

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

OTTO LUCAS HEINZ

**ISOLAMENTO DE LEVEDURAS DE AMORA-PRETA (*Rubus* sp.) VISANDO
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATO BRANCO

2014

OTTO LUCAS HEINZ

**ISOLAMENTO DE LEVEDURAS DE AMORA-PRETA (*Rubus* sp.) VISANDO
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado à Comissão de Diplomação do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Pato Branco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Mário Antônio Alves da Cunha.

TERMO DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **ISOLAMENTO DE LEVEDURAS DE AMORA-PRETA (*Rubus sp.*) VISANDO FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA** foi considerado **APROVADO** de acordo com a ata da banca examinadora N° **2.14/2013-B**.

Fizeram parte da banca os professores:

Prof. Dra Mário Antônio Alves da Cunha

Profa. Dr. Edenes Schroll Loss

Profa. Dra. Letícia Ledo Marciniuk

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pelo dom da vida.

Agradeço também a minha família, em especial a meu pai José Elias Heinz, minha mãe Leonir Heinz, minha Avó Irmgard Heinz e a meu irmão Renato Heinz, que me apoiaram desde o começo desta caminhada. Agradeço por apoiarem minhas decisões e acima de tudo estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis, assim como os de alegrias.

Agradeço a Francine Yumi Kagimura e Thais Vanessa Theis pelo apoio ao trabalho e pela amizade.

Agradeço ao meu orientador Dr. Mário Antônio Alves da Cunha, pela orientação e apoio, contribuindo em muito para minha formação, meu sincero obrigado.

A todos os amigos e colegas que ajudaram nesta caminhada.

EPÍGRAFE

*“De tudo, ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...
Portanto devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo ...
Da queda um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro...”*
(Fernando pessoa)

RESUMO

HEINZ, L. OTTO. Isolamento de leveduras de amora-preta (*Rubus sp.*) visando fermentação alcoólica. 2014. 37 f. Trabalho de Conclusão de Curso – (Bacharelado em Química) Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2014.

A amora-preta é uma pequena fruta de coloração atraente, variando da coloração vermelho púrpura a roxa, pertencente ao gênero *Rubus* e família *Rosaceae*, mesma família das framboesas. Considerando o cultivo simples e o alto valor de mercado da fruta, sua produção em propriedades familiares pode vir a ser uma boa alternativa para diversificação da produção e aumento de renda da propriedade. No entanto, a amora-preta tem vida de prateleira curta devida à elevada taxa respiratória e deterioração causada por micro-organismos presentes na própria fruta. Desta forma, a transformação da fruta em produtos derivados é uma estratégia para a conservação das propriedades do fruto e agregação de valor. Foi proposto no presente trabalho, o isolamento de leveduras naturalmente presentes na fruta buscando cepas com potencial para fermentação alcoólica e produção de vinho de amora. Para o isolamento das leveduras foram empregados dois protocolos distintos, sendo isolados cinco leveduras e um fungo filamentosos a partir da amora-preta. Fermentações descontínuas foram realizadas para avaliar o potencial fermentativo das leveduras isoladas. Todas as leveduras isoladas produziram etanol a partir de mosto à base de polpa de amora-preta, havendo destaque para duas cepas. Na fermentação com melhor desempenho foram verificados produção final de etanol de 47,16 g/L, rendimento de 0,43 g/g, produtividade de 0,53 g/Lh e percentual de assimilação de substrato de 57,53%. Os resultados obtidos indicam que uma das leveduras isoladas apresenta elevado potencial para fermentação alcoólica e possivelmente seria um bom micro-organismo para a produção de vinho de amora-preta.

Palavras-chave: Amora-preta (*Rubus sp.*). Isolamento de micro-organismos. Fermentação alcoólica.

ABSTRACTS

HEINZ,L.Otto. Isolation of yeasts from blackberry (*Rubus* sp.) aiming alcoholic fermentation. 2014. 37 f. Trabalho de Conclusão de Curso – (Bacharelado em Química) Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2014.

The blackberry is a small fruit with attractive color, ranging from red to purple color, belonging to the *Rubus* and *Rosaceae* family, the same family of raspberries. Considering the simple cultivation and high market value, the fruit production on family farms can become a good alternative to diversify production and increase income from the property. However, the blackberry has short shelf life due to the high respiratory rate and deterioration caused by micro-organisms present in the fruit itself. Thus, the transformation of fruit on derivatives is a strategy for the conservation of the properties of the fruit and add value. It was proposed in this paper, the isolation of yeasts naturally present in fruit seeking strains with potential for fermentation and production of blackberry wine. For isolation of yeasts two distinct protocols were employed five yeasts and filamentous fungi were isolated from the blackberry. Discontinuous fermentations were performed to evaluate the potential of fermentative yeasts isolated. All yeasts produced ethanol from based pulp blackberry, with emphasis on two strains. The best performance in the end of the fermentation produced 47.16 g/L of ethanol, yield 0.43 g/g, productivity of 0.53 g/Lh and percentage of substrate assimilation of 57.53% were observed. The results indicate that one of the isolated yeasts present high potential for ethanol fermentation and possibly would be a good micro-organism for the production of wine from blackberry.

Keywords: Blackberry (*Rubus* sp.). Micro-organisms isolation. Alcoholic fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Frutas da amoreira (<i>Rubus</i> sp.)	14
Figura 2- Cuba utilizada para fermentação espontânea e seleção natural de micro-organismos.....	19
Figura 3- Processador de frutas.....	21
Figura 4- Mosto obtido da amora-preta.....	21
Figura 5- Cubas utilizadas para realização dos ensaios fermentativos.....	21
Figura 6- Micro-organismos isolados da fruta (leveduras: isolados A, B, C, D e F; Fungo filamentosos: isolado E).....	25
Figura 7- Micro-organismo isolado do fermentado alcoólico.....	26
Figura 8 Comportamento do pH e acidez titulável ao longo do ensaio da fermentação alcoólica.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição da amora-preta (<i>Rubus</i> sp.).	15
Tabela 2- Parâmetros fermentativos dos ensaios com diferentes cepas isoladas de amora-preta (<i>Rubus</i> sp.).	29
Tabela 3-Parâmetros físico-químicos dos fermentados obtidos com diferentes cepas isoladas de amora.	30

LISTA DE ACRÔNIMOS

η Eficiência

Q_P Produtividade Volumétrica

P_F Produção Final

$Y_{P/S}$ Rendimento

DNS Ácido 3,5 dinitrosalicílico

B.O.D Biochemical oxygen demand

Q_S Taxa global do consumo do substrato

Y_C Percentual global de consumo do substrato

SST Sólidos solúveis totais

pH Potencial Hidrogênionico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1 AMORA-PRETA (<i>Rubus</i> sp.).....	14
3.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA E FERMENTADO DE FRUTAS.....	15
3.2 MICRO-ORGANISMOS DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 MATÉRIA-PRIMA.....	18
4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	18
4.2.1 Isolamento de leveduras	18
4.2.2 Preparo do inóculo para fermentação alcoólica	19
4.2.3 Preparo do mosto e fermentação alcoólica	20
4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	22
4.3.1 Determinação de pH	22
4.3.2 Determinação da acidez total titulável.....	22
4.3.3 Determinação de sólidos solúveis	22
4.3.4 Açúcares redutores totais.....	22
4.4 DETERMINAÇÕES DE PARÂMETROS CINÉTICOS.....	23
4.4.1 Determinação do rendimento do processo.....	23
4.4.2 Produtividade volumétrica	23
4.4.3 Eficiência da fermentação alcoólica	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 ISOLAMENTO DE LEVADURAS SELVAGENS DA AMOSTRA DE FRUTAS NÃO FERMENTADAS	25
5.2 ISOLAMENTO DE LEVADURAS SELVAGENS DA AMOSTRA DE FRUTA FERMENTADA.....	26
5.2 POTENCIAL FERMENTATIVO DOS ISOLADOS	27
5.2.1 Parâmetros físico-químicos dos fermentados alcoólicos obtidos	30
6 CONCLUSÃO	33
7 REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

A amora-preta é uma pequena fruta de coloração atraente, variando da coloração vermelha púrpura a roxa, pertencente ao gênero *Rubus* e família *Rosaceae*, mesma família das framboesas. É classificada como fruta vermelha juntamente com morango, cereja, framboesa, mirtilo e apresenta elevada quantidade de sais minerais, vitaminas, compostos fenólicos e substâncias antioxidantes. Considerando o cultivo simples e o alto valor de mercado da fruta, sua produção em propriedades familiares pode vir a ser uma boa alternativa para diversificação da produção e aumento de renda da propriedade. No entanto, a amora-preta tem vida de prateleira curta devido a elevada taxa respiratória e deterioração por fungos presentes na própria fruta.

Apesar de despertar interesse de um número grande de consumidores por suas propriedades nutricionais e sabor, o fruto da amoreira não é muito consumido *in natura*, visto que além da alta perecibilidade é produzido em poucas regiões brasileiras. Desta forma, a transformação da fruta em derivados é uma estratégia importante para ampliação do consumo, agregação de valor e conquista de mercado. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, produzindo cerca de 42 milhões de toneladas anuais. Deste volume total de produção, acredita-se que as perdas no mercado interno possam chegar a 40%. Contribuem com estes números, o inadequado uso das técnicas de manejo do solo e da planta, falta de estrutura de armazenamento, logística, embalagens inadequadas e a própria desinformação do produtor. Sendo assim cria-se necessidade de um melhor aproveitamento tecnológico das frutas e nesse aspecto, a produção de fermentado alcoólico (vinho) de frutos pode ser uma alternativa promissora, A partir deste fruto podem ser obtidos produtos sensorialmente atrativos contendo componentes nutritivos, além de substâncias bioativas.

Neste sentido, é proposto no presente trabalho o isolamento de cepas de leveduras com potencial para fermentação alcoólica, visando à transformação da fruta em uma bebida fermentada (vinho de amora). Acredita-se que é possível a obtenção de produto derivado com propriedades atrativas com elevado conteúdo de bioativos com propriedades antioxidantes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolamento de leveduras de amora-preta (*Rubus* sp.) visando obtenção de fermentado alcóolico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar cepas selvagens de leveduras de amora preta (*Rubus* sp.);
- Conduzir fermentações descontínuas com as diferentes cepas de amora selvagens isoladas buscando avaliar a capacidade fermentativa das leveduras isoladas;
- Obter vinho de amora-preta.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 AMORA-PRETA (*Rubus* sp.)

A amora-preta (*Rubus* sp.) pertence à família *Rosaceae* e ao gênero *Rubus*, assim como a framboesa faz parte de um grupo , no qual existe em torno de 400 a 500 espécies difundidas na América, Europa, Ásia, África. A amoreira é uma planta que possui porte ereto, rasteiro ou forma arbustiva. As principais cultivares comerciais apresentam espinhos e produzem frutos com coloração negra quando maduros (figura 1) de peso entre 4 a 7 gramas, variando de sabor ácido-adocicado a ácido. Seu fruto verdadeiro é chamado de drupa e possui uma pequena semente (ANTUNES, 2006; FACHINELLO et al., 1994).



Figura 1-Frutas da amoreira (*Rubus* sp.)
Fonte: Toda Fruta (2010)

O cultivo comercial da amora-preta teve seu início no século 17, na Europa onde a partir de material nativo foi selecionado o cultivar Evergreen, a partir daí, espalhou-se para diversos países. No Brasil, as primeiras plantas foram introduzidas na década de 70, pela Embrapa Clima Temperado, de Pelotas (RS), que selecionou cultivares adaptadas a localidade, a partir de material cedido pela Universidade do Arkansas (EUA). A amoreira tem tido grande aceitação pelos produtores familiares,

devido ao baixo custo de produção, facilidade de manejo, rusticidade e pouca utilização de defensivos agrícolas (VIZZOTO, PEREIRA, 2011; ANTUNES, 2002).

De acordo com a Tabela 1 a amora-preta possui em sua composição:

Tabela 1- Composição da amora-preta (*Rubus* sp.).

Composição	Quantidades
Água (g/100g)	90±3
Proteínas (g/100g)	1,5
Fibras (g/100g)	4,1 ±0,6
Cinzas (g/100g)	0,33±0,14
Carboidratos (g/100g)	9,5±3,5
Lipídeos (g/100g)	0,55±0,25
Cálcio (mg/100g)	32
Fósforo (mg/100g)	21
Potássio (mg/100g)	196
Magnésio (mg/100g)	20
Ferro (mg/100g)	0,57
Selênio (mg/100g)	0,60
Vitamina C(mg/100g)	21
Conteúdo energético (Kcal/100g)	52,5±2,5

Fonte: VIZZOTTO, PEREIRA (2011).

Muitas substâncias fitoquímicas e compostos secundários são encontrados em frutos de amora-preta. Essas substâncias são produzidas naturalmente pelas plantas em sua defesa aos fatores externos, posteriormente esses fitoquímicos podem atuar na prevenção e combate de doenças crônicas. Exemplos dessas substâncias são as antocianinas e ácidos fenólicos (FERREIRA, 2010).

O fruto da amoreira é extremamente perecível, em função de sua pele frágil e fina e sua elevada taxa respiratória, fazendo com que sua vida pós-colheita seja relativamente curta, sendo os frutos comercializados preferencialmente na forma industrializada, na forma de congelados, enlatados, processados na forma de polpa para utilização em produtos lácteos, sucos e geleias (ANTUNES et al., 2002).

3.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA E FERMENTADO DE FRUTAS

A fermentação alcoólica é um processo que ocorre em anaerobiose com a transformação de açúcares em etanol e CO₂ catalisados por enzimas, realizada principalmente por leveduras, em nível citoplasmático, com o objetivo de produzir

energia, a qual será empregada na realização de suas atividades fisiológicas (LIMA et al, 2001).

A partir da fermentação alcoólica de frutas é obtido o vinho. O vinho é produzido desde a antiguidade pelo homem, fazendo parte central da vida na antiga Grécia e também em Roma, sua sucessora e grande difusora da cultura helênica pelo Ocidente. Atualmente sabe-se que as origens do vinho ultrapassam em muito os três mil anos de história que nos separam dos primeiros habitantes da Grécia (JORNAL DO VINHO, 2006). Hoje a produção de vinho é regulamentada por um conjunto de normas, no Brasil segundo a Lei nº. 7.678, decretada pelo Congresso Nacional em 8 de novembro de 1988:

Art. 3º Vinho é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples de uva sã, fresca e madura.

Parágrafo único. A denominação vinho é privativa do produto a que se refere este artigo, sendo vedada sua utilização para produtos obtidos de quaisquer outras matérias-primas (BRASIL, 1988).

Bebidas fermentadas com graduação alcoólica entre 4 e 14% em volume, produzidas a partir de outras frutas sendo ou não utilizado açúcar no mosto recebem, a denominação de fermentado de frutas, segundo o Decreto nº 2.314, de 04 de setembro de 1997, do Congresso Nacional (BRASIL, 1997).

Fermentados de frutas, são uma boa alternativa para o aproveitamento destas, pois apresentam sabor que agrada até mesmo os paladares mais refinados, mantendo as propriedades da fruta e agregando valor ao produto final. Na literatura são encontrados diversos trabalhos sobre fermentados de frutas como, abacaxi (OLIVEIRA et al. 2012), acerola (SANTOS et al, 2005), caju (SILVA et al, 2006), framboesa (SCHWAN et al.2010), jabuticaba (SILVA et al ,2008), kiwi (BORTOLINI et al, 2001), laranja (NOZAKI et al,2001), mirtilo (YAN et al, 2012), morango (TORIJA et al, 2013), umbu (MELO, 2005). Todas estas frutas mostraram-se adequadas a fermentação alcoólica e o produto obtido apresentaram boa aceitabilidade do público.

3.2 MICRO-ORGANISMOS DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

As leveduras são micro-organismos eucarióticos unicelulares, que se reproduzem geralmente de forma assexuada por brotamento, e em poucos casos por fissão binária, classificados no Domínio *Eukarya*, reino *Fungi*, porém, não formam um grupo taxonômico ou filogenético específico. Estimativas recentes indicam que somente 1% de todas as espécies de leveduras esteja descrita, embora cerca de 1.500 espécies já tenham sido descritas (OLIVERA, 2009).

Estes microrganismos estão amplamente difundidos na natureza, em diversos substratos como folhas, frutos, solo, ar, lagos, rios, mares ou habitando o interior de insetos e animais e muitos tem sido estudados sob o ponto de vista tecnológico e industrial. As leveduras são utilizadas desde tempos remotos na fabricação de bebidas alcoólicas, no crescimento de massas de panificação, e mais recentemente, na síntese de vitaminas, gorduras e proteínas, sendo, portanto, bastante explorados pelo homem. O emprego na fermentação de açúcares é a mais antiga aplicação e dentre as espécies de leveduras a mais utilizada é *Saccharomyces cerevisiae*, devido ao fato de converter rapidamente o açúcar em álcool, com baixa produção de componentes secundários. Além disso, possuem alta resistência a álcool no meio em que se encontram (cerca de 14-16% v/v de etanol) e tolerância a ampla variação de temperatura, sendo capaz de manter sua atividade celular em ambientes ácidos (CASADEI, 2010; ESPIRITO SANTO, 2012).

Quando a fermentação é iniciada e conduzida pela microbiota natural presente no fruto *in natura*, leveduras dos gêneros *Kloeckera*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Kluyveromyces* e *Torulaspota* podem fermentar, podendo produzir compostos secundários, das classes dos aldeídos, álcoois superiores, ésteres, furfural, terpenos, lactonas, furanos, pirazinas, ácidos orgânicos, melhorando as propriedades sensoriais do fermentado produzido (MELO, 2005, OLIVEIRA, 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA

As amoras-pretas foram adquiridas no município de Mangueirinha na região Sudoeste do Paraná.

As atividades experimentais de fermentação foram desenvolvidas no Laboratório de Bioprocessos, localizado no Centro de Tecnologias Integradas (Politec) da UTFPR, campus Pato Branco.

4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1 Isolamento de leveduras

Na etapa de isolamento foram empregados dois protocolos distintos. No primeiro, as leveduras foram isoladas pela técnica de inoculação por espalhamento superficial em placas de Petry.

As leveduras foram isoladas a partir de frutos frescos colhidos em propriedade rural de modo asséptico. Inicialmente 25 gramas de frutos foram colocadas em frasco Erlenmeyer contendo 225 mL de água peptonada esterilizada e submetido a agitação (50 rpm) por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente foram realizadas diluições sucessivas em água peptonada até diluição 10^{-4} e cada diluição foi inoculada (1 mL) por espalhamento com alça de Drigalski em placas de Petry contendo meio Ágar Sabouraud com cloranfenicol. As placas foram incubadas em estufa de cultura por 24 h ou 48 h a 30 °C. As colônias que cresceram nas placas foram isoladas por repiques sucessivos meio Ágar Sabouraud com cloranfenicol.

No segundo protocolo foram isoladas leveduras após submeter os frutos à fermentação alcoólica. Os frutos foram triturados rapidamente em mixer, com copo previamente esterilizado, e a biomassa obtida foi colocada em frasco de vidro de 800 mL (400mL de polpa). O frasco (Figura 2) foi incubado em estufa de cultura por 48 horas a 30 °C para que ocorresse a fermentação do suco e seleção natural de

leveduras alcoólicas. Após 48 horas de incubação, foram realizadas diluições sucessivas em tubos contendo água destilada esterilizada até diluições de 10^{-4} . Amostras da cultura fermentada (diluições 10^{-1} a 10^{-4}) foram inoculadas (1 mL) por espalhamento em superfície em placas contendo meio Ágar Sabouraud com cloranfenicol. As placas foram incubadas em estufa de cultura por 24 h ou 48 h a 30 °C.

Após incubação as colônias desenvolvidas foram repicadas (esgotamento por estria) para placas com meio de cultivo novo objetivando o isolamento das cepas. As colônias isoladas foram então avaliadas quanto à morfologia em microscópio ótico, buscando confirmação de que eram leveduras. Os isolados foram mantidos em meio Agar Sabouraud com cloranfenicol em geladeira através de repiques mensais.



Figura 2- Cuba utilizada para fermentação espontânea e seleção natural de micro-organismos.

4.2.2 Preparo do inóculo para fermentação alcoólica

Na fermentação alcoólica para avaliação do potencial fermentativo das leveduras isoladas foram empregadas as cepas previamente isoladas e mantidas em meio ágar sabouraud com cloranfenicol em geladeira. Uma alçada de células foi transferida para frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 150 mL de meio Caldo

Extrato de Malte (extrato de levedura 3 g/L, extrato de malte 3 g/L, peptona 5 g/L, glicose 10 g/L) e cultivado em incubadora orbital (shaker) por 24 horas a 28 °C e 125 rpm. As células foram recuperadas por centrifugação a 3500 rpm (1350 x g) por 15 minutos, lavadas e ressuspensas em água destilada esterilizada. Como inóculo foi empregado um volume de suspensão celular necessário para obter uma concentração inicial de 2×10^6 células/mL. A biomassa celular foi quantificada através de contagem em câmara de Neubauer.

4.2.3 Preparo do mosto e fermentação alcoólica

As frutas foram trituradas em multiprocessador Philips-Walita, modelo RI7633, o mosto então foi chaptalizado com açúcar comercial para atingir teor de sólidos solúveis (°Brix) de 16 °Brix. O mosto chaptalizado foi suplementado (30 g/hL) com mistura ativadora de crescimento de leveduras Enovit (Pascal Biotech - Paris, França) constituído de: sulfato de amônio(70%), fosfato de amônio dibásico(19,8%), celulose quimicamente inerte(10%) e cloridrato de tiamina, vitamina B1(0,20%), além de ser acrescido de 50 mg / L de metabissulfato de potássio (sulfitagem).

A fermentação alcoólica foi realizada de modo descontínuo em cuba de vidro, com capacidade de 800 mL sob temperatura controlada de 28°C em incubadora do tipo B.O.D (marca Nova Técnica, modelo RDE34). Na saída de ar da cuba foi conectado mangueira de silicone cuja extremidade foi mantida submersa em água destilada em tubo de ensaio que funcionou como batoque, impedindo a entrada de ar no sistema ao mesmo tempo em que permitia a liberação do gás carbônico (CO₂) oriundo da fermentação (Figura 5).

A fermentação foi acompanhada através do consumo dos açúcares via avaliação do teor de sólidos solúveis totais e verificação de despreendimento de bolhas de CO₂. Amostras foram coletadas em intervalos de 24 h para avaliação de pH, acidez total titulável, sólidos solúveis totais, açúcares redutores totais e concentração de etanol.



Figura 3- Processador de frutas.



Figura 4- Mosto obtido da amora-preta.



Figura 5- Cubas utilizadas para realização dos ensaios fermentativos.

Ao término das fermentações o mosto fermentado foi centrifugado a 3500 rpm (1500 x g) por 30 minutos para retirada da borra e células de leveduras.

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

O fermentado alcoólico obtido foi caracterizado quanto aos parâmetros: pH, sólidos solúveis (°Brix), acidez total titulável, açúcares redutores totais, seguindo metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

4.3.1 Determinação de pH

O pH foi medido diretamente em pHmetro digital de bancada (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

4.3.2 Determinação da acidez total titulável

A acidez foi determinada por titulação potenciométrica utilizando pHmetro de bancada (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

4.3.3 Determinação de sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis (°Brix) foi determinado com auxílio de refratômetro portátil (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

4.3.4 Açúcares redutores totais.

A análise foi realizada pelo método DNS conforme descrito por Miller, *et al* (1959). A amostra foi submetida a processo de hidrólise dos açúcares através da mistura de 1 mL de amostra com 1,0 mL de HCl 2 mol/L e aquecimento em banho-maria em ebulição por 5 minutos. A mistura foi resfriada em banho de gelo e neutralizada com 1,0 mL de NaOH 2 mol/L.

Solução de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) foi preparada através da diluição de 10,6 g de ácido dinitrosalicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio em 1416 mL de água destilada. Posteriormente a esta solução foram adicionados 306,0 g de tartarato duplo de sódio e potássio, 8,3 g de metabissulfito de sódio e 7,6 mL de fenol sob aquecimento a 50°C até completa dissolução.

Para a quantificação dos açúcares redutores totais 1 mL da amostra hidrolisada foi transferida para tubo de ensaio e adicionado 3 mL de solução de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). A mistura foi então aquecida por 5 minutos em banho-maria em ebulição e após resfriamento foram adicionados 16 mL de água destilada e realizadas leituras em espectrofotômetro a 540 nm. Como branco foi utilizada mistura de 1 mL de água e 3 mL de solução de DNS e após resfriamento adição de 16 mL de água. Os resultados foram calculados através de correlação com curva padrão de glicose (0,01 mg/L, 0,02 mg/L, 0,04 mg/L, 0,06 mg/L, 0,08 mg/L, 0,1 mg/L).

4.4 DETERMINAÇÕES DE PARÂMETROS CINÉTICOS

4.4.1 Determinação do rendimento do processo

O rendimento ($Y_{P/S}$) da fermentação alcoólica foi determinado correlacionando-se a concentração final de etanol no caldo fermentado com o substrato consumido no processo de fermentação, conforme equação 1.

$$Y_{(P/S)} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (1)$$

Sendo que:

$Y_{(P/S)}$ = Rendimento do processo (g/g).

ΔP = Variação da produção (g).

ΔS = Variação do consumo de substrato (g).

4.4.2 Produtividade volumétrica

A produtividade volumétrica (Q_p) da fermentação alcoólica foi determinada como a razão entre a variação da concentração do produto da fermentação em função do tempo (Equação 2).

$$Q_p = \frac{P - P_0}{t} \quad (2)$$

Sendo que:

Q_p =produtividade volumétrica ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

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

P_0 = Produção inicial de etanol (g.L^{-1}).

t = Tempo final de fermentação (h).

4.4.3 Eficiência da fermentação alcoólica

A eficiência (η) do processo de fermentativo foi calculada pela razão entre o rendimento prático e o rendimento teórico da fermentação (Equação 3).

$$\eta\% = \frac{Y_{P/S} \text{observado}}{Y_{P/S} \text{teórico}} \times 100 \quad (3)$$

Sendo que:

η = eficiência do processo (%).

$Y_{(P/S)}$ Observado = Rendimento observado no processo (g/g).

$Y_{(P/S)}$ Teórico= Rendimento teórico do processo (g/g).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO DE LEVADURAS SELVAGENS DA AMOSTRA DE FRUTAS NÃO FERMENTADAS

Visando o isolamento de micro-organismos com características fermentativas, utilizou-se dois métodos distintos, pelo primeiro método foi possível o isolamento de seis (6) cepas microbianas. Foi verificada a presença de cinco (5) leveduras (FIGURA 6: Isolados A, B, C, D, F) e um (1) fungo filamentososo (FIGURA 6: Isolado E). Não foi verificada presença de bactérias nas amostras embora seja comum a presença de bactérias em frutas. Possivelmente isto se deve ao fato de ter sido utilizado do meio ágar Sabauraud com Cloranfenicol no protocolo de isolamento. O antibiótico cloranfenicol pode ter inibido o desenvolvimento bacteriano mesmo não sendo um antibiótico de grande espectro antimicrobiano.

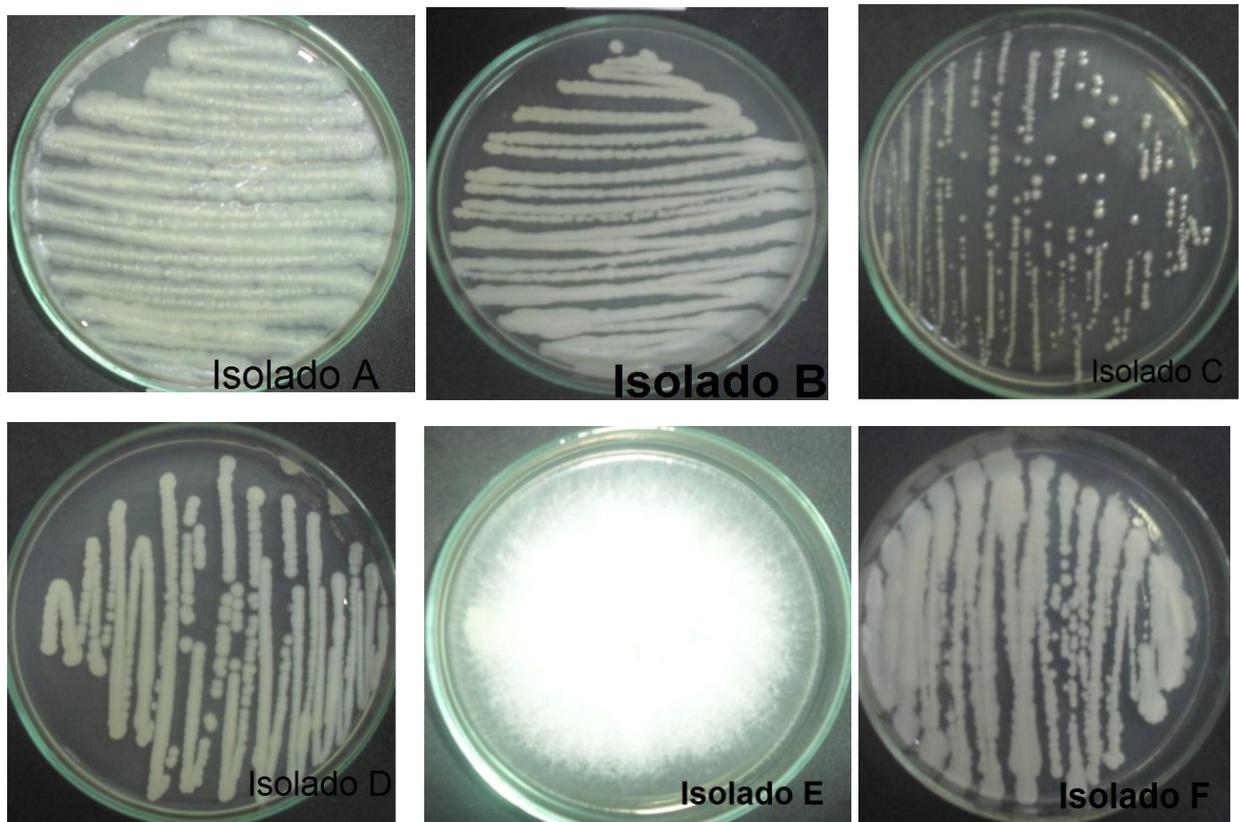


Figura 6- Micro-organismos isolados da fruta (leveduras: isolados A, B, C, D e F; Fungo filamentososo: isolado E).

A presença de fungos filamentosos é comum em frutas, incluindo fungos fitopatogênicos e não fitopatogênicos. No entanto, seu isolamento não foi

considerado importante no presente trabalho uma vez que o principal objetivo era o isolamento de leveduras alcoólicas. Cabe salientar ainda que a presença de apenas uma cepa de fungo filamentososo pode indicar uma boa qualidade sanitária do pomar onde as frutas foram obtidas, considerando que se trata de um cultivo orgânico, portanto, sem o uso de defensivos químicos.

5.2 ISOLAMENTO DE LEVADURAS SELVAGENS DA AMOSTRA DE FRUTA FERMENTADA

Através do segundo protocolo de isolamento de micro-organismos, onde as frutas foram submetidas à fermentação alcoólica natural, uma única cepa microbiana foi isolada. (FIGURA 7: isolado vinho).

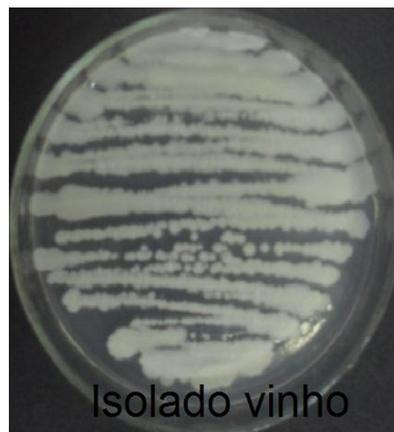


Figura 7- Micro-organismo isolado do fermentado alcoólico.

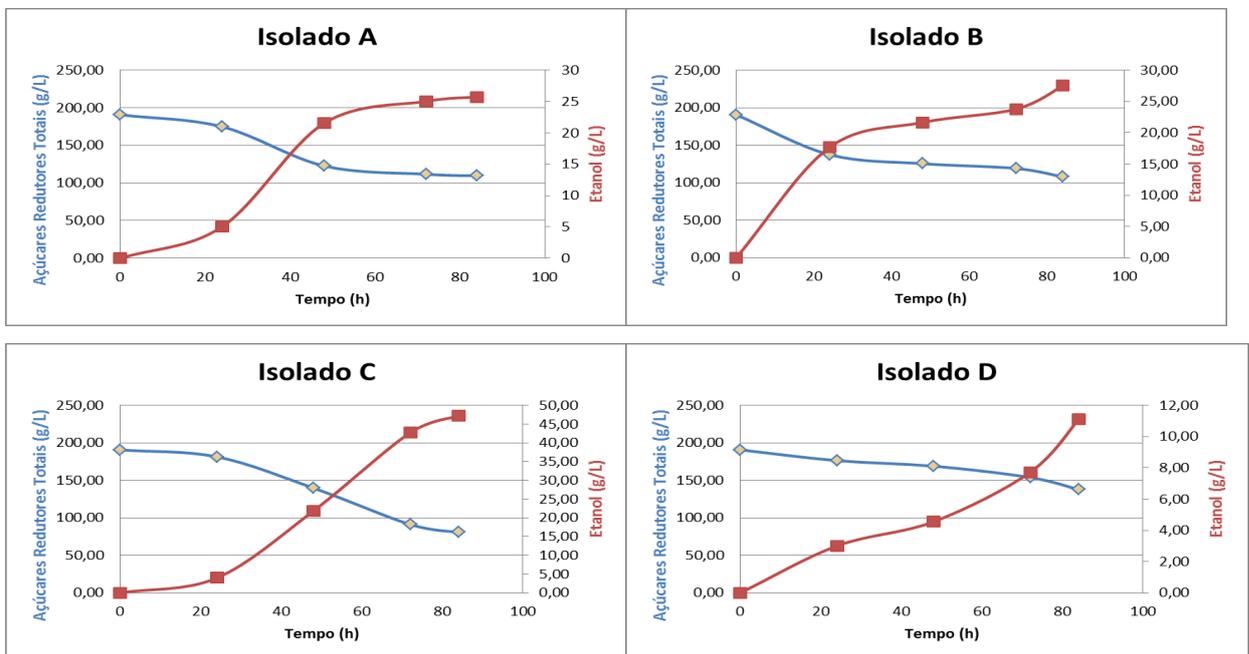
Diferentemente do observado na polpa da fruta, a partir do fermentado alcoólico foi possível o isolamento de apenas uma cepa microbiana (levedura). A partir de análise de aspectos morfológicos das colônias (cor, brilho, gomosidade e forma do contorno das colônias) e visualização das células em microscópio ótico acredita-se que a cepa isolada do vinho de amora seja a mesma do Isolado F.

O isolamento de uma única levedura do fermentado alcoólico indica que apenas uma das leveduras presentes e isoladas da fruta apresenta maior tolerância ao etanol. Tal característica sugere potencial como levedura alcoólica, uma vez que o micro-organismo deve ter além de boa capacidade fermentativa, elevada tolerância ao acúmulo de etanol no meio.

Na literatura, são verificados trabalhos contemplando o isolamento de micro-organismos de frutas para emprego em fermentação alcoólica. Mamade,(2004) relata o isolamento de duas leveduras de bagas de uva Chardonnay cultivada na região da Serra Gaúcha (RS). Fernandes,(2008), descreve o isolamento de três(3) leveduras de ananás, oriundas do comércio local Lisboa-Portugal. Angiolleto (2013), relata isolamento de vinte e nove(29) espécies de leveduras advindas de maçã adquiridas no comércio local de Florianópolis.

5.2 POTENCIAL FERMENTATIVO DOS ISOLADOS

Na Figura 7 estão demonstrados os gráficos com o perfil fermentativo das leveduras isoladas da fruta. Não foram conduzidas fermentações com o fungo filamentososo isolado uma vez que fungos filamentosos não são utilizados na produção de vinhos e álcool carburante.



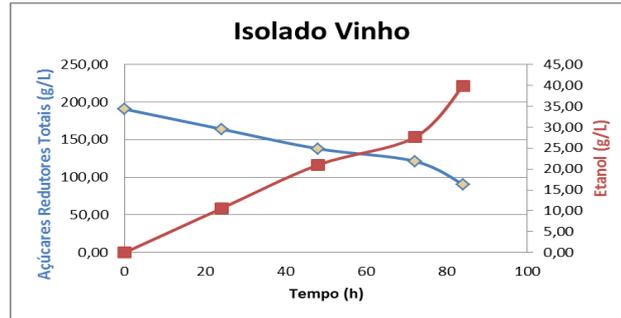


Figura 7-Gráficos representando consumo de açúcares redutores e produção de etanol ao longo da fermentação.

Em todas as fermentações após 8 horas de cultivo foi observado início do desprendimento de bolhas de CO₂ indicando a fermentação dos açúcares presente no mosto. Intenso desprendimento de bolhas de CO₂ foi observado após 24 horas de cultivo demonstrando a fase tumultuosa da fermentação alcoólica.

Em 24 horas de fermentação foi verificado maior consumo de açúcares (27,89 %) e maior produção de etanol (17,86 g/L) na fermentação com o isolado B. No entanto, este não foi o isolado que promoveu a maior produção final de etanol (maior acúmulo no meio). Em 24 horas de cultivo foi verificado consumo de 8,33% do substrato na fermentação com o isolado A, 4,86% na fermentação com o isolado C, 7,56 % na fermentação com o isolado D e 13,67 % na fermentação com o isolado Vinho. Com relação ao acúmulo de etanol foi verificado 5,03 g/L de produção de etanol na fermentação com o isolada A, 3,98 g/L de produção de etanol com o isolado C, 3 g/L de produção de etanol com o isolado D, 10,55 g/L de produção de etanol com o isolado Vinho.

Após 72 h de fermentação foi observado redução na intensidade do desprendimento de bolhas de CO₂ e completa interrupção em 84 horas de cultivo. As fermentações foram interrompidas após 84 horas de fermentação em função do não desprendimento de gás carbônico e precipitação da borra (células e partículas de biomassa vegetal) indicando fim do processo fermentativo.

Na Literatura, são verificados trabalhos que descrevem diferentes tempos de fermentação alcoólica de sucos de frutas, Bortolini et al. (2001) descrevem fermentações alcoólicas de sucos de kiwi (18 °Brix e 22 °Brix) submetidos a diferentes tratamentos, nas quais o tempo de fermentação foi de 48 horas. O mesmo tempo de fermentação é relatado por Tessaro et al. (2010) em fermentações alcoólicas de suco de laranja. Duarte et al. (2010) descrevem tempo de 48 h de

fermentação em estudo de microvinificação de framboesa, partindo de um mosto contendo 16 °Brix com cepa de *S. cerevisiae*. Hidalgo, et al (2013) descreve a fermentação de morango(18°Brix) utilizando cepas selvagens isoladas da própria fruta em 120 horas.

Segundo Xavier et al(2011), as diferenças nos tempos de fermentação alcoólica estão relacionadas a diferentes aspectos do processo de produção, tais como características inerentes ao suco da fruta, formas e condições de condução do processo fermentativo, bem como características fisiológicas, idade e tamanho do inóculo empregado no cultivo.

Conforme pode ser visto no gráfico da Figura 7 e Tabela 2, maiores produções finais de etanol foram observadas nos isolados C (47,15 g/L) e isolado do vinho (39,87 g/L). Similarmente maior consumo de substrato também foi verificado nestes cultivos (67,63 %, isolado C e 52,48% isolado vinho). O consumo incompleto dos açúcares presentes no mosto nas fermentações com os diferentes isolados pode estar associado ao acúmulo de etanol no meio, que torna-se tóxico em altas concentrações as células microbianas inibindo a fermentação (XAVIER et al, 2011).

Na Tabela 2, estão apresentados os parâmetros fermentativos das fermentações alcoólicas.

Tabela 2- Parâmetros fermentativos dos ensaios com diferentes cepas isoladas de amora-preta (*Rubus* sp.).

Parâmetros fermentativos	Valores observados				
	Isolado A	Isolado B	Isolado C	Isolado D	Isolado Vinho
Produção Final (P_F) (g/L)	25,68±0,6	27,51±0,7	47,16±1,2	11,12±0,3	39,87±1
Rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) (g/g)	0,32±0,008	0,33±0,008	0,43±0,01	0,21±0,005	0,40±0,01
Produtividade Volumétrica em etanol (Q_P) (g/Lh)	0,31±0,008	0,32±0,008	0,57±0,01	0,13±0,03	0,47±0,01
Taxa global do consumo do substrato (Q_S)(g/Lh)	0,97±0,02	0,99±0,02	1,91±0,04	0,63±0,04	1,2±0,03
Eficiência da fermentação alcoólica (Π) (%)	62±1,55	65±1,6	84±2,1	41±1,0	78±1,9
Percentual global de consumo do substrato (Y_C)	42,5±1,0	43,46±1,0	57,63±1,4	27,83±0,7	52,5±1,3

Nos cultivos com o isolado C e isolado vinho foram verificadas as maiores produções de etanol (47,16 g/L e 39,87 g/L, respectivamente) em 84 h de fermentação, bem como os maiores rendimentos em etanol (0,43 g/g e 0,40 g/g) e produtividades volumétricas (0,57 g/Lh⁻¹ e 0,47 g/Lh⁻¹). Os isolados C e de Vinho também promoveram os melhores resultados de eficiência de fermentação (84% e 78%), melhor assimilação do substrato (57,63% e 52,48%) e taxa global de consumo de substrato (1,91 g/Lh⁻¹ e 1,19 g/Lh⁻¹).

Possivelmente, ambos os isolados tratam-se da mesma levedura alcoólica, uma vez que são verificados perfis fermentativos bastante semelhantes. Além de perfil fermentativo similar, pode ser verificado também maior desempenho na fermentação alcoólica quando comparado tais isolados com os demais. De fato, a partir do protocolo de isolado a partir da fruta fermentada foi possível o isolamento de apenas uma cepa microbiana. Tal cepa apresentou maior tolerância ao acúmulo de etanol no meio e maior capacidade fermentativa.

Na literatura são verificados trabalhos envolvendo fermentações alcoólicas de diferentes frutas e são observados diferentes valores dos parâmetros fermentativos rendimento, eficiência e produtividade volumétrica em etanol.

Almeida et al. (2006) descrevem valores de produtividade em etanol (Q_P) de, 75 g/Lh, rendimento ($Y_{P/S}$) de 0,461 g/g e eficiência (η) de 90,2% em fermentação de fruto de mandacaru. Já Lopes et al. (2012) em fermentação com polpa de palma forrageira descreveram valores de rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) de 0,39g/g, eficiência (η) de 73,09%, e produtividade em etanol(Q_P) de 2,6 g/Lh.

Em fermentação alcoólica de suco de caju, Silva et al. (2007) verificaram valores de produtividade (Q_P) de 0,78 g/Lh, rendimento em etanol de 0,30 g/g e eficiência (η) de 57,78%. Tais valores são compatíveis com os fermentados obtidos do isolado A ($Y_{P/S} = 0,32$ e $\eta = 62\%$), Isolado B ($Y_{P/S} = 0,33$ e $\eta = 65\%$) e inferiores ao obtido do isolado C ($Y_{P/S} = 0,43$ e $\eta = 84\%$) e isolado vinho ($Y_{P/S} = 0,40$ e $\eta = 78\%$).

5.2.1 Parâmetros físico-químicos dos fermentados alcoólicos obtidos

Na Tabela 3 estão descritos os parâmetros físico-químicos do vinho de amora obtido na fermentação alcoólica:

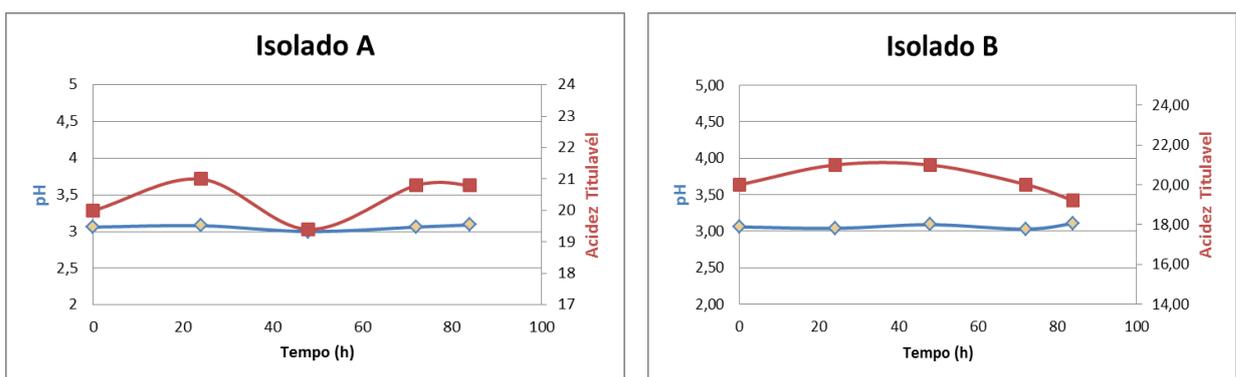
Tabela 3-Parâmetros físico-químicos dos fermentados obtidos com diferentes cepas isoladas de amora.

Parâmetros físico-químicos	Valores observados				
	Isolado A	Isolado B	Isolado C	Isolado D	Isolado Vinho
Ph	3,09	3,11	3,10	3,04	3,07
Acidez titulável (em ácido acético)(%)	1,24±0,03	1,15±0,03	1,22±0,03	1,23±0,03	1,26±0,03
Sólidos Solúveis Totais (°Brix)	11±0,3	11±0,3	8±0,2	14±0,04	9±0,2
Etanol (v/v)	3,25±0,08	3,48±0,08	5,9±0,15	1,4±0,03	5,05±0,12
Açúcar redutores totais (g/L)	109,55±2,7	107,78±2,7	80,76±2,0	137,57±3,4	90,58±2,3

Pode ser verificado que a cepa isolada C conseguiu suportar 5,9 °GL (47,16 g/L) , sendo a que resistiu a maior concentração de etanol no meio, enquanto a cepa isolada D foi a que menos resistiu 1,4°GL (11,9 g/L).

Com relação ao conteúdo de etanol em fermentados alcoólicos de fruta é verificado na literatura diferentes conteúdos. Isto é devido a diferenças inerentes ao processo fermentativo como diferenças no conteúdo inicial de substrato, capacidade fermentativa da levedura alcoólica, diferenças de temperatura de processo, disponibilidade de nutrientes, modo de condução do processo, entre outros. Exemplo disso, em fermentações obtidas a partir de polpa de umbu com 10 °Brix de SST, Carmo (2012) obteve fermentado alcoólico com 46,6 g/L de etanol (6 °GL), Já em estudo com fermentado alcoólico do fruto do mandacaru, Oliveira et al. (2011) obtiveram vinho com 5,2°GL a partir de suco contendo 105,17 g/L de açúcares.

Apesar das diferentes características fermentativas de cada cepa, foram verificadas poucas variações nos valores de pH (entre 3 e 3,11) e acidez titulável (entre 19 e 21,4) ao longo das fermentações, conforme pode ser observado no gráfico da Figura 6. A manutenção dos valores de pH e acidez nas faixas de valores observados indica que as fermentações ocorrem de forma adequada sem interferências de potenciais contaminantes em especial bactérias produtoras de ácido acético, propiônico, butílico, etc.



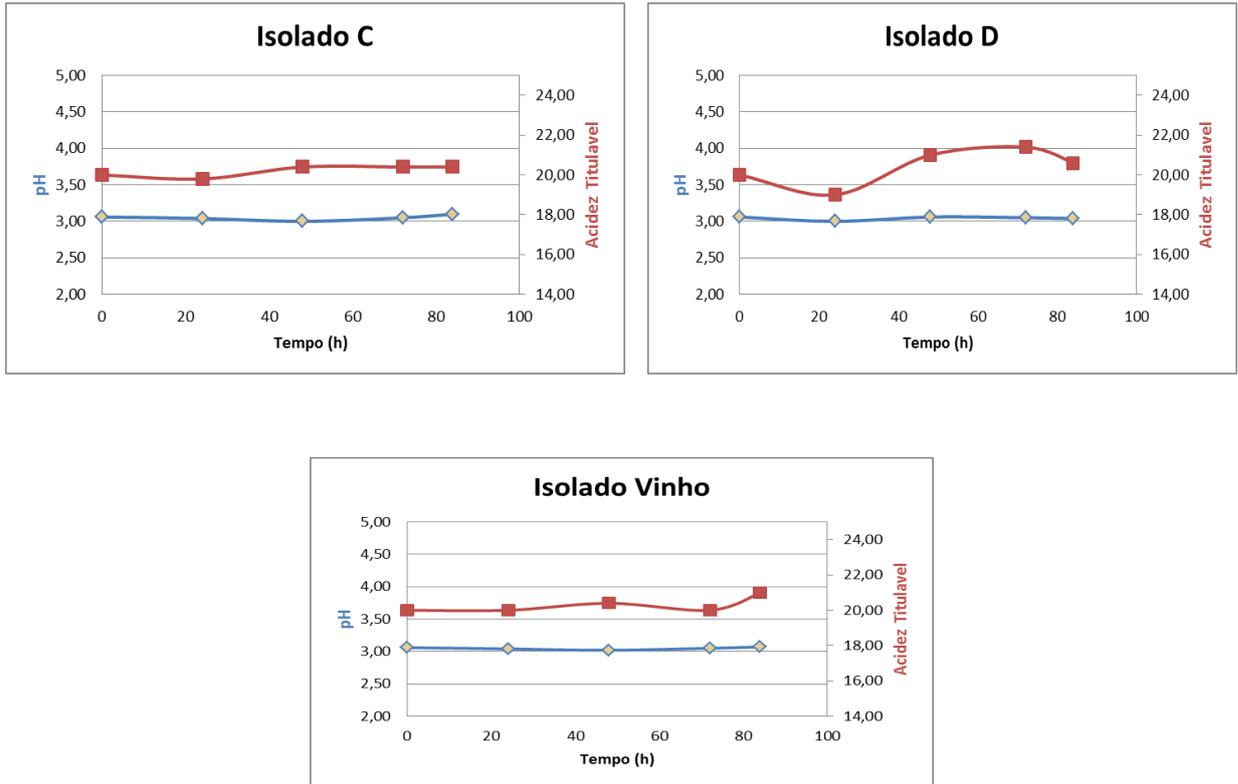


Figura 8 - Comportamento do pH e acidez titulável ao longo do ensaio da fermentação alcoólica.

6 CONCLUSÃO

Foi possível o isolamento de leveduras alcoólicas de amora-preta (*Rubus sp.*) a partir de protocolos que envolveram a inoculação por espalhamento em superfície da polpa da fruta e de mosto fermentado da fruta.

Foram isoladas cinco cepas de leveduras e uma cepa de fungo filamentosos a partir da polpa da fruta *in natura*.

Foi isolada uma cepa de levedura a partir de mosto fermentado da fruta.

Dois isolados apresentaram maior desempenho quanto a fermentação alcoólica, sendo que possivelmente tratam-se da mesma cepa microbiana. Tal(is) isolado(s) possui(em) potencial para uso como inóculo na produção de fermentado alcoólico de frutas.

7 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Mércia. Cinética da Produção do Fermentado do Fruto do Mandacaru, **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 8, n. 1 jun. 2006. Disponível em: < <http://www.deag.ufcg.edu.br/rbpa/rev81/Art815.pdf>>. Acesso em 11 fev. 2014.

ANGIOLETTO, Everton, **Isolamento e caracterização de leveduras para produção de sidra**.2013. f. 101. Dissertação (mestrado em Biotecnologia e Biociências). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013

ANTUNES, L.E.C. Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.1, p.151-158, 2002.

ANTUNES, L.E.C. Alterações de compostos fenólicos e pectina em pós colheita de frutos de amora-preta. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.12, n.1, p.57-61, 2006.

BORTOLINI, F.; SANT'ANNA, E. S.; TORRES, R. C. Comportamento das Fermentações Alcoólica e Acética de Suco de Kiwi (*Actinidia deliciosa*); Composição dos mostos e métodos de Fermentação Acética. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 21, p. 236-243, 2001.

BRASIL. Congresso nacional. Decreto n. 2.314 de 04 de setembro de 1997. 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 União, Brasília, DF, 05 set. 1997.

Disponível em:

<<http://www.receita.fazenda.gov.br/legislacao/Decretos/Ant2001/Ant1999/Dec231497.htm>>

Acesso em: 12 de agosto de 2013.

BRASIL. Congresso nacional. Lei n. 7.678 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. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 09 nov. 1988.

Disponível em:

<<http://www.receita.fazenda.gov.br/legislacao/Leis/Ant2001/lei767888.htm>>.

CARMO, Shirlene K. S.; SÁ, Susan K. C. V. L. e; ALMEIDA, Mercia M. de; SWARNAKAR, W., Produção e Caracterização de Fermentado de Umbu a partir de sua polpa comercial, **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, CampinaGrande, v.14, n.1, Jul. 2012. Disponível em:<<http://www.deag.ufcg.edu.br/rbpa/rev141/Art1412.pdf>>. Acesso em: out. 2012. Acesso em: 12 agosto 2013.

CASADEI, Maria E. **Processos fermentativos a partir da cana-de-açúcar**. 2012. 38 f. TCC (Tecnologia em Biocombustíveis) - Faculdade de tecnologia de Araçatuba. Araçatuba, 2012.

DUARTE, Whasley. DRAGONE, Giuliano DIAS, Disney. OLIVEIRA, José. TEIXEIRA, José. ALMEIDA E SILVA, João. SCHWAN, Rosane, Fermentative behavior of *Saccharomyces* strains during microvinification of raspberry juice (*Rubus idaeus* L.), **International Journal of Food Microbiology**, 14 Ago.2010p. 173-182.

ESPÍRITO SANTO, Júlio C.A. **Aperfeiçoamento da fermentação de sacarose através da modificação da expressão dos genes SUC2 e AGT1 em linhagens diploides de *saccharomyces cerevisiae***. 2012. 135 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

FACCHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; SANTOS, A.M. dos. **Amoreira-preta, framboesa e mirtilo: pequenos frutos para o sul do Brasil**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 13, 1994, Salvador. Resumos... Salvador: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1994. V.3, p.989-990.

FERNANDES, F.V. Ana Paula. **Leveduras isoladas de produto frutícolas: capacidade fermentativa e estudos sobre a H⁺ATPase da membrana plasmática**, 2008. 201 f. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade Nova de Lisboa -Lisboa, 2008.

FERREIRA, D.S.; ROSSO, V.V.de; MERCADANTE, A. Z.; Compostos bioativos presentes em amora-preta (*Rubus spp.*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal. v. 32, n. 3, p. 664-674, 2010

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos**. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JORNAL DO VINHO, O arqueólogo dos fermentados. Disponível em: <<http://jornaldovinho.com.br/o-arqueologo-dos-fermentados/> /> Acesso em 2 de setembro de 2013.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. **Produção de Etanol**. In: LIMA, U. A. et al. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo, Edgard Blücher, v. 3, 2001.

LOPES, Roseany. Et al. Aplicação do Planejamento Fatorial para Otimização do Estudo da Produção de Fermentado do Fruto da Palma Forrageira, **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 7, n. 1, 2005. Disponível em: <<http://www.deag.ufcg.edu.br/rbpa/rev71/Art713.pdf>>. Acesso em 11 fev. 2014.

MAMADE, E.O. Maria, PASTORE, M. Gláucia. Avaliação da produção dos compostos majoritários da fermentação de mosto de uva por leveduras isoladas da região da “serra gaúcha” (RS). **Ciência e tecnologia de alimentos**, Campinas (SP) Pg-453-458, jul.-set. 2004.

MELO, Dângely L. F. M. **Potencial biotecnológico do Umbu: Perspectivas para o semi-árido**. 2005. 82 f. Tese (mestrado em desenvolvimento e meio ambiente)- Universidade Federal do Sergipe, São Cristovão, 2005.

MILLER, Gail L.; Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, n.3, v.31, p.426-428, Mar.1959.

NOZAKI, J.; CORAZZA, M.L.; RODRIGUEZ, D.G.; Preparação e caracterização do vinho de laranja. **Química Nova**, Vol. 24, N. 4, 449-452, 2001.

OLIVEIRA, Bruno Motta. **Comportamento *killer* em leveduras associadas à fermentação espontânea do mosto da cana-de-açúcar de produtores de cachaça de alambique da Bahia**. 2009.123 f. Tese (mestrado em biotecnologia)- Universidade estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.

OLIVEIRA, L. A.; LORDELO, F. dos S.; TAVARES, J.T.de Q.; CAZETTA, M.L.; Elaboração de bebida fermentada utilizando calda residual da desidratação osmótica de abacaxi (*Ananas comosus* L.). **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 06, n. 01.p. 702-712, 2012.

SALVATO, Flávia. **Fermentação de mosto industrial por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e sob expressão de invertase interna: estudo comparativo com linhagens com alta e baixa atividade de invertase externa**. 2010. 93 f. Tese (Mestrado em ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SANTOS, S. C.; ALMEIDA, S. dos S.; TOLEDO, A.L.; SANTANA, J.C.C.; SOUZA, R.R. de; Elaboração e Análise Sensorial do Fermentado de Acerola (*Malpighia Punicifolia* L.). **Brazilian journal of food thecnology**, 2005.

SCHWAN, R.F.; SILVA, J.B.A.e; TEIXEIRA, J.A.; OLIVEIRA, J.M.; DIAS, D.R.; DRAGONE, G.; DUARTE, W.F.; Fermentative behavior of *Saccharomyces* strains during microvinification of raspberry juice (*Rubus idaeus* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 143, N°.3, P.173–182, 2010.

SILVA, P.H.A. da; FARIA, F.C .de; TONON, B.; MOTA, S.J.D.; PINTO, V.T.; Avaliação da composição química de fermentados alcoólicos de jabuticaba (*Myrciaria Jabuticaba*), **Química nova**, Vol. 31, N°. 3, 595-600, Mar 2008.

SILVA, F.L.H.da; NETO, A.B.T.; SILVA, M.E.da; SILVA, W.B.; SWARