. **Ciência Rural**, Santa Maria, 32, n. 1, 2002. 151-158.

ANTUNES, L.E.C. **Pequenas frutas: estratégia para o desenvolvimento**. In: Encontro nacional sobre fruticultura de clima temperado, 13., 2013, Friburgo. Anais... Caçador: Epagri, 2013, p. 115-122.

ANTUNES, L.E.C.; HOFFMAN, A. **Pequenas frutas: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. 194 p. (coleção 500 perguntas, 500 respostas).

ARAÚJO, P. G. L. D. et al. β -caroteno, ácido ascórbico e antocianinas totais em polpa de frutos de aceroleira conservada por congelamento durante 12 meses. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 27, 2007. 104-107.

AROZARENA, I. et al. Color, Ellagitannins, Anthocyanins, and Antioxidant Activity of. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2 julho 2012.

ASQUIERI, E. A. et al. Fabricación de vino blanco y tinto de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* Berg) utilizando la pulpa y la cáscara respectivamente. **Alimentaria**, 4, 1997. 97-109.

BORTOLINI, F.; SANT'ANNA, E. S.; TORRES, R. C. COMPORTAMENTO DAS FERMENTAÇÕES ALCOÓLICA E ACÉTICA DE SUCOS DE KIWI (*Actinidia deliciosa*); COMPOSIÇÃO DOS MOSTOS E MÉTODOS DE FERMENTAÇÃO ACÉTICA. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 21, 2001. 236-243.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 6.871, de 04 de junho de 2009. Regulamenta a Lei n. 8.198, de 20 de fevereiro de 2014, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, fev. 2014.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 6.871, de 04 de junho de 2009. Regulamenta a Lei n. 8.918, 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, jun. 2009.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 34, de 29 de novembro de 2012. Estabelece a complementação dos padrões de identidade e qualidade para bebidas fermentadas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, nov. 2012.

Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Lei nº 7.678 de 08 de novembro de 1988. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, nov. 1988.

Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Lei nº 10.970 de 12 de novembro de 2004. Altera dispositivos da Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, nov. 2004.

COELHO, R. C.; NEGREIROS, I. F. L.; da SILVA, M. J. M. **Elaboração de bebida alcoólica fermentada da carambola**. In: ENCIPRO, 5, 2013, Piauí.

CORAZZA, M. L.; Rodrigues, D.G. ; NOZAKI, J. Preparação e consideração do vinho de laranja. **Química Nova**, Maringá, v. 24, n. 4, p. 449-452, 2001.

DIAS, D. R.; PANTOJA, L.; SCHWAN, R. F. Fermentados de frutas. In: FILHO, W. G. V. **Bebidas Alcoólicas**. [S.l.]: Blucher, v. 1, 2010. p. 85-111.

EGLINTON, J. M. et al. The effect of *Saccharomyces bayanus* mediated fermentation on the chemical composition and aroma profile of Chardonnay wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, 2000. 190-196.

FAO. FAOSTAT. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>>. Acesso em: 24 jun. 2014.

FERREIRA, D. S. **Compostos bioativos em amora-preta e encapsulação do seu extrato antocianico por gelificação térmica com curdiana**. Universidade Estadual de Campinas. [S.l.]. 2008.

FONTAN, R. C. I.; VERÍSSIMO, L. A. A.; SILVA, W. S.; BONOMO, R. C. F.; VELOSO, C. M. Cinética da fermentação alcoólica na elaboração de vinho de melancia. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 29, n. 2, p. 203-210, jul./dez. 2011.

GARRUTI, D. dos S. **Composição de voláteis e qualidade de aroma do vinho de caju**. 2001. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Departamento de Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 2001.

GARRUTI, D. dos S.; CASIMIRO, A.R.S. de; ABREU, F.A.P. de. Processo agroindustrial: elaboração de fermentados de caju. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2003. 6 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 82).

GOMES, E. M. S.; LIMA, T. O.; RABELO, T. C. B.; OLIVEIRA, E. G.; SILVA, M. C. S. Produção de fermentado alcoólico a partir da polpa de umbu. **EDUCTE**, *Alagoas*, v.1, n.1, p. 60-65, jul. /dez. 2010.

GRANATO, D.; KATAYAMA, F. C. U.; DE CASTRO, I. A. Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. **Food Chemistry**, 129, 2011. 366-373.

GUERRA, C. C. Vinho tinto. In: VENTURINI FILHO, W.G. **Bebidas Alcoólicas: Ciência e Tecnologia**, vol. 1. São Paulo: Editora Blucher, 2010, p. 209-233.

