

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE TRÊS LINHAGENS DE
LEVEDURAS NA PRODUÇÃO DE BEBIDA ALCOÓLICA
FERMENTADA DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum* Schum)**

LIRNA SALVIONI DA SILVA

**MANAUS
2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

LIRNA SALVIONI DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE TRÊS LINHAGENS DE
LEVEDURAS NA PRODUÇÃO DE BEBIDA ALCOÓLICA
FERMENTADA DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum* Schum)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós –
Graduação em Ciência de Alimentos da
Universidade Federal do Amazonas como parte do
requisito para a obtenção do título de Mestre em
Ciência de Alimentos na área de concentração
Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof^ª Dra. Ila Maria de Aguiar Oliveira

**Manaus
2011**

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Silva, Lirna Salvioni da

S586a Avaliação da eficiência de três linhagens de leveduras na produção de bebida alcoólica fermentada de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) / Lirna Salvioni da Silva. - Manaus: UFAM, 2011.

54 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) — Universidade Federal do Amazonas, 2011.

Orientadora: Prof^a. Dra. Ila Maria de Aguiar Oliveira

1. Cupuaçu - Fermentação 2. Leveduras 3. Fermentação alcoólica
2. Bebida alcoólica fermentada I. Oliveira, Ila Maria de Aguiar (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU(2007): 582.685.5:663.123(043.3)

LIRNA SALVIONI DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE TRÊS LINHAGENS DE
LEVEDURAS NA PRODUÇÃO DE BEBIDA ALCOÓLICA
FERMENTADA DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum* Schum)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós –
Graduação em Ciência de Alimentos da
Universidade Federal do Amazonas como parte do
requisito para a obtenção do título de Mestre em
Ciência de Alimentos na área de concentração
Ciência de Alimentos.

Apresentada em 31 de Março de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Angela Libia
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Jamal da Silva Charar
Universidade Federal do Amazonas

*À Deus,
Aos meus pais,
Ao meu noivo,
E a todos da área de Tecnologia em Alimentos.*

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todos os dias me proporcionar a oportunidade de viver e de estar junto das pessoas que amo.

Aos meus pais José Otávio e Albani Salvioni, que sempre mostraram o caminho da educação e da verdade, guiando-me pelos caminhos corretos.

Ao meu noivo, namorado e companheiro Victor Souza, pelo incentivo, pela paciência renovada diariamente e pelo amor, que mesmo nos momentos mais difíceis esteve ao meu lado.

Aos meus irmãos Marcel Salvioni e Andrei Salvioni, pela força e incentivo, pois sempre acreditaram em mim.

À minha amiga Roberta Doce, pela ajuda, pela boa convivência e pela força em momentos difíceis.

À minha orientadora Prof.^a Dra Ila Maria, por ter guiado meus passos no desenvolvimento deste trabalho, através da atenção e confiança.

À Prof.^a Dra. Maria Francisca Simas, pela atenção e pela valiosa colaboração.

À FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas), pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) é o mais popular e favorito fruto da Amazônia, em virtude do sabor e aroma agradáveis. A polpa *in natura* é de cor clara, tipo creme e sabor ácido. É muito utilizada na produção de suco, doce, compota, sorvete e licor. Outra forma de utilização seria na elaboração de bebida alcoólica fermentada, definida como uma bebida de graduação alcoólica de 4 a 14% em volume, produzida pela fermentação de uma fruta madura e sã, por ação de leveduras. O objetivo desse experimento foi avaliar a eficiência de três linhagens de leveduras isoladas da Amazônia, pertencentes à coleção de cultura da Rede Norte e Nordeste, na produção de bebida alcoólica fermentada, utilizando como matéria-prima o cupuaçu e selecionar a linhagem com melhor desempenho na produção da bebida alcoólica fermentada de cupuaçu. Três leveduras do gênero *S. cerevisiae* (DPUA 1172, DPUA 1175 e DPUA 1210) foram testadas em relação à capacidade fermentativa, tolerância ao etanol, capacidade de floculação e produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S). As bebidas foram submetidas às análises de sólidos solúveis (°Brix), pH, acidez total e volátil, dióxido de enxofre, etanol, açúcares residuais e análise sensorial. Das três leveduras, duas (DPUA 1210 e DPUA 1175) apresentaram propriedades enológicas. No final da fermentação, a concentração de etanol obtida nas bebidas produzidas pelas leveduras DPUA 1210 e DPUA 1175 foram de 11,25°GL e 10,33°GL, respectivamente, na qual a DPUA 1210 ($E_f = 83,60\%$) mostrou mais eficiência que a DPUA 1175 ($E_f = 80,55\%$). A partir da linhagem selecionada foram produzidos dois tipos de bebida, uma com concentração de açúcar de 8,45 g/L, caracterizando-se como uma bebida do tipo vinho meio seco e a outra com 21,01 g/L de açúcar, indicando uma bebida do tipo vinho suave. A análise sensorial, realizada com ambas indicou que em todos os atributos as duas bebidas foram bem aceitas, atingindo os conceitos bom e excelente, respectivamente, na avaliação global.

Palavras-chave: fermentação alcoólica, microrganismos, frutas da Amazônia.

ABSTRACT

Cupuassu (*Theobroma grandiflorum* Schum) is the most popular and favorite fruit from Amazon, due to the taste and aroma. The pulp “in natura” is white, like cream and sour taste. It is used to produce juice, jam, ice cream and liqueur. The pulp can be use to prepare fermented alcoholic beverage with alcoholic content from 4 to 14% (v/v), produced by fermentation of ripe and healthy fruit, by action of yeasts. The aim of this study was to evaluate the efficiency of three strains of yeasts isolated from Amazon, belonging to the culture collection of North and Northeast Network, to elaborate fermented alcoholic beverage, using cupuassu as raw material and to select the best strain to produce cupuassu fermented alcoholic beverage. Three *S. cerevisiae* strains (DPUA 1172, 1175 and DPUA 1210) were tested for fermentative capacity, ethanol tolerance, flocculation capacity and production of hydrogen sulfide (H₂S). The beverages were analyzed for soluble solids (° Brix), pH, total and volatile acidity, sulfur dioxide, ethanol, residual sugar and sensorial analysis. Among three yeasts, two (DPUA 1210 and DPUA 1175) showed oenological properties. At the end of fermentation, the ethanol concentration produced by yeast DPUA 1210 and 1175 were 11.25 ° GL and 10.33 ° GL, respectively. The DPUA 1210 yeast ($E_f = 83,60\%$) showed better efficiency than DPUA 1175 ($E_f = 80,55\%$). From the selected strain were made two types of beverages: one with a sugar concentration of 8.45 g / L, which is characterized like a “semi-dry wine” and the other one with 21.01 g / L of sugar, indicating a “soft wine”. The sensorial analysis, made with these two types of beverages indicated that in all attributes, both beverages were well accepted, reaching good or excellent, respectively, in the global evaluation.

Keywords: alcoholic fermentation, microorganisms, fruits of the Amazon.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E GRÁFICOS

Figura 1	Fluxograma de produção das bebidas alcoólicas fermentada de cupuaçu.....	28
Figura 2	Verificação da produção de sulfeto de hidrogênio após crescimento em meio ágar LA. (a) Linhagem DPUA 1210; (b) Linhagem DPUA 1172; (c) Linhagem DPUA 1175; (d) Meio controle.....	34
Gráfico 1	Consumo de açúcares medidos em °Brix, em função do tempo de fermentação do mosto de cupuaçu para a obtenção de bebidas alcoólicas utilizando as leveduras DPUA 1210 e DPUA 1175.....	35
Gráfico 2	Histogramas de frequência dos valores hedônicos atribuídos ao aroma, sabor, cor e aspecto geral das amostras de bebida alcoólica fermentada de cupuaçu do tipo vinho meio seco (Bebida 1) e da bebida alcoólica fermentada de cupuaçu do tipo vinho suave (Bebida 2).....	42
Gráfico 3	Frequência de aprovação, indiferença e rejeição dos atributos aroma, sabor, cor e Aspecto geral das amostras de bebida alcoólica fermentada de cupuaçu do tipo vinho meio seco (Bebida 1) e da bebida alcoólica fermentada de cupuaçu do tipo vinho suave (Bebida 2).....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Rendimento do cupuaçu segundo diversos autores.....	14
Tabela 2	Composição química da polpa do cupuaçu	14
Tabela 3	Bebidas alcoólicas fermentadas obtidas a partir de frutas.....	18
Tabela 4	Bebidas alcoólicas fermentadas obtidas a partir de frutas e a forma de condução de cada uma.....	18
Tabela 5	Critérios de inclusão e exclusão para seleção de provadores para a análise sensorial.....	31
Tabela 6	Capacidade fermentativa em diferentes fontes de carbono, capacidade de floculação e tolerância ao etanol das leveduras DPUA1172, DPUA 1175 e DPUA 1210.....	33
Tabela 7	Composição físico-química das bebidas alcoólica fermentada de cupuaçu produzidas pelas leveduras DPUA 1210 e DPUA 1175.....	35
Tabela 8	Composição físico-química dos mostos de cupuaçu antes da fermentação.....	38
Tabela 9	Composição físico-química dos dois tipos de bebida alcoólica fermentada de cupuaçu utilizando como agente fermentativo a cepa DPUA 1210.....	38
Tabela 10	Valores médios das concentrações de aldeídos, ésteres, alcoóis superiores e metanol nas bebidas fermentadas de cupuaçu.....	39
Tabela 11	Perfil dos provadores.....	40
Tabela 12	Média e desvio padrão das notas de 1-5, conferidos pelos provadores a cada atributo, para as duas amostras de bebida alcoólica fermentada de cupuaçu	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

%	Por cento
±	Mais ou menos
CO₂	Gás carbônico
g	Gramas
g%	Gramas por cento
g/L	Gramas por litro
kg	Quilograma
L	Litro
mg/L	Miligramas por litro
°Brix	Gramas por cento de sólidos totais
°C	Grau Celsius
p/v	Peso por volume
v/v	Volume por volume
mL	Mililitro
pH	Potencial hidrogeniônico
mg	Miligrama
O₂	Gás oxigênio
cels/mL	Células por mililitro
CG-SM	Cromatógrafo a gás acoplado no espectrômetro de massa
SO₂	Dióxido de enxofre
p/p	Peso por peso
°GL	Grau Gay-Lussac
rpm	Rotação por minuto
meq/L	Miliequivalente por litro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Cupuaçu (<i>Theobroma grandiflorum</i>)	13
2.2 Bebida alcoólica fermentada	16
2.3 Fermentação alcoólica	20
2.4 Leveduras	21
2.5 Constituintes secundários do vinho	22
3. OBJETIVOS	25
3.1 Geral	25
3.2 Específicos	25
4. METODOLOGIA	26
4.1 Seleção da linhagem de levedura.....	26
4.2 Obtenção do mosto e da bebida.....	27
4.3 Análises	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	32
5.1 Matéria-prima.....	32
5.2 Seleção das linhagens de levedura.....	32
5.3 Elaboração da bebida alcoólica fermentada de cupuaçu.....	34
5.4 Análise sensorial	40
6. CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
APÊNDICES.....	51

1. INTRODUÇÃO

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) é o mais popular e favorito fruto da Amazônia, está classificado na Família *Malvaceae*, a mesma do cacau (*Theobroma cacao* L.) (VENTURIERI, 1993). A polpa, pelas características de acidez, teor de pectina, aroma ativo e sabor muito agradável, se constitui em importante matéria-prima para a indústria de processamento, com usos como suco, sorvete, doce, geléia, néctar, iogurte, biscoito e outras iguarias. Das sementes pode-se obter um produto semelhante ao chocolate, denominado cupulate (SOUZA *et al*, 1999).

Devido aos diferentes ecossistemas existentes na região Amazônica, há uma diversidade de microrganismos que podem ser utilizados em vários processos biotecnológicos sendo, portanto, fontes potenciais de bioprodutos. Como exemplos, destacam-se pães, vinhos, queijos, molhos de soja, cervejas e outras bebidas alcoólicas fermentadas (COLWELL, 1997). A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, empregada na produção de vinho, pode ser encontrada no solo, em frutas, cana-de-açúcar, e outros vegetais (BARNNETT *et al*, 1990).

Uma das formas de utilização desses recursos naturais é a elaboração de bebida alcoólica fermentada, que segundo Muniz *et al* (2002), proporciona maior período de vida útil e elevado valor agregado.

De acordo com Kolb (2002), a partir dos conhecimentos bioquímicos e microbiológicos é possível a obtenção de bebidas alcoólicas utilizando sucos de frutas. Do suco de uva se obtêm o vinho e do suco de outras frutas se obtêm vinho de frutas, que segundo o Decreto de nº 2.314, de 4 de setembro de 1997, esses tipos de bebidas devem ser rotuladas com a denominação fermentado acompanhada do nome do fruto do qual se originou, como por exemplo fermentado de cupuaçu (BRASIL, 1997).

A bebida alcoólica fermentada é obtida através de um processo bioquímico denominado de fermentação, sendo o processo fermentativo, a etapa mais importante na elaboração dos vinhos, que é conduzida pelas leveduras, podendo intervir inúmeras espécies de leveduras, mas a principal é a *Saccharomyces cerevisiae* (BARRE *et al*, 2003).

O objetivo desse trabalho foi de selecionar uma linhagem de levedura, proveniente da região Amazônica e conhecer o potencial de sua aplicação biotecnológica na produção de bebida alcoólica fermentada de cupuaçu.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*)

O cupuaçu pertence à família *Malvaceae*. Sendo primariamente denominado de *Bubroma grandiflorum*, pelo botânico alemão Carl Ludwig Von Willdenow. Somente em 1886, os estudos taxonômicos efetuados por Karl Moritz Schumann permitiram a inclusão da espécie na taxonomia de *Theobroma*, recebendo, então, a denominação de *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng) Schum. A palavra *Theobroma* significa “manjar dos deuses”, na alusão ao produto chocolate, que tem como matéria prima as sementes de outra espécie do mesmo gênero, o cacau (*Theobroma cacao* L.) (CARVALHO *et al*, 1999).

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum) é uma fruteira de grande importância para a região Amazônica. Esta espécie é encontrada espontaneamente nas áreas de mata do sul e noroeste da Amazônia oriental Brasileira, nordeste do Maranhão e na região Amazônica de países vizinhos (COSTA *et al*, 2003).

A colheita é feita, normalmente, quando os frutos estão maduros e caem naturalmente. A maturação é facilmente reconhecida pelo aroma agradável e forte, característico do cupuaçu. (MMA, 1998). A principal coleta ocorre no período de janeiro a maio (VENTURIERI, 1999).

A polpa comestível (endocarpo) de coloração amarela, sabor ácido e odor forte, envolvem as sementes cujo número é bastante variável. Por essas características é muito apreciado, constituindo-se num produto de exportação sob a forma de suco, doce, compota, sorvete e licor. O cupuaçu, por pertencer ao mesmo gênero *Theobroma* do cacau, suas

sementes, após secagem, possibilitam o preparo de um tipo de chocolate claro, denominado cupulate (SOUZA *et al*, 1999).

Os componentes do fruto variam, consideravelmente, de acordo com seu tamanho, origem, período de coleta e métodos de separação da polpa da semente. Na Tabela 1 está descrita a composição percentual do cupuaçu e, na Tabela 2, a composição química da polpa do cupuaçu.

Componentes	Costa (2006)	Matos <i>et al</i> (2008)
Casca (g%)	44,2	39,2
Polpa (g%)	36,3	37,4
Semente (g%)	19,5	22,6

Tabela 1 – Rendimento do cupuaçu segundo diversos autores

	Umidade (%)	Acidez (%)	pH	Sólidos solúveis totais (°Brix)	Pectina %(p/p)
Chaar (1980)	86,84	2,35	3,6	10,51	0,70
Matos <i>et al</i> (2008)	84,28	3,11	3,02	13,61	-
Viana (2010)	-	2,90	3,21	14	0,85

Tabela 2 – Composição química da polpa do cupuaçu
(-) Não determinado

Alguns estudos foram feitos para identificar os compostos voláteis do cupuaçu, apresentando diversos resultados: butanoato de etila, hexanoato de etila e linalol (QUIJANO; PINO, 2007), 3-metilbutanol, 2-feniletanol, linalol (Z)-2,6-dimetilocta-2, 7-dien-1,6-diol, 1-butanol e 1-hexanol (BOULANGER; CROUZET, 2000).

Na pesquisa de Franco; Shibamoto (2000) foram detectados 21 compostos voláteis nas amostras de headspace do cupuaçu pela cromatografia a gás de alta resolução. A classe química que predominou nas amostras de cupuaçu foram os ésteres. O butanoato de etila e o

hexanoato de etila foram os que apresentaram maior quantidade com 42 e 22%, respectivamente, seguido do ácido hexadecanóico com 12%.

2.1.1 Beneficiamento

O transporte do fruto deve ter o cuidado para não trincá-lo e a armazenagem deve ser feita em local sombreado e arejado. A insolação e o calor alteram a qualidade química e física da polpa (MMA, 1998).

Segundo Ribeiro *et al* (2005) e MMA (1998), os processos de obtenção da polpa consistem em:

- Lavagem dos frutos – Tem por finalidade retirar as impurezas e o excesso do veludo. Utilizam-se jatos de água potável diretamente sobre os frutos ou uso de esteiras condutoras que se deslocam sob chuveiros.
- Quebra dos frutos - É feita manualmente, utilizando materiais de aço inoxidável. No processo de quebra, as sementes devem ser separadas das demais partes do fruto para serem submetidas ao despulpamento.
- Despulpamento – Separa-se a polpa das sementes, podendo ser manual ou mecânica. Sendo o primeiro feito com tesoura doméstica e é o preferido, regionalmente, por deixar grumos de polpa, possibilitando uma maior textura, ao contrário do processo automático que deixa a polpa uniforme e menos densa (VENTURIERI, 1993).
- Envasamento - Poderá ser feito por envasadores manuais, semi-automáticas ou automáticas.
- Tratamento térmico – Pasteuriza-se a polpa em banho-maria a 100°C, por 15 min.
- Congelamento – Pode ser por congelamento instantâneo com auxílio de nitrogênio líquido, ou lento utilizando "freezer" ou câmara fria (-15 a - 24 graus centígrados).

2.2 Bebida alcoólica fermentada

As bebidas alcoólicas são produzidas a partir de várias matérias-primas, especialmente a partir de cereais, frutas e produtos açucarados (WARD, 1991). De acordo com o Decreto de nº 2.314, de 4 de setembro de 1997, as bebidas alcoólicas fermentadas são cerveja, fermentado de fruta, sidra, hidromel e fermentado de cana. Esse decreto define que o fermentado de fruta é uma 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. (BRASIL, 1997).

A bebida fermentada de fruta é freqüentemente denominada de vinho, entretanto a legislação estabelece a denominação de vinho somente para bebidas alcoólicas fermentadas da uva (*Vitis vinífera*) (BRASIL, 1988a). Vinhos que não são provenientes da uva devem, obrigatoriamente, ser rotulados com a denominação fermentado acompanhada do nome do fruto do qual se originou, como exemplos: fermentado de abacaxi, fermentado de laranja, fermentado de caju, fermentado de figo-da-índia, entre outros (LOPES; SILVA, 2006).

Para o processamento das bebidas alcoólicas fermentadas utiliza-se como referencial o protocolo de fabricação do vinho tinto de uva (CHIARELLI *et al*, 2005). De modo geral, as etapas de elaboração da bebida são as seguintes:

- **Preparo do mosto:** Mosto é o suco ou caldo de fruta (HASHIZUME, 1991). Nesse processo adiciona-se sacarose, a fim de atingir a graduação alcoólica desejada – etapa denominada de chaptalização (LOPES; SILVA, 2006) e o metabissulfito de potássio ($K_2S_2O_5$) – a sulfitação. Para se efetuar a adição de açúcar, torna-se necessário determinar o teor de açúcar no mosto, sendo que para cada dois graus Brix será obtido 1°GL ou 1% de álcool no vinho após a fermentação. A adição de anidrido sulfuroso (SO_2) sob a forma de metabissulfito de potássio ($K_2S_2O_5$) é para assegurar a assepsia, inibindo o crescimento de bactérias e

leveduras indesejáveis que acompanham as frutas, sem afetar a atividade fermentativa da levedura envolvida no processo de produção da bebida (HASHIZUME, 1991; ARRUDA *et al*, 2003; DIAS *et al*, 2003).

- **Inoculação:** Adiciona-se a levedura ao mosto. A fermentação pode ser natural, com leveduras selvagens que vêm na matéria-prima (fruta) (DUARTE *et al*, 2009), ou oriundas do meio ambiente. Além disso, pode ser utilizado o fermento prensado, também chamado de fermento biológico comercial (panificação), empregando 0,1 g/L (SANTOS *et al*, 2005) a 10 g/L (ANDRADE *et al*, 2003), devendo ser diluído antes de inoculá-lo no mosto. Existe, também, o uso de leveduras selecionadas, que estão estocadas em tubo de ensaio contendo meio de cultura sólido. De acordo com Kolb; Schurig (2002), antes de empregar um cultivo selecionado, é imprescindível que seja multiplicado em meio líquido.

- **Fermentação alcoólica:** Após a adição da levedura, este microorganismo transforma o açúcar em álcool, gás carbônico e outros produtos secundários (HASHIZUME, 2001).

- **Trasfega** – Após o término da fermentação, efetua-se a trasfega que consiste na separação de depósitos formados por partes da polpa e leveduras, os quais devem ser separados, pois a sua decomposição comprometerá a qualidade da bebida. A trasfega pode ser feita sifonando-se a bebida por meio de tubo de borracha ou plástico, tomando o cuidado de não succionar o decantado (HASHIZUME, 2001).

- **Clarificação, filtração e engarrafamento:** Na clarificação, acrescenta-se a bentonita para remover substâncias protéicas, como células de leveduras (ARRUDA *et al*, 2003). A filtração pode ser feita por placa de celulose sob vácuo (DIAS *et al*, 2003), em algodão (ARRUDA *et al*, 2003), filtro de celulose (DUARTE *et al*, 2009), papel de filtro qualitativo (CHIARELLI *et al*, 2005). Antes de engarrafar, acrescenta-se na garrafa um agente conservante, o dióxido de enxofre (SO₂) a fim de proteger o vinho contra algum contaminante contido no vasilhame. O uso de garrafas de vidro é o mais aplicado (VARNAM; SUTHERLAND, 1994).

As uvas são as mais utilizadas na produção deste tipo de bebida, mas quase todas as espécies de frutas podem produzir vinhos de frutas, sendo a sidra e o vinho de maçã os mais consumidos (KOLB, 2002). Vários estudos foram feitos a fim de utilizar outros tipos de frutas. Nas tabelas 3 e 4 estão citadas publicações referentes à elaboração de bebidas alcoólicas fermentadas a partir de frutas.

Bebida alcoólica fermentada	Autores
Laranja (<i>Citrus</i> sp.)	CORAZZA <i>et al</i> (2001)
Ata (<i>Annona squamosa</i> L)	MUNIZ <i>et al</i> (2002)
Camu-camu (<i>Myrciaria dubia</i>)	MAEDA; ANDRADE (2003)
Pupunha (<i>Bactris gasipaes</i> Kunth)	ANDRADE <i>et al</i> (2003)
Banana prata (<i>Musa</i> sp.)	ARRUDA <i>et al</i> (2003)
Cajá (<i>Spondias mombin</i> L.)	DIAS <i>et al</i> (2003)
Acerola (<i>Malpighia Punicifolia</i> L.)	SANTOS <i>et al</i> (2005)
Caju (<i>Anacardium occidentale</i> L.)	MOHANTY <i>et al</i> (2005)
Jabuticaba (<i>Myrciaria cauliflora</i> Berg)	CHIARELLI <i>et al</i> (2005)
Manga (<i>Mangifera indica</i> L)	REDDY; REDDY (2005)
Cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.)	DIAS <i>et al</i> (2007)
Jamun (<i>Syzygium cumini</i> L.)	CHOWDHURY; RAY (2007)
Figo-da-india (<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill)	LOPES; SILVA (2006)
Abacaxi (<i>Ananas comosus</i> L.)	ARAÚJO <i>et al</i> (2009)
Gabiroba (<i>Campomanesia pubescens</i>)	DUARTE <i>et al</i> (2009)
Lichia (<i>Litchi chinensis</i> Sonn)	ALVES <i>et al</i> (2009)

Tabela 3 – Bebidas alcoólicas fermentadas obtidas a partir de frutas

Bebida alcoólica fermentada	Forma de condução	Autores
Camu-camu (<i>Myrciaria dubia</i>)	Foi utilizado o fermento seco da marca Fleischmann na concentração de 0,1% (p/v de mosto). A fermentação foi conduzida por 25 dias a 25°C em garrafas de vidro. Depois foi acondicionada em garrafas de vidro e filtrada em papel de filtro nº 16 sob vácuo.	Maeda; Andrade (2003)

Pupunha (<i>Bactris gasipaes</i> Kunth)	A levedura <i>S. cerevisiae</i> (seca ativa) na concentração de 1%. O processo fermentativo foi conduzido por sete dias em temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$. A filtração foi realizada em algodão e a bebida acondicionada em garrafa de vidro de capacidade de 1 L.	Andrade <i>et al</i> (2003)
Banana prata (<i>Musa</i> sp.)	A levedura em base seca foi inoculada na concentração de 0,02% (p/v de mosto). A fermentação foi conduzida a 16°C e a 30°C por 18 dias. Depois da fermentação utilizou-se a bentonita para clarificar a bebida e depois filtrou-se em algodão	Arruda <i>et al</i> (2003)
Cajá (<i>Spondias mombin</i> L.)	Utilizou-se uma levedura selvagem de <i>S. cerevisiae</i> na concentração de 10^7 células/mL. A fermentação foi conduzida em vasilhame de aço inox a 22°C . A filtração foi feita em filtro de celulose, depois com terra de diatomácea com filtro de celulose e armazenada em garrações de vidro a 12°C .	Dias <i>et al</i> (2003)
Acerola (<i>Malpighia Punicifolia</i> L.)	O mosto foi inoculado com levedura seca na proporção de 0,01 % (p/v), sendo a fermentação conduzida em Erlenmeyers de 6 L sob temperatura de 27 a 31°C , por um período de 10 dias. O fermentado foi trasfegado, filtrado e armazenado em garrafa escura a 5°C .	Santos <i>et al</i> (2005)
Caju (<i>Anacardium occidentale</i> L.)	A levedura <i>S. cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i> foi inoculado no mosto na concentração de 2 % (v/v). A fermentação ocorreu a $32 \pm 2^\circ\text{C}$ por 6 dias.	Mohanty <i>et al</i> (2005)
Jaboticaba (<i>Myrciaria cauliflora</i> Berg)	Empregou-se 0,15 % (p/p) de levedura de panificação na forma prensada. A fermentação foi realizada em garrafas de plástico de 20 L. Após a trasfega, o fermentado foi filtrado em papel de filtro qualitativo e engarrafado em garrafas de 1 L.	Chiarelli <i>et al</i> (2005)
Manga (<i>Mangifera indica</i> L.)	A fermentação foi conduzida por leveduras utilizadas para vinho na concentração de 10^6 céls/mL por 20 dias nas temperaturas 20, 25 e 35°C .	Reddy; Reddy (2005)
Abacaxi (<i>Ananas comosus</i> L.)	A linhagem utilizada foi a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> codificada com o número 79-B. O mosto recebeu cerca 3%(v/v) de inóculo. A fermentação foi mantida entre $18-20^\circ\text{C}$ por 8 dias. Após os vinhos foram trasfegados e receberam a adição de 300 mg/L de bentonita. A bebida foi acondicionada em garrafas de vidro âmbar.	Araújo <i>et al</i> (2009)
Lichia (<i>Litchi chinensis</i> Sonn)	Foram utilizadas leveduras selvagens de <i>S. cerevisiae</i> na concentração de 10^8 céls/mL. Depois da fermentação fez-se a clarificação usando a betonita e depois se filtrou em filtro de celulose.	Alves <i>et al</i> (2009)

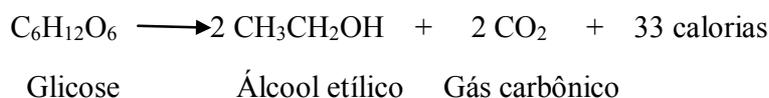
Tabela 4 - Bebidas alcoólicas fermentadas obtidas a partir de frutas e a forma de condução de cada uma.

2.3 Fermentação alcoólica

Das etapas que constituem a fabricação da bebida alcoólica fermentada, o processo fermentativo torna-se a etapa de maior importância. Segundo Kolb (2002), a fermentação alcoólica é a decomposição enzimática de monossacarídeos, conduzida por leveduras, sendo a principal a *Saccharomyces* e controlada por 12 enzimas e coenzimas diferentes.

O objetivo da fermentação é produzir energia que será empregada na realização das atividades fisiológicas da levedura e, ainda, para o seu crescimento e reprodução, sendo, o etanol um subproduto desse processo (LIMA *et al*, 2001; BARRE *et al*, 2003).

Os principais compostos são produzidos em proporções equimolares, conforme a equação de Gay-Lussac (HASHIZUME, 2001).



De um ponto de vista matemático, a partir de 100 g de açúcar se deveria obter 51,1 g de etanol e 48,9 g de dióxido de carbono, mas depois de muitas análises, Pasteur comprovou em 1860 que somente se obtinham 48,8 g de etanol, 44,6 g de dióxido de carbono, e, além disso, 3,3 g de glicerina, 0,6 g ácido pirúvico e 1,2 g de outros produtos. Essa diferença ocorre pelo fato de que as leveduras utilizam, para a elaboração das substâncias próprias das células, os produtos nitrogenados e os hidratos de carbono. Além disso, dependendo da temperatura de fermentação, deve-se contar com a perda do álcool por evaporação. Ainda assim, uma pequena proporção de etanol obtido se utiliza para formar ésteres (KOLB; SCHURING, 2002).

2.4 Leveduras

Em 1863, Louis Pasteur revelou pela primeira vez a atividade microbiana durante a fermentação do vinho. Ele provou conclusivamente que a levedura é o catalisador primário na fermentação do vinho. Com o conhecimento de que a levedura era responsável pela biotransformação dos açúcares da uva (principalmente glicose e frutose) em álcool e dióxido de carbono, os produtores de vinho puderam controlar o processo (PRETORIUS, 2000).

A maioria das fermentações de bebidas alcoólicas é conduzida pelas espécies da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (BERRY; SLAUGHTER, 2003). No início da fermentação, a *Saccharomyces* não é importante numericamente, sendo que as leveduras dominantes nesta etapa são: *Aureobasidium pullulans*, *Candida stellata*, *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia orientalis*, *Kloeckera javanica*, *Metschnikowia pulcherrima* e *Pichia anomala*. Durante a fermentação, a *S. cerevisiae* se converte na levedura predominante e a crescente concentração do etanol vai inibindo muitas leveduras de forma natural (VARNAM; SUTHERLAND, 1994).

A contribuição das leveduras para a composição química do vinho é feita por vários mecanismos: a) utilizando os constituintes do suco de uva, b) produzindo etanol e outros solventes que ajudam a extrair os componentes do sabor e aroma da uva, c) produzindo enzimas que transformam os compostos neutros da uva em compostos de sabor e aroma ativos, d) produzindo centenas de metabólitos secundários (ácidos, alcoóis, ésteres, polifenóis, aldeídos, cetonas, compostos sulfurosos voláteis) e degradação autolítica das células de leveduras mortas (FLEET, 2003).

O principal papel da levedura na fabricação do vinho é catalisar, com eficiência, a conversão do açúcar em álcool sem o desenvolvimento de odores desagradáveis. As leveduras devem possuir as seguintes propriedades: tolerância ao etanol, baixa formação de sulfito,

propriedades de floculação, resistências a toxinas e alta produção de glicerol (PRETORIUS, 2000).

Propriedades tecnológicas importantes, segundo Varnam; Sutherland (1994):

- Tolerância ao etanol – é indispensável que apresentem uma alta tolerância ao etanol para assegurar que a fermentação continue até o final da produção do etanol (VARNAM; SUTHERLAND, 1994). Em recentes pesquisas com espécies de *Candida*, foi demonstrado que ela deve ter tolerância ao etanol similar ao *S. cerevisiae* (FLEET, 2003).
- Floculação – Esta propriedade é necessária para conseguir uma fácil separação das leveduras do meio ao final da fermentação e para evitar o aparecimento de sabores estranhos, devido a um excessivo período de incubação (VARNAM; SUTHERLAND, 1994).
- Resistência às toxinas – Algumas cepas de *Saccharomyces* produzem uma série de toxinas extracelulares, as zimocinas, que são letais para as outras cepas sensíveis (VARNAM; SUTHERLAND, 1994).

2.5 Constituintes secundários do vinho

Durante a fermentação a maior parte do açúcar é convertida em etanol e é normal que uma pequena porcentagem seja convertido em outros subprodutos. Eles incluem glicerol, ácidos orgânicos e os compostos aromáticos. Os mais abundantes são os alcoóis superiores, cuja produção é próxima ao etanol. Os compostos carbonílicos como aldeídos e cetonas estão presentes em pequenas concentrações, mas aparecem entre os componentes responsáveis pela qualidade sensorial do produto (BERRY; SLAUGHTER, 2003).

2.5.1 Alcoóis

Além do álcool etílico, outros alcoóis são importantes para o flavor do vinho como glicerol, metanol e os alcoóis superiores. O glicerol contém um sabor adocicado e contribui para a maciez do vinho. O metanol provém da hidrólise da pectina (HASHIZUME, 2001).

Segundo Ward (1991), os alcoóis superiores são os componentes mais importantes presentes nas bebidas alcoólicas. Esta classe é formada, quantitativamente, pelos 2-e 3-metilbutanol, propanol, 2-metilpropanol, butanol, pentanol, 2-feniletanol, 3-metil-propanol, tirosol e o triptofol. O seu teor médio total no vinho é da ordem de 400 a 500 mg/L, o que corresponde a uma concentração ótima para o aroma, teores maiores que 1g/L prejudicam o aroma (BAYONOVE *et al*, 2003). A produção dos alcoóis superiores, também denominados de alcoóis fúsel, é obtida a partir dos aminoácidos, que sofreram transaminação ou desaminação e os ácidos resultantes são descarboxilados a aldeídos, os quais serão finalmente reduzidos a alcoóis fúsel (MATEOS *et al*, 2006).

2.5.2 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos estão presentes nas frutas em concentrações relacionadas a inúmeros fatores, incluindo amadurecimento, genótipo, estação do ano, clima e variações agronômicas (PATERSON *et al*, 2003).

Segundo Montedoro; Bertuccioli (1986) apud Santos (2006), poucos ácidos orgânicos encontrados nos vinhos são suficientemente voláteis para contribuir para o seu odor. Os ácidos tartárico e málico contribuem para o gosto ácido e dentre os ácidos alifáticos, apenas o acético (odor de vinagre), propiônico (odor de caprino) e butanóico (odor de manteiga) contribuem efetivamente para o odor do vinho.

2.5.3 Aldeídos

O acetaldeído é o principal aldeído presente no vinho, do ponto de vista quantitativo. Altas concentrações de acetaldeído resultam em um aroma herbáceo indesejável ao vinho. Nos vinhos brancos, em especial, a presença do acetaldeído influencia na formação do aroma “amadeirado” ou de “ranço” (AZEVEDO *et al*, 2007).

2.5.4 Ésteres

Ward (1991) menciona que os ésteres, em vinhos, constituem um grupo importante de compostos voláteis, devido à formação de um penetrante aroma frutado e floral. Esse grupo é formado durante a fermentação, a partir da reação de alcoóis e ácidos. Dentre os ésteres o acetato de etila é normalmente o mais abundante encontrado nos vinhos (VARNAM; SUTHERLAND, 1994).

2.5.5 Metanol

De acordo com a Portaria 229 de 25/10/1988 do Ministério da Agricultura, o máximo permitido é de 350 mg/L, pois o metanol em concentrações elevadas pode causar intoxicações e até levar à morte (NAGATO *et al* 2001). O conteúdo de metanol, nos produtos fermentados, é resultante da decomposição enzimática das pectinas presente nos frutos (KOLB; SCHURIG, 2002).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a eficiência das leveduras isoladas na Amazônia e pertencentes à Rede Norte e Nordeste de Coleção de Culturas – RENNEBRA, na produção de bebida alcoólica de cupuaçu.

3.2 Específicos

3.2.1 Produzir bebida alcoólica fermentada de cupuaçu utilizando cepas de levedura oriundas da região Amazônica.

3.2.2 Avaliar a aceitabilidade da bebida, produzida pela cepa escolhida, por meio de um painel de provadores não treinados.

3.2.3 Determinar as propriedades físico-químicas e os compostos secundários presentes nas bebidas.

4. METODOLOGIA

4.1 Seleção da linhagem de levedura

Três leveduras do gênero *S. cerevisiae* isoladas da castanha do Brasil, pertencentes ao acervo da Micoteca da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, que são codificadas como DPUA 1210, DPUA 1172 e DPUA 1175, foram testadas em relação à capacidade fermentativa, tolerância ao etanol, capacidade de floculação e produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) segundo Guimarães (2005). Esses procedimentos foram executados em triplicata.

4.1.1 Teste de capacidade fermentativa

As leveduras foram inoculadas em tubos, contendo em seu interior tubos de Durhan e 10 ml de meio líquido YP (extrato de levedura e peptona) acrescentado da fonte de carbono a ser testada [glicose 2 g% (p/v), sacarose 2 g% (p/v), maltose 2 g% (p/v), frutose 2 g% (p/v), e lactose 2g% (p/v)]. Foram colocadas em estufa a 30 °C durante 48 horas e observados o crescimento das leveduras, pela turvação dos meios, e a formação de gás.

4.1.2 Teste de tolerância ao etanol

As leveduras foram inoculadas em tubos contendo 10 ml de meio líquido YP (extrato de levedura e peptona) adicionado de glicose (2% p/v) e de etanol nas concentrações variáveis de 5% (v/v), 10% (v/v) e 15% (v/v), seguida de incubação a 30 °C durante 48 horas.

4.1.3 Teste de floculação

As células de cada cepa foram inoculadas em tubos contendo 10 ml de meio líquido YP (extrato de levedura e peptona) com glicose (2% p/v) e incubadas a 30 °C durante 48 horas. Após este período, foram levadas à agitação em agitado de tubos para visualização da formação de flocos.

4.1.4 Teste de produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S)

As cepas foram inoculadas no meio Agar LA (Agar Luria) e incubadas a 30°C durante 10 dias, observando-se o aparecimento ou não de colônias negras, características de produção do sulfeto de hidrogênio.

4.2 Obtenção do mosto e da bebida

4.2.1 Mosto de cupuaçu

O cupuaçu utilizado foi disponibilizado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) de Manaus localizada na rodovia AM-10, Km 29, Amazonas. Os frutos depois de serem selecionados, lavados, sanitizados e despulpados foram diluídos na proporção de 1:1 (p/v), triturados e homogeneizados no liquidificador e depois centrifugados a 5 °C, a 3.500 rpm por 20 minutos. O sobrenadante recuperado foi mantido em freezer a -14°C. Para cada 100 g de polpa diluída, obteve-se, em média, após centrifugação, 60 mL de suco (sobrenadante).

Ao suco (sobrenadante) obtido foi adicionada água até resultar em um suco com 5,0° Brix. Além disso, acrescentou-se a sacarose comercial até a concentração de 22°Brix e, depois, acrescentou-se 100 ppm de metabissulfito de potássio. Após a adição desse sanitizante, deixou-se em repouso durante 3 horas, a 25°C.

4.2.2 Fluxograma do Processo de Produção da bebida alcoólica fermentada de cupuaçu

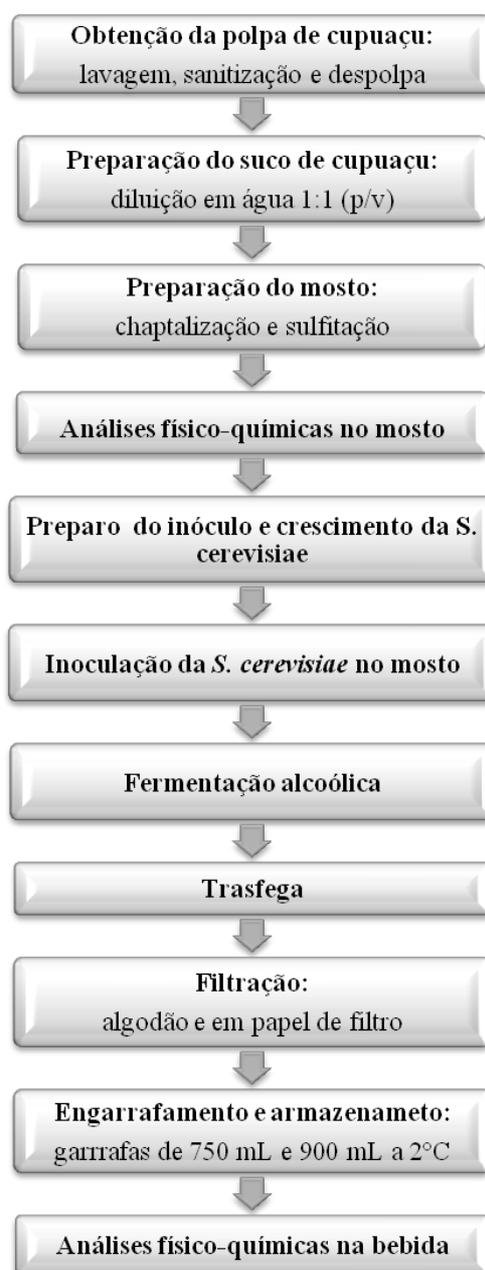


Figura 1 Fluxograma de produção das bebidas alcoólicas fermentada de cupuaçu.

4.2.3 Fermentação

Antes da fermentação alcoólica, as leveduras passaram por um processo de multiplicação celular, como descrito a seguir:

Primeiro, a *S. cerevisiae* foi incubada a 30°C, por 48 horas, em tubo de ensaio contendo ágar Sabouraud. Em seguida, 10 mL de suco de cupuaçu diluído a 3°Brix foi adicionado ao tubo de ensaio. Nesta etapa foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer para determinação da concentração celular. Na seqüência, essa suspensão celular foi transferida para um frasco de Erlenmeyer de 250 mL contendo, apenas, 40 mL de suco a 3° Brix. Colocou-se em estufa a 30°C durante 24 horas com agitações ocasionais;

Decorrido o período de 24 horas, este suco contendo *S. cerevisiae* foi transferido para outro frasco de Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de suco a 5°Brix, totalizando 250 mL de suspensão celular. O crescimento foi conduzido em estufa a 30°C durante 24 horas, com agitações ocasionais;

Após 48 horas de crescimento celular, a suspensão microbiana da etapa anterior foi adicionada em outro frasco de Erlenmeyer de 1000 mL, já contendo 250 mL de suco a 7°Brix, totalizando um volume igual a 500 mL, sendo então submetida a crescimento durante 24 horas, em estufa a 30°C, com agitações ocasionais.

O inóculo contendo *S. cerevisiae*, em plena fermentação, obtido das fases anteriores e com 72 horas de crescimento celular, foi inoculado em 1500 mL de mosto chaptalizado com sacarose e sulfitado (metabissulfito de potássio). Realizou-se, também, uma nova determinação da concentração de células. O processo fermentativo foi executado em Erlenmeyer de 2 L. A temperatura de fermentação foi de aproximadamente 24°C.

No final da fermentação, as bebidas receberam a primeira trasfega, transferindo-as para garrafas de vidro com capacidade média de 750 mL e 900 mL. Depois dessa trasfega, as

garrafas foram colocadas em banho de gelo por 10 min., a fim de interromper a fermentação. Foram realizadas as trasfegas a cada dois dias até o desaparecimento de sólidos depositados no fundo da garrafa. Enquanto isso, a bebida era mantida sob refrigeração em B.O.D. a 2°C.

Ao concluir as trasfegas, efetuou-se a filtração em algodão a cada 4 dias até que completasse 60 dias após o término da fermentação. Em seguida, procedeu-se a filtração em papel de filtro de poro largo sob vácuo. Os materiais usados na trasfega e na filtração foram deixados em solução ácida de metabissulfito de potássio por no mínimo 24 horas.

4.3 Análises

As análises microbiológicas foram realizadas na polpa e no sobrenadante, observando-se o desenvolvimento de Coliformes 45°C/g e ausência e presença de *Salmonella* sp/25g, conforme Silva (2007).

Sólidos solúveis totais foram medidos com um refratômetro portátil; açúcares totais e redutores efetuados pelo método de Somogyi & Nelson, segundo Amorim (1996) e UFPR (2001); acidez total e volátil e enxofre total foram avaliados de acordo com Brasil (2005); pH foi determinado com potenciômetro digital, conforme metodologia do IAL (2005). O teor de etanol foi determinado com a destilação prévia de 50 mL da amostra no microdestilador de álcool modelo – TE012 da Tecnal. Com o destilado obtido foi realizada a leitura do grau alcoólico em densímetro de Anton-Paar DMA – 4500.

As determinações de aldeídos totais, ésteres totais, alcoóis superiores totais e metanol foram realizadas de acordo com a Instrução Normativa nº 24, de 08 de setembro de 2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2005).

4.3.1 Análise sensorial

Para a realização da análise sensorial, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética da Universidade Federal do Amazonas (Apêndice A).

A bebida foi avaliada por 50 provadores, homens e mulheres de 19-59 anos, funcionários, docentes e estudantes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UFAM. Os provadores foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, segundo Teixeira (1987) e Alves (2009), descritos na Tabela 5. As amostras, refrigeradas em B.OD. a 2°C foram servidas, aleatoriamente, em tacinhas transparentes, com capacidade de 50 mL, contendo cerca de 15 mL da bebida fermentada de cupuaçu, acompanhadas de água e um bolacha cream cracker para limpar o paladar entre cada prova das amostras. As tacinhas foram marcadas, aleatoriamente, com números de 3 dígitos. Os atributos sensoriais: sabor, aroma, cor e aspecto geral foram avaliados usando uma escala hedônica de 5 pontos (MINIM, 2006).

Critérios de inclusão	Critérios de exclusão
Faixa etária entre 19 a 59 anos; De ambos os sexos; Apreciadores de bebida alcoólica.	Pessoas fumantes; Diabéticos; Gestantes; Com resfriados.

Tabela 5 - Critérios de inclusão e exclusão para seleção de provadores para a análise sensorial.

Aos provadores foram entregues uma ficha de avaliação sensorial (Apêndice B) do teste de aceitação de ambas as bebidas alcoólicas fermentadas e duas cópias do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Apêndice C), sendo uma cópia para o provador e a outra para a equipe do projeto. A análise sensorial foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Alimentos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM.

Para a análise dos dados foi utilizada a análise estatística descritiva através da média, percentual e frequência dos valores.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 matéria-prima

A polpa do cupuaçu foi processada conforme o item 4.2.1. Em seguida, realizaram-se as análises microbiológicas na polpa e no sobrenadante recuperado da centrifugação.

Nas amostras a contagem de coliformes a 45°C foi menor que 10 NMP/g e ausência de *Salmonella* sp/25g, indicando que a polpa de cupuaçu estava de acordo com os padrões exigidos pela Resolução RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001, que aprova regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos

5.2 Seleção das linhagens de levedura

As três cepas de leveduras foram testadas em relação a quatro características enológicas importantes na fabricação de vinho: capacidade em fermentar frutose, glicose, maltose, sacarose e lactose; capacidade floculativa, tolerância ao etanol e produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S). Os resultados destes testes estão na Tabela 6.

A capacidade fermentativa foi testada em diferentes fontes de carbono. Observou-se que todas as três leveduras mostraram a mesma habilidade para fermentar carboidratos, só não a lactose. A não fermentação da lactose é uma característica das *Saccharomyces cerevisiae*, segundo os estudos de Sanni; Lonner (1993) e Guimarães (2005). Além disso, as leveduras que fermentam maltose não podem fermentar lactose e vice-versa (KOLB; SCHURIG, 2002).

Também foi observado o comportamento floculante em todas as cepas. Segundo Pretorius (2000), as leveduras floculantes são geralmente aproveitadas na produção de cerveja

tipo lager e vinho. Os flocos que se depositam no fundo do fermentador podem ser facilmente removidos, permitindo uma rápida e eficiente clarificação e reduzida manipulação do vinho.

Vários parâmetros fisiológicos são essenciais para que o gênero *Saccharomyces* domine a fermentação, mas a tolerância a alta concentração de etanol é a principal característica que permite a sua sobrevivência neste ambiente específico (PINA *et al.*, 2004). Sendo assim, foram realizados experimentos utilizando quantidades crescentes de etanol de modo a obter concentrações de 5% (v/v), 10% (v/v) e 15% (v/v). As leveduras DPUA 1210 e DPUA 1175 foram tolerantes às três concentrações e a DPUA 1172 cresceu apenas na concentração de 5% (v/v).

Cepas	Tempo (h)	Testes								
		CF						TE		
		Frut.	Glic.	Malt.	Sac.	Lac.	CFI.	5%	10%	15%
DPUA 1172	48	+	+	+	+	-	+	+	-	-
DPUA 1175		+	+	+	+	-	+	+	+	+
DPUA 1210		+	+	+	+	-	+	+	+	+

Tabela 6 - Capacidade fermentativa em diferentes fontes de carbono, capacidade de floculação e tolerância a etanol das leveduras DPUA1172, DPUA 1175 e DPUA 1210.

Nota: CF – capacidade fermentativa; Frut. – frutose, Glic. – glicose, Malt. – maltose, Sac. – sacarose, Lac. – lactose; CFI – capacidade floculativa; TE – tolerância ao etanol; (+) houve crescimento; (-) não houve crescimento.

No teste de produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) foi observada a variação de cor no perfil de pigmentação. De acordo com Guimarães (2005) as colônias enegrecidas são características de leveduras superprodutoras de sulfeto de hidrogênio, agregando odor e sabor desagradáveis às bebidas (RIBEIRO; HORII, 2002). A DPUA 1172 não produziu essa substância e as outras duas produziram pouco, apresentando colônias de coloração marrom, como mostra a Figura 2.

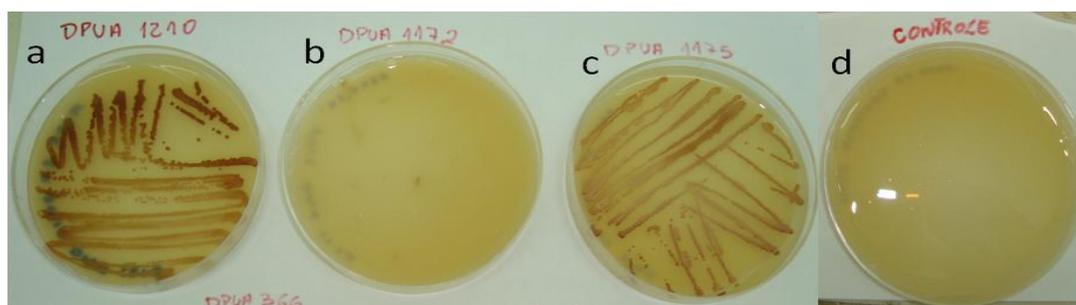


Figura 2 - Verificação da produção de sulfeto de hidrogênio após crescimento em meio ágar LA. (a) Linhagem DPUA 1210; (b) Linhagem DPUA 1172; (c) Linhagem DPUA 1175; (d) Meio controle.

As leveduras DPUA 1210 e DPUA 1175 atenderam aos critérios e características apropriadas ao processo de produção de vinho, sendo então utilizadas para a produção da bebida alcoólica fermentada de cupuaçu.

5.3 Elaboração da bebida alcoólica fermentada de cupuaçu

5.3.1 Seleção da linhagem mais eficaz para a produção de bebida alcoólica fermentada de cupuaçu

Para serem inoculadas no mosto, as duas leveduras passaram por um processo de multiplicação. No final desse processo, cada levedura apresentou a concentração de 25 % (v/v) em relação ao volume total do mosto e uma contagem de $0,546 \times 10^{10}$ (DPUA 1175) e $4,892 \times 10^{10}$ (DPUA 1210) de células viáveis. De acordo com EGLI *et al*, 1998, a inoculação de *Saccharomyces*, bem como a adição de sulfito ao mosto e a produção de etanol contribuem para a redução do crescimento de leveduras *não-Saccharomyces*.

A duração da fermentação foi de 12 dias. No Gráfico 1 estão apresentados os valores do °Brix do mosto de cupuaçu durante os processos fermentativos conduzidos pelas duas leveduras. Observou-se que, ao final da fermentação, o grau Brix permaneceu em aproximadamente 8,2 e 10,6 para DPUA 1210 e DPUA 1175, respectivamente.

As médias dos resultados em triplicata das análises físico-químicas realizadas nas bebidas estão na Tabela 7. As concentrações de etanol encontradas nas bebidas foram 11,25%

(v/v) (DPUA 1210) e 10,33% (v/v) (DPUA 1175). Esses dados estão diretamente relacionados com o teor de açúcares redutores residuais, sendo que a primeira levedura consumiu maior quantidade de açúcares e, conseqüentemente, produziu mais etanol.

Pelos teores de açúcares residuais, a bebida elaborada pela linhagem DPUA 1210 pode ser caracterizada como um vinho meio seco (5 a 19 g/L) e pela linhagem DPUA 1175 um vinho suave (a partir de 20 g/L), segundo Brasil (1988b).

Em relação aos índices de acidez total e volátil, dióxido de enxofre e pH não houve muita diferença entre as duas bebidas, conforme demonstra a Tabela 06. Além disso, os resultados não ultrapassaram os limites estabelecidos pela legislação.

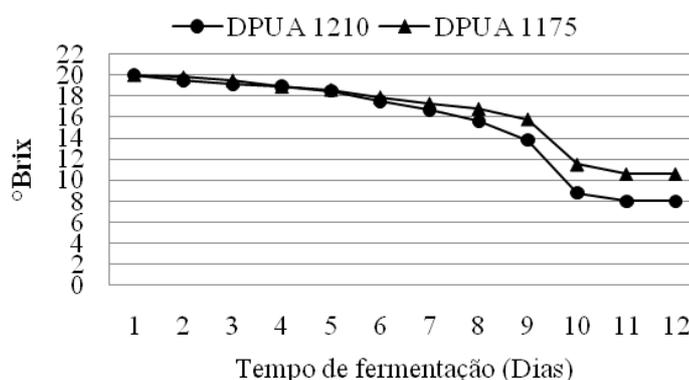


Gráfico 1 - Consumo de açúcares medidos em °Brix, em função do tempo de fermentação do mosto de cupuaçu, para a obtenção de bebidas alcoólicas utilizando as leveduras DPUA 1210 e DPUA 1175.

Composição físico-química	Cepas		Limites ¹	
	DPUA 1210	DPUA 1175	Máximo	Mínimo
Açúcares redutores (g/L)	11,27 ± 0,37	21,03 ± 0,60	(-)	(-)
Acidez total (meq/L)	113,76 ± 1,47	115,05 ± 0	130	50
Acidez volátil (meq/L)	3,49 ± 0,3	3,08 ± 0,092	20	(-)
pH	3,48 ± 0,015	3,48 ± 0,015	(-)	(-)
Etanol (%)	11,25 ± 0,04	10,33 ± 0,05	14,0	4
Sólidos solúveis (°Brix)	8,2 ± 0,2	10,6 ± 0,2	(-)	(-)
Dióxido de enxofre total (g/L)	0,018 ± 0,003	0,01 ± 0,0068	0,35 ²	(-)

Tabela 7 - Composição físico-química das bebidas alcoólicas fermentadas de cupuaçu produzidas pelas leveduras DPUA 1210 e DPUA 1175.

Nota: (-) não estabelecido; ¹ Limites estabelecidos por Brasil (2008); ² Limite estabelecido por Brasil (1988b).

A eficiência fermentativa foi de 80,55% e 83,60% para as bebidas elaboradas com as linhagens DPUA 1175 e DPUA 1210, respectivamente. Os cálculos foram efetuados de acordo com Alves (2009) e estão apresentados no Apêndice D. A levedura DPUA 1210 se mostrou mais ativa desde o preparo do inóculo, obtendo-se uma concentração de células cerca de quatro vezes maior que a levedura DPUA 1175 e, conseqüentemente, com maior produção de etanol.

5.3.2 Análises físico-químicas na bebida produzida pela DPUA 1210

A levedura DPUA 1210 foi selecionada com base nos resultados das análises apresentados no item 5.3.2 e, a partir dela, produziram-se dois tipos de bebidas que foram submetidos a avaliação sensorial por um painel de degustadores não treinados.

As médias dos resultados em triplicata das análises físico-químicas dos mostos e das bebidas estão nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.

O Brix foi corrigido, a fim de se obter, ao final da fermentação, teor alcoólico em torno de 10% (v/v) de álcool, caracterizando um vinho de mesa (10 a 13°GL), segundo a Legislação Brasileira (BRASIL, 1988b).

Em trabalhos realizados com fermentados de frutas foram produzidas bebidas fermentadas de laranja com 10,6 % v/v de etanol (CORAZZA *et al*, 2001) e de mandacaru com 10,4 % v/v (ALMEIDA *et al*, 2006) sendo essas concentrações de álcool semelhantes as das bebidas alcoólicas fermentadas de cupuaçu.

Foram elaboradas dois tipos de bebidas com concentrações diferentes de açúcares. A bebida que foi fermentada por 11 dias apresentou uma concentração de açúcar residual de 8,45 g/L, caracterizando-se como uma bebida do tipo vinho meio seco, que segundo a Portaria de N° 229, de 25 de outubro de 1988, que aprova as normas referentes a “complementação

dos padrões de identidade e qualidade do vinho, determina que os vinhos com concentração entre 5 a 19 g/L de açúcar se caracterizam como vinho meio seco.

A bebida obtida depois de 12 dias de fermentação apresentou concentração final de açúcar de 21,01 g/L, indicando uma bebida do tipo vinho suave. De acordo com a Legislação Brasileira o vinho suave é aquele que possui concentração de açúcar a partir de 20 g/L (BRASIL, 1988b).

Os mostos e as bebidas apresentaram pH ácido que, segundo Kolb; Schurig (2002), impede a multiplicação de bactérias. Valores semelhantes foram observados nos fermentados de abacaxi (3,47) (ARAÚJO *et al*, 2009) fermentado de cacau (3,6) (DIAS *et al*, 2007) e vinho tinto (3,36) (RIZZON *et al*, 2000)

Nos valores da acidez total se constatou um aumento nas duas bebidas, mas não houve excesso de produção de ácido, cujo limite máximo é de 130 meq/L (BRASIL, 2008). Segundo Guerra; Barnabé (2005), a acidez do vinho é o produto do seu teor em ácidos orgânicos que são provenientes tanto do mosto quanto da fermentação (ARAÚJO *et al*, 2009).

A acidez volátil é constituída, principalmente, pelo ácido acético que é formado pelo metabolismo bacteriano (GUIMARAES, 2005). Segundo Hashizume (2001), na fermentação alcoólica é normal apresentar acidez volátil, pois o ácido acético é um produto secundário normal da fermentação. A quantidade produzida é sempre pequena de 3 a 6 meq/L. Neste estudo, os valores de acidez volátil ficaram em torno de 4 meq/L, conforme demonstra a Tabela 10.

Em relação ao dióxido de enxofre total, Kolb; Schurig (2002) recomendam que não se deve ultrapassar 0,15g/L dessa substância para vinhos de fruta já engarrafado. Nesse estudo, as amostras apresentaram concentração menor que 0,15 g/L.

Ao analisar os limites estabelecidos pela Legislação Brasileira, observa-se que os resultados apresentados na Tabela 10 estão de acordo com a legislação vigente.

	Mosto 1	Mosto 2
Acidez total (meq/L)	101,84 ± 0,56	112,08 ± 1,48
pH	3,33 ± 0,02	3,33 ± 0,01
Açúcares redutores (g/L)	208,63 ± 2,22	216,86 ± 2,77
Sólidos solúveis (°Brix)	22,8 ± 0,2	22,4 ± 0,2

Tabela 8 - Composição físico-química dos mostos de cupuaçu antes da fermentação.

	Bebida alcoólica fermentada de cupuaçu do tipo vinho meio seco	Bebida alcoólica fermentada de cupuaçu do tipo vinho suave
Acidez total (meq/L)	112,4 ± 1,47	116,6 ± 1,11
Acidez volátil (meq/L)	4,19 ± 0	4,01 ± 0,3
pH	3,53 ± 0,043	3,40 ± 0,02
Açúcares residuais (g/L)	8,45 ± 0,67	21,01 ± 0,86
Sólidos solúveis (°Brix)	8,4 ± 0,2	10,6 ± 0,2
Dióxido de enxofre total (g/L)	0,04 ± 0,006	0,02 ± 0,006
Etanol (%)	10,85 ± 0,11	10,05 ± 0,02

Tabela 9 - Composição físico-química dos dois tipos de bebida alcoólica fermentada de cupuaçu utilizando como agente fermentativo a cepa DPUA 1210.

Segundo Berry; Slaughter (2003), durante a fermentação, a maior parte do açúcar é convertida em etanol, e é normal que uma pequena porcentagem seja convertida em outros subprodutos. Eles incluem alcoóis superiores, ésteres, aldeídos dentre outros. Esses compostos são responsáveis pelas características aromáticas dos vinhos e contribuem para a sua qualidade.

Os valores médios das concentrações dos compostos secundários encontrados nas bebidas estão apresentados na Tabela 10. Os resultados não diferem muito entre si, pois foram utilizados mostos semelhantes e a mesma linhagem de levedura. Entretanto, o teor de ésteres na bebida tipo vinho suave apresentou maior concentração comparada com a bebida tipo vinho seco. Valores semelhantes foram constatados no artigo de Duarte *et al* (2009), cujo

resultado foi de 115.55 mg/L na bebida fermentada de gabioba. Segundo Rizzon, (1987), a quantidade de ésteres aumenta com o período de envelhecimento.

Em relação aos alcoóis superiores, concentrações acima de 400 mg/L influência negativamente na qualidade dos vinhos (González-Marco *et al*, 2008). No estudo feito por Araújo *et al* (2009) com o vinho de abacaxi da cultivar Smooth cayenne, o teor médio de alcoóis foi de 347,6 mg/L, valor semelhante ao encontrado no presente trabalho.

O acetaldeído representa cerca de 90% da concentração total dos aldeídos e é um produto da oxidação do etanol (SALTON, 2000). De acordo com o estudo feito por Longo *et al* (1992), o conteúdo de acetaldeído no vinho produzido de uvas é, usualmente, em torno de 13-30 mg/L. O teor de aldeídos total encontrado nas bebidas não ultrapassou 35 mg/L.

As concentrações de metanol foram de 20,71 e 23,53 mg/L nas bebidas tipo vinho meio seco e suave, respectivamente. De acordo com a Portaria 229 de 25/10/1988 do Ministério da Agricultura, o máximo permitido é de 350 mg/L, pois o metanol em concentrações elevadas pode causar intoxicações e até levar à morte (NAGATO *et al*, 2001).

Geralmente o alto conteúdo de metanol é atribuído ao uso de enzimas pectinolíticas, que são comumente utilizadas na produção de vinho de manga e são responsáveis pela quebra das substâncias pécticas para ácidos galacturônicos e metanol (REDDY; REDDY, 2005). No estudo de Soufleros *et al* (2001), o fermentado de kiwi não tratado com pectinases o teor de metanol foi baixo (134 mg/L) quando comparado com amostras tratadas com pectinases.

	Aldeídos	Ésteres	Alcoóis superiores	Metanol
	mg/L			
Bebida alcoólica fermentada de cupuaçu do tipo vinho meio seco	27,34	52,685	338,29	20,71
Bebida alcoólica fermentada de cupuaçu do tipo vinho suave	34,77	106,14	338,53	23,53

Tabela 10 - Valores médios das concentrações de aldeídos, ésteres, alcoóis superiores e metanol nas bebidas fermentadas de cupuaçu.

5.4 Análise sensorial

Após 30 dias de maturação a temperatura média de 2°C apurando o aroma e o sabor, os dois tipos de bebida alcoólica fermentada de cupuaçu utilizando como agente fermentativo a cepa DPUA 1210 foram submetidos à análise sensorial para avaliar aceitabilidade dentre os consumidores. O painel de degustação estava constituído de 50 provadores. De acordo com a Tabela 11, observa-se que a maior parte dos degustadores era jovem, na faixa etária de 19 a 30 anos, sendo a maioria do sexo feminino e que tem o hábito de consumir vinho.

	Classe	Frequência	Porcentagem (%)
Idade	19 † 30	37	74
	30 † 40	9	18
	40 † 50	3	6
	50 † 60	1	2
Sexo	F	34	68
	M	16	32
Hábito de tomar vinho	S	35	70
	N	15	30

Tabela 11 - Perfil dos provadores

Na Tabela 12 são apresentados os valores médios das notas para cada atributo sensorial avaliado. Observa-se que as notas não se diferenciaram entre os atributos de cada bebida.

Para melhor visualizar possíveis diferenças na aceitação das amostras foi construído um histograma da distribuição das frequências das repostas dos provadores para cada atributo. Sendo que na escala hedônica a categoria “nem gostei e nem desgostei” (valor 3) é considerada como uma região de indiferença na relação afetiva do provador com o produto,

dividindo a escala em duas outras regiões: a região de aceitação (valores 4 e 5), e a região de rejeição do produto (valores de 1 e 2) (DORNELLES *et al*, 2009).

Em todos os atributos as duas bebidas foram bem aceitas, apresentando os mais altos percentuais na região de aceitação da escala hedônica (valores de 4 e 5). Ao comparar as duas formulações não houve diferença significativa, ou seja, as duas apresentaram frequências semelhantes.

Para facilitar a interpretação desses resultados foram somadas as frequências das categorias da rejeição, indiferença e aceitação, as quais são apresentadas no Gráfico 3. Nessa figura fica evidente a grande aceitação dos provadores tanto para a bebida alcoólica fermentada de cupuaçu do tipo vinho seco (Bebida 1) quanto para a da bebida alcoólica fermentada de cupuaçu do tipo vinho suave (Bebida 2). A Bebida 1 e a Bebida 2 apresentaram, em média, para todas os atributos 82,5% e 81% de aceitação, respectivamente, 14,5% e 16% de indiferença e 3% de rejeição para ambas.

Atributos	Bebida alcoólica fermentada de cupuaçu tipo vinho meio seco	Bebida alcoólica fermentada de cupuaçu tipo vinho suave
Cor	4,10 ± 0,76	4,10 ± 0,81
Aroma	4,00 ± 0,75	3,90 ± 0,81
Sabor	4,16 ± 0,84	4,20 ± 0,67
Aspecto geral	4,22 ± 0,68	4,10 ± 0,71

Tabela 12 - Média e desvio padrão das notas de 1-5, conferidos pelos provadores a cada atributo, para as duas amostras de bebida alcoólica fermentada de cupuaçu.

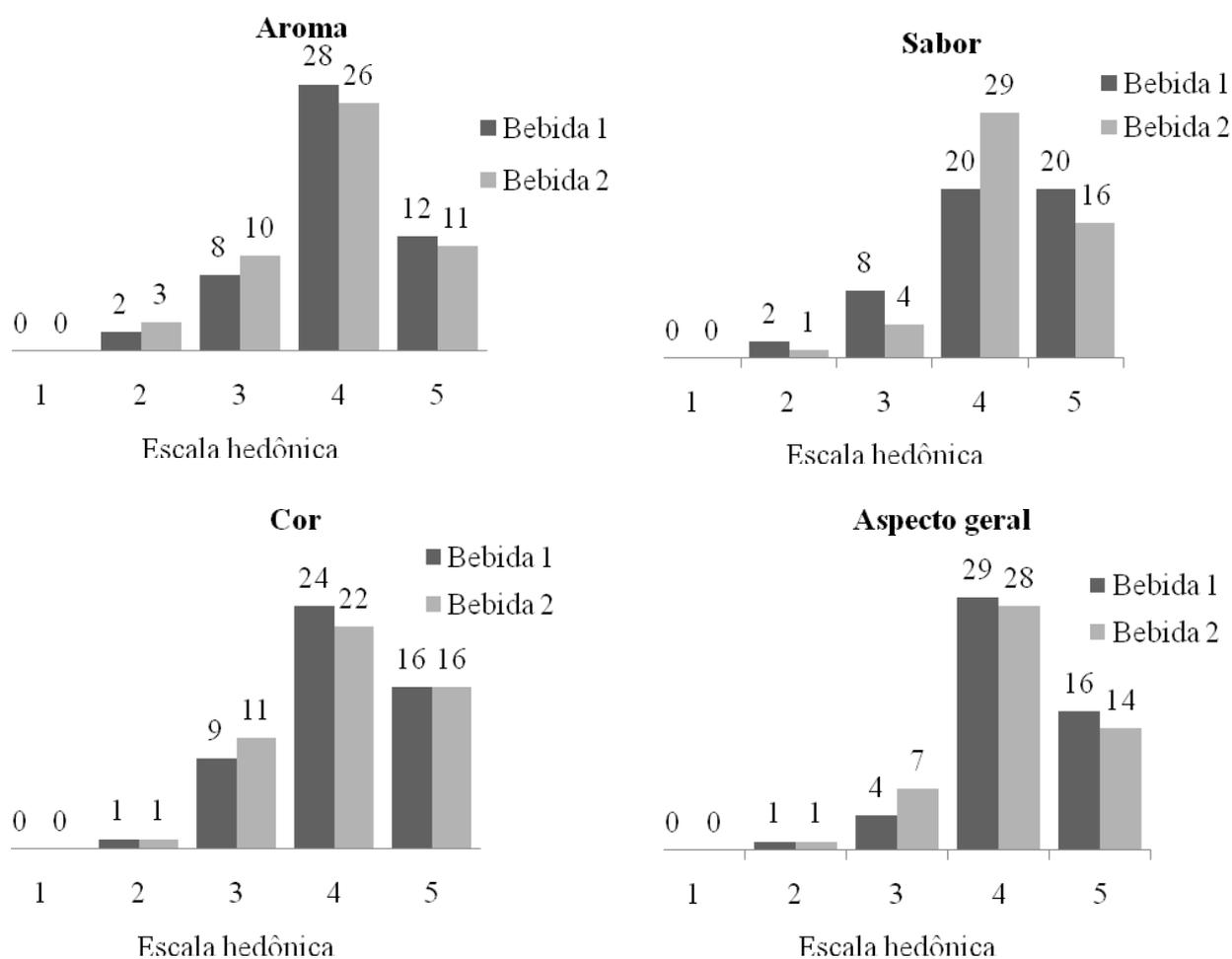


Gráfico 2 - Histogramas de frequência dos valores hedônicos atribuídos ao aroma, sabor, cor e aspecto geral das amostras de bebida alcoólica fermentada de cupuaçu do tipo vinho meio seco (Bebida 1) e da bebida alcoólica fermentada de cupuaçu do tipo vinho suave (Bebida 2).

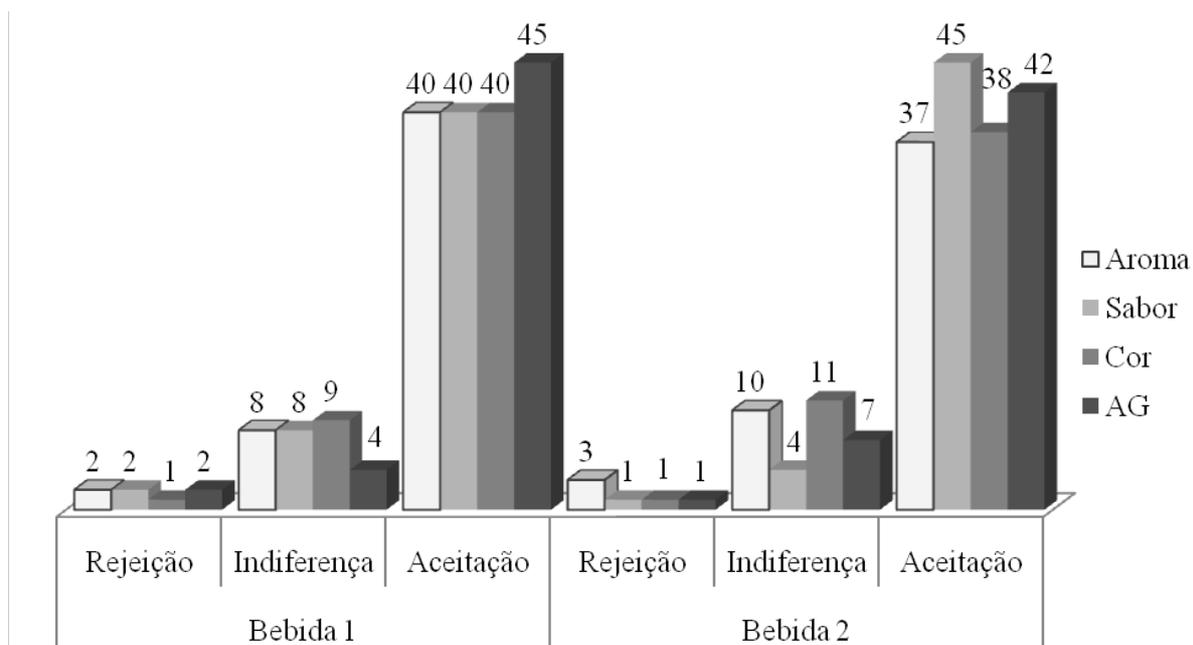


Gráfico 3 - Frequência de aprovação, indiferença e rejeição dos atributos aroma, sabor, cor e Aspecto geral das amostras de bebida alcoólica fermentada de cupuaçu do tipo vinho meio seco (Bebida 1) e da bebida alcoólica fermentada de cupuaçu do tipo vinho suave (Bebida 2).

6. CONCLUSÃO

As leveduras selecionadas DPUA 1210 e DPUA 1175 apresentam propriedades enológicas importantes que atendem aos critérios e características apropriadas ao processo de produção de vinho, como tolerância ao etanol até a concentração de 15% (v/v), habilidade em fermentar carboidratos, capacidade de floculação e a não produção excessiva de sulfeto de hidrogênio.

As duas leveduras selecionadas foram capazes de realizar fermentação alcoólica utilizando como substrato o cupuaçu, com produção em cerca de 10% (v/v) de etanol. A levedura DPUA 1210 apresentou uma produtividade em etanol maior que a levedura DPUA 1175.

O cupuaçu comprovou ser uma matéria-prima eficaz na produção de bebida alcoólica fermentada, quando se utiliza leveduras selvagens da Amazônia.

As análises físico-químicas das bebidas produzidas pelas linhagens DPUA 1210 e DPUA 1175, estavam de acordo com os limites estabelecidos pela legislação brasileira.

As bebidas produzidas pela linhagem DPUA 1210 não apresentaram teor de metanol que excedesse o limite estabelecido pela legislação Brasileira e descrito como tóxico. As concentrações de alcoóis superiores totais e de ésteres, que são os componentes mais importantes presentes nas bebidas alcoólicas, estão inseridas na faixa em que favorecem o aroma de vinhos de uvas.

As análises sensoriais indicaram que os provadores aprovaram tanto da bebida alcoólica fermentada de cupuaçu do tipo vinho meio seco quanto da bebida alcoólica fermentada de cupuaçu do tipo vinho suave, obtendo 82,5% e 81% de aceitação, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, J. A. **Características químicas físico-químicas e sensoriais de bebida fermentada de lichia (*Litchia chinensis* Sonn)**. Lavras: UFLA, 2009. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciência de Alimentos), 2009.

ALMEIDA, Mércia Melo; TAVARES, Daniela Passos Simões de Almeida; OLIVEIRA, Líbia de Souza Conrado; SILVA, Flávio Luiz Honorato. Cinética da produção do fermentado do fruto de mandacaru. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. V. 8, n. 1, p. 35-42, 2006.

AMORIM, Henrique V. **Métodos analíticos para o controle da produção de álcool e açúcar**. 2 ed. Piracicaba: FERMENTEC, 1996.

ANDRADE, Jerusa S.; PANTOJA, Lilian; MAEDA, Roberto N. Melhoria do rendimento e do proceso de obtenção da bebida alcoólica de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). **Ciênc. Technol. Aliment**. Campinas, 23, p. 34-38, 2003.

ANVISA. Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. In: **Diário Oficial da União**. Brasília, 2001.

ARAÚJO, Kátia Gomes Lima; SABAA-SUR, Armando Ubirajara Oliveira; RODRIGUES, Fabiana Silva; MANHÃES, Luciana Ribeiro Trajano; CANTO, Marta Weber. Utilização de abacaxi (*Ananas comusus* L.) cv. Pérola e Smooth cayenne para a produção de vinhos – estudo da composição química e aceitabilidade. **Ciênc. Technol. Aliment**. V. 29, p. 56-61, 2009.

ARRUDA, A. R.; CASIMIRO, A. R. S.; GARRUTI, D. S.; ABREU, F. A. P. Processamento de bebida fermentada de banana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 34, n.2, p. 161-7, 2003.

AZEVÊDO, L. C. Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. **Quim. Nova**, v. 30, n. 8, p. 1968-75, 2007.

BARNNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D.. **Yeasts: Characteristics and identification**. New York, Cambridy University Press, 2º ed, 1990.

BARRE, P.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; FEUILLAT, M.; SABLAYROLLES, J. M.; SALMON, J. M. La levadura de fermentación alcohólica. In: FLANZY, C. **Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos**. (Trad. Antonio López Gómez, José Macho Quevedo, Antonio Madrid Vicente). 2 ed. Madrid: Mundi-Prensa, 2003.

BAYONOVE, C.; BAUMES, R.; CROUZET, J.; GUNATA, Z. Aromas. In: LEA, A. G. H., PIGGOTT, J. R. **Fermented beverage production**. 2 ed. London, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.

BERRY, D. R.; SLAUGHTER, J. C. Alcoholic beverage fermentations. In: LEA, A. G. H., PIGGOTT, J. R. **Fermented beverage production**. 2 ed. London, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.

BOULANGER, R.; CROUZET, J. Free and bound flavour components of Amazonian fruits: 2. cupuaçu volatile compounds. **Flavour Fragr. J.**, v. 15, p. 251-7, 2000.

BRASIL. Decreto n. 2314, de 04/09/1997. 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, 1997.

BRASIL. Instrução Normativa N° 24, de 08 de Setembro de 2005. Aprova o Manual Operacional de Bebidas e Vinagres. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 2005.

BRASIL. Lei n° 7678, de 8 de novembro de 1988. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 1988a.

BRASIL. Portaria n° 64, de 23 de abril de 2008. Dispõe sobre os padrões de identidade e qualidade para as bebidas alcoólicas fermentadas: fermentado de fruta, sidra, hidromel, fermentado de cana, fermentado de fruta licoroso, fermentado de fruta composto e saquê. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 2008.

BRASIL. Portaria n° 229, de 25 de outubro de 1988. : Aprovar as Normas referentes a Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 1988b.

CARVALHO, J.E.U. de; MÜLLER, C.H.; BENCHIMOL, R.L.; KATO, A.K.; ALVES, R.M. **Copoasu [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.]: cultivo y utilización**. Manual Técnico. Caracas: FAO, Tratado de Cooperación Amazonica, 1999.

CHAAR, J. M. **Composição do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) e conservação do seu néctar por meios físicos e químicos**. Rio de Janeiro: UFRJ, 1980. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1980.

CHIARELLI, R. H. C.; NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI-FILHO, W. G. Fermentados de Jaboticaba (*Myrciaria Cauliflora* Berg): Processos de Produção, Características Físico-químicas e Rendimento. **Braz. J. Food Technol.**, v.8, n.4, p. 277-282, 2005.

CHOWDHRURY, P.; RAY, R. C. Fermentation of Jamun (*Syzgium cumini* L.) fruits to form red wine. **ASEAN Food Journal**, 14, p. 15-23, 2007.

COLWELL R.R.. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 18, p. 302-7, 1997.

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

COSTA, E. L. **Exportação de nutrientes em fruto de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng. Schum) em três solos da Amazônia central**. Manaus: INPA/UFAM,

2006. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais), Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, 2006.

COSTA, M. C.; MAIA, G. A.; SOUZA, M. S. M. F.; FIGUEIREDO, R. W.; NASSU, R. T.; MONTEIRO, J. C. S. Conservação de polpa de cupuaçu [*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum] por métodos combinados. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 213-215, 2003.

CRAIG, A. Comparison of the headspace volatiles of kiwifruit wine with those wines of *Vitis vinifera* variety Muller-Thurgau. **American Journal of Enology and Viticulture**, 39, p. 321–324, 1998.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; FREIRE, E. S.; SERÔDIO, R. dos S. Elaboration of a fruit wine from cocoa (*Theobroma cacao* L.) pulp. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 42, p. 319–29, 2007.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; LIMA, L. C. O. Metodologia para elaboração de fermentado de cajá (*Spondias mombin* l.). **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 23, n. 3, p. 342-50, 2003.

DORNELLES, A. S.; RODRIGUES, S.; GARRUTI, D. S. Aceitação e perfil sensorial das cachaças produzidas com Kefir e *Saccharomyces cerevisiae*. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 29, n. 3, p. 518-22, 2009.

DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; PEREIRA, G. V. M.; GERVÁSIO, I. M.; SCHWAN, R. F. Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabioba (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 36, p. 557–69, 2009.

EGLI, C. M.; EDINGER, W. D.; MITRAKUL, C. M.; HENICK-KLING, T. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. **Journal of Applied Microbiology**, V. 85, p. 779-789. 1998.

FERREIRA, V. L. P. **Análise sensorial: testes discriminativos e afetivos**. Campinas: SBCTA, 2000.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavor. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 11 – 22, 2003.

FRANCO, M. R. B.; SHIBAMOTO, T. Volatile composition of some Brazilian fruits: umbu-caja (*Spondias citherea*), camu-camu (*Myrciaria dubia*), araca-boi (*Eugenia stipitata*), and copoazu (*Theobroma grandiflorum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 1263–5, 2000.

GUIMARÃES, T. M. **Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho**. Curitiba: UFPR, 2005. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, 2005.

HASHIZUME, T. **Fabricação de vinhos de frutas – Manual prático**. Campinas: ITAL, 1991.

HASHIZUME, Takuo. Fundamentos de Tecnologia do Vinho. In. AQUARONE, Eugênio; LIMA, Urgel de Almeida; BORZANI, Walter. **Biotechnologia: Alimentos e bebidas produzidas por fermentação**. São Paulo: Blücher, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4° ed. São Paulo, 2005.

KOLB, Erich. **Vinos de frutas: Elaboración artesanal e industrial**. (Trad. Lorenzo Serrahima Formosa). Zaragoza: Acribia, 2002.

KOLB, Erich; SCHURIG, Ulrich. La producción profesional e industrial de vino. In. KOLB, Erich. **Vinos de frutas: Elaboración artesanal e industrial**. (Trad. Lorenzo Serrahima Formosa). Zaragoza: Acribia, 2002.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

LONGO, E.; VLAZQUEZ, J.B.; SIERO, C.; ANSADO, C.J.; VILLA, T.G. Production of higher alcohols, ethyl acetate, acetaldehyde and other compounds by *S. cerevisiae* wine strains isolated from the same region (Salnes N.W Spain). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 8, 539–541, 1992.

LOPES, R. V. V.; SILVA, F. L. H.. Elaboração de fermentados a partir do figo-da-india. **Revista de biologia e ciências da terra**, v. 6, n. 2, p. 305-315, 2006.

MAEDA, R. N.; ANDRADE, J. S. Aproveitamento do camu-camu (*Myrciaria dubia*) para produção de bebida alcoólica fermentada. **Acta amazonica**, v. 33, n. 3, p. 489-498, 2003.

MATEOS, J.A. R.; PÉREZ-NEVADO, F.; FERNÁNDEZ, M. R. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain on the major volatile compounds of wine. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p.151–7, 2006.

MATOS, C. B.; SOUZA, C. N.; FARIA, J. C.; OLIVEIRA, S. J. R.; SANTOS, L. P.; SACRAMENTO, C. K. Características físicas e físico-químicas de cupuaçu de diferentes formatos. **Ciênc. Agrár.**, n. 50, p. 35-45, 2008.

MINIM, V. P. R. **Análise Sensorial: estudo com consumidores**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2006.

MMA. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Produtos potenciais da Amazônia: Cupuaçu**. Brasília: MMA/SUFRAMA/SEBRAE/GTA, v. 19, 1998.

MOHANTY, S.; RAY, P.; SWAIN, M.R; RAY, R.C. Fermentation of cashew (*Anacardium occidentale* L.) “apple” into wine. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 30, p. 314-22, 2006.

MUNIZ, C. R.; BORGES, M. de F.; ABREU, F. A. P. de; NASSU, R. T.; FREITAS, C. A. S. de. Bebidas fermentadas a partir de frutos tropicais. **B.CEPPA**, n. 2, v. 20, p. 309-322, 2002.

NAGATO, L. A. F.; DURAN, M. C.; CARUSO, M. S. F.; BARSOTTI, R. C. F.; BADOLATO, E. S. G. Monitoramento da autenticidade de amostras de bebidas alcoólicas enviadas ao instituto ADOLFO LUTRZ em São Paulo. **Cienc, tecnol aliment**, n. 1, v. 21, p. 39-42, 2001.

PATERSON, A; SWANSTON, J. S.; PIGGOTT, J. R. Production of Fermentable Extracts from Cereals and Frutis. In: LEA, A. G. H., PIGGOTT, J. R. **Fermented beverage production**. 2 ed. London, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.

PINA, C.; SANTOS, C.; COUTO, J.A.; HOGG, T. Ethanol tolerance of five non-Saccharomyces wine yeasts in comparison with a strain of Saccharomyces cerevisiae – influence of different culture conditions. **Food Microbiology**, 21, p. 439-447, 2004.

PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking – a review. **Yeast**, v. 16, p. 675-729, 2000.

QUIJANO, C. E.; PINO, J. A. Volatile compounds of copoazú (*Theobroma grandiflorum* Schumann) fruit. **Food Chemistry**, 104, p. 1123–1126, 2007.

REDDY, L.V.A.; REDDY O.V.S. Production and characterization of wine from mango fruit (*Mangifera indica* L). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 1345–50, 2005.

RIBEIRO, C.A.F.; HORII, J. Potencialidades d linhagens de levedura Saccharomyces cerevisiae para a fermentação do caldo de cana. **Scientia Agrícola**, v. 56, 1999.

RIZZON, Luiz Antenor. Composição química dos vinhos da microrregião homogênea vinicultora de Caxias do Sul (MRH 311) – compostos voláteis. **CNPUV**, n. 5, p. 1 – 4, 1987.

RIZZON, Luiz Antenor; MIELE, Alberto; MENEGUZZO, Júlio. Avaliação da uva cv. Isabel para a elaboração de vinho tinto. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. Vol. 20, n. 1. 2000.

SALTON, M. A.; DAUDT, C. E.; RIZZON, L. A. Influência do dióxido de enxofre e cultivares de videira na formação de alguns compostos voláteis e na qualidade sensorial do destilado de vinho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 3, p. 302-308, 2000.

SANNI, A. I.; LONNER, C. Identification of yeasts isolated from Nigerian traditional alcoholic beverages. **Food Microbiology** , v. 10, p. 517-523, 1993.

SANTOS, B. A. C. **Compostos voláteis e qualidade dos vinhos secos jovens varietal cabernet sauvignon produzidos em diferentes regiões do brasil**. Campinas: UNICAMP, 2006. Tese de doutorado (Doutorado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2006.

SANTOS, Sidney; ALMEIDA, Sheyla dos Santos; TOLEDO, André Luís; SANTANA, José Carlos Curvelo; SOUZA, Roberto Rodrigues. Elaboração e análise sensorial do Fermentado de Acerola (*Malpighia Punicifolia* L.). **Braz. J. Food Technol**. 5° SIPAL, 2005

SILVA, N. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3° ed. São Paulo, Varela, 2007.

SOUFLEROS, E.H.; PISSA, I.; PETRIDIS, D.; LYGERAKIS, M.; MERMELAS, K.; BOUKOUVALAS, M.; TSIMITAKIS, E. Instrumental analysis of volatile and other compounds of Greek kiwi wine; sensory evaluation and optimization of its composition. **Food Chemistry**, 75, 487–500, 2001.

SOUZA, A. das G.C. de.; SILVA, S.E.L. da.; TAVARES, A.M.; RODRIGUES, M. do R.L. **A cultura do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.)**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 1999.

UFPR. **Bioquímica: aulas práticas**. 6ª ed. Curitiba: UFPR, 2002.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. Bebida – **Tecnología, química y microbiología**. (Trad. José Manuel Ena Dalmau). Zaragoza: Acribia, 1994.

VENTURIERI, G. A. **Cupuaçu: a espécie, sua cultura, usos e processamento**. Belém: Clube do cupu, 1993.

VENTURIERI, G. A. Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). In. CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. T. B.; CLEMENT, C. **Biodiversidade amazônica: exemplos e estratégia de utilização**. 1º ed. Manaus: SEBRAE/INPA, 1999.

VIANA, A. D. **Propriedades termofísicas e comportamento reológico da polpa de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) em diferentes concentrações e temperaturas**. Itapetinga: UESB, 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2010.

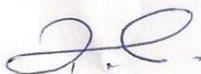
WARD, O. P. **Biología de la fermentación. Principios, procesos y productos**. (Trad. Miguel Calvo Rebollar). Zaragoza: Acribia, 1991.

APÊNDICE A – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa da UFAM

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº. 0330.0.115.000-09, intitulado: **“AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DUAS LINHAGENS DE LEVEDURAS NA PRODUÇÃO DE BEBIDA ALCOÓLICA FERMENTADA DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum* Schum)”**, tendo como Pesquisadora Responsável Lirna Salvioni da Silva.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 18 de novembro 2009.



Prof. MSc. Plínio José Cavalcante Monteiro
Coordenador do CEP/UFAM

APÊNDICE B - Ficha de avaliação sensorial adaptado de Alves (2009);
Ferreira *et al* (2000).

FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL

Data: ____/____/____

Idade: ____

Sexo: ()F ()M

Tem o hábito de tomar vinho? () sim () não

Frequência com que você consome vinho: () Mais de 2 vezes por semana () 1 vez por semana () 2 vezes por mês () Raramente

Por favor, avalie a amostra e indique, utilizando a escala abaixo, o quanto você gostou ou desgostou da cor, aroma, sabor e do aspecto geral da amostra da bebida fermentada de cupuaçu.

5 – Gostei muito

4 – Gostei

3 – Não gostei/ nem desgostei

2 – Desgostei

1 – Desgostei muito

Notas			
Aroma	Sabor	Cor	Aspecto geral

Comentários/sugestões: _____

APÊNDICE C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr(a) para participar do Projeto de Pesquisa “**Avaliação da eficiência de linhagens de leveduras na produção de bebida alcoólica fermentada de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum)**” que tem como objetivo avaliar a eficiência de linhagens de leveduras isoladas da Amazônia na produção de bebida alcoólica fermentada, utilizando como matéria-prima o cupuaçu. As pesquisadoras Lima Salvioni da Silva e Dra. Ila Maria de Aguiar Oliveira, responsáveis pelo projeto, pedem a sua colaboração para degustar em pequena quantidade a bebida alcoólica fermentada de cupuaçu e preencher uma ficha de avaliação sensorial das mesmas. Nas amostras foram realizadas análises físico-químicas e microbiológicas, garantindo assim a qualidade e a segurança da bebida a ser avaliada, e seguindo todos os requisitos de boas práticas de fabricação.

O (a) Sr(a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhum valor econômico, mas a sua participação é de fundamental importância para o avanço da pesquisa.

Se não quiser participar, tem o direito e a liberdade de se recusar, ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem precisar se justificar, nem sofrer qualquer dano.

A utilização dos resultados será feita única e exclusivamente para a referida pesquisa, garantindo a total confidencialidade dos julgadores. Para qualquer outra informação, o (a) Sr.(a) poderá entrar em contato com a pesquisadora pelo telefone (92) 3233-5095 ou pelo e-mail: lirasalvioni@gmail.com.

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Estou recebendo uma cópia deste documento, assinada, que vou guardar.

Assinatura do participante

_____-_____
Data

Pesquisadora Responsável

_____-_____
Data

APÊNDICE D – Cálculo da Eficiência fermentativa

Fórmula utilizada no cálculo da eficiência fermentativa (E_f) segundo Alves (2009)

$$E_f = \frac{P}{0,511(S_0 - S)} \times 100$$

P= concentração final de etanol (g L^{-1})

S_0 = concentração inicial de açúcares totais (g L^{-1})

S = concentração final de açúcares totais (g L^{-1})

	S_0 (g/L)	S (g/L)	P (g/L)	E_f (%)	Média E_f (%)
Bebida alcoólica produzida pela DPUA 1210	225,82	11,3	88,90	86,40	83,60
	213,33	11,62	88,43	83,70	
	218,82	10,88	89,06	80,70	
Bebida alcoólica produzida pela DPUA 1175	225,82	20,64	81,96	78,15	80,55
	213,00	20,73	81,32	82,75	
	218,82	21,71	81,32	80,74	