GUSTAVSSON, J.; CEDERBERG C.; SONESSON, U.; OTTERDIJK R. V.; MEYBECK A. - FAO. **Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention**. In: Save Food! 2011, Düsseldorf, Germany.

HASHIZUME, T. Tecnologia da sidra. In: AQUARONE, E., et al. **Biotecnologia industrial - Biotecnologia na produção de alimentos**. [S.l.]: [s.n.], v. 4, 2008. p. 69-90.

HASHIZUME, T. Tecnologia do vinho. In: AQUARONE, E., et al. **Biotecnologia industrial - Biotecnologia na produção de alimentos**. [S.l.]: Blucher, v. 4, 2008. p. 21-68.

HORST, M. A.; LAJOLO, F. M. Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos. In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 2ª. ed. São Paulo: Manole, v. 1, 2007. p. 697-731.

JOHNSON, M. H.; MEJIA, E. G. D. Comparison of Chemical Composition and Antioxidant Capacity of Commercially Available Blueberry and Blackberry Wines in Illinois. **Journal of Food Science**, 71, n. 1, 2012. C141-C148.

KLARIĆ, D. A.; KLARIĆ, I.; MORNAR, A. Polyphenol content and antioxidant activity of commercial. **Journal of Food and Nutrition Research**, 50, n. 4, 2011. 199-209.

KUSKOSKI, E. M. et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, 25, n. 4, 2005.

LIMA, U. D. A.; BASSO, L. C.; DE AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. D. A., et al. **Biotecnologia industrial - Processos fermentativos e enzimáticos**. [S.l.]: [s.n.], v. 3.

MAEDA, R. N.; ANDRADE, J. S. Aproveitamento do camu-camu (*Myrciaria dúbia*) para produção de bebida alcoólica fermentada. **Acta Amazonica**, Manaus, v.33, n.3, 2003.

MALDONADE, I. R.; CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS**. Embrapa. [S.l.]. 2013.

MARINOVA, D.; RIBAROVA, F. HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. **Journal of Food Composition and Analysis**, 20, 2007. 370-374.

MARTINELLI FILHO, A. 1983. **Tecnologia de vinhos e vinagres de frutas**. Departamento de Tecnologia Rural da ESALQ/USP. Piracicaba, São Paulo, 130 p.

MELLO, L. M. R. de. **Vitivinicultura mundial: principais países e posição do Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2012. 8 p. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 121).

MENDES, J. C.; MARINHO, S. C.; LOPES, N. A.; MOUCHRECK FILHO, J. E.; NASCIMENTO, A. R.; MOUCHRECK FILHO, V. E. Vinho de laranja (*Citrus sinensis*): produção, processamento e controle de qualidade (organoléptico e bromatológico). **Cadernos de Pesquisa**, São Luís, v.12, n.1/2, p. 132-149, jan./dez. 2001.

MILLER, B. J.; FRANZ, C. M. A. P. Expression of the Malolactic Enzyme Gene (mle) from *Lactobacillus plantarum* Under Winemaking Conditions. **Current Microbiology**, 62, 2011. 1682-1688.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, 31, 1959. 426-428.

MORALES, A. O. A.; HENRÍQUEZ, D. R. H. **ELABORACIÓN A NIVEL DE LABORATORIO DE VINO A PARTIR DE FRUTA: MANZANA, NARANJA, PAPAYA, PERA Y SANDÍA**. UNIVERSIDAD CENTROAMERICANA "JOSÉ SIMEÓN CAÑAS". El Salvador. 2006.

MORENO-ALVAREZ, M. J. et al. Estabilidad de antocianinas en jugos pasteurizados de mora (*Rubus glaucus* Benth). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, 52, 2002.

MOTA, R. V. D. CARACTERIZAÇÃO DO SUCO DE AMORA-PRETA ELABORADO EM EXTRATOR CASEIRO. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 26, n. 2, 2006. 303-308.

MOTA, R. V. D. CARACTERIZAÇÃO DO SUCO DE AMORA-PRETA. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 26, n. 2, 2006. 303-308.

MUDNIC, I. et al. Antioxidant and Vasodilatory Effects of Blackberry and Grape Wines. **Journal of Medicinal Food**, 15, n. 3, 2012. 315-321.

MUNIZ, C. R. et al. Q Bebidas fermentadas a partir de frutos tropicais. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v.20, n.2, p. 309-322, jul./dez. 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 3ª. ed. [S.l.]: Artmed, 2002.

OLIVEIRA, A. S.; SANTOS, D. C.; OLIVEIRA, E. N. A.; SILVA, F. L. H.; FLORENTINO, E. R. Produção de fermentado alcoólico do fruto de mandacaru sem espinhos (*Cereus jamacaru*). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.13, n.13, p.271-277, 2011.

OLIVER, J.; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **Journal of Chromatography A**, 881, 2000. 543-555.

PAWLOSKY, R. J.; WARD, G.; SALEM JR., N. Essential fatty acid uptake and metabolism in the developing rodent brain. **Lipids**, 31, n. 1, 1996. S103-S107.

POCOCK, K. F.; SALAZAR, F. N.; WATERS, E. J. The effect of bentonite fining at different stages of white winemaking on protein stability. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, 17, 2011. 280-284.

POLING, E. B. Blackberries. **Journal of Small Fruit & Viticulture**, 4, n. 1-2, 1997. 33-69.

PUIG-DEU, M. et al. Influence of must racking and fining procedures on the composition of white wine. **Vitis**, 35, n. 3, 1996. 141-145.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. STRUCTURE-ANTIOXIDANT ACTIVITY RELATIONSHIPS OF FLAVONOIDS AND PHENOLIC ACIDS. **Free Radical Biology & Medicine**, 20, 1996. 933-956.

ROESE, M. O *Mondovino* de cabeça para baixo: As transformações no mercado internacional do vinho e o novo empresariado agrícola. **Revista de sociologia e política**, Curitiba, v. 16, n 31, p. 71-83, nov., 2008.

SATUÉ-GARCIA, M. T.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E. N. Anthocyanins as Antioxidants on Human Low-Density Lipoprotein and Lecithin-Liposome Systems. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, 45, 1997. 3362-3367.

SCHIEBER, F. **Monitoring Fermentation with a Refractometer**. Moundtop Microvinification. [S.l.].

SELLAPPAN, S.; AKOH, C. C.; KREWER, G. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, n. 8, 2002. 2432-2438.

Seminário brasileiro sobre pequenas frutas, 1., 2003, Vacaria, RS. Anais...Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. 64 p. (Embrapa Uva e Vinho. Documento, 37).

SILVA, J. L. A.; DANTAS, D. L. L.; GASPARETO, O. C. P.; FALCÃO FILHO, R. S.Utilização de abacaxi para elaboração de vinhos: avaliação físico-química e aceitabilidade. **HOLOS**,Rio Grande do Norte,v.3, ano 26.

Silva, M.E. **Estudos cinéticos da fermentação alcoólica da produção de vinho e da fermentação acética de produção de vinagre de vinho de caju**. Campina Grande: UFCG/CCT, 2004. 137p. (Dissertação de Mestrado).

SILVA, P. H. A. et al. Avaliação da composição química de fermentados alcoólicos de jabuticaba. **Química Nova**, São Paulo, v.31, n. 3, 2008.

SOUZA, D. D. Estudo das propriedades físicas de polpas e néctares de pequenos frutos. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2008.

SOUZA, V. R. D. et al. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food Chemistry**, 156, n. 1, 2014. 362-368.

SWANSON, K. M. J, PETRAN, R.L. & HANLIN, J. H. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: DOWNES, F. P. & ITO, K. (eds), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4th ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Chapter 6, p. 53-67.

TOLEDO, O. Z. D.; TEIXEIRA, C. G.; CONAGIN, A. Colagem de vinho branco — Comportamento de vários agentes clarificadores. **Bragantia**, 21, 1962. 571.

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

VIAN, M. L. **Análise físico-química, sensorial e capacidade antioxidante de fermentado de mirtilo**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011/12.

WANG, S. Y. et al. Ellagic Acid Content in Small Fruits, Mayhaws, and Other Plants. **Journal of Small Fruit & Viticulture**, 2, n. 4, 1995. 39-49.

WANG, S. Y.; BOWMAN, L.; DING, M. Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* sp.) and promotes antiproliferation of human cancer cells. **Food Chemistry**, 107, 2008. 1261-1269.

WITT, M. Z. **ELABORAÇÃO DE ESPUMANTES PELO MÉTODO CHAMPENOISE NA VINÍCOLA CAVE DE AMADEU**. CENTRO FEDERAL DE ENSINO TECNOLÓGICO. Bento Gonçalves. 2006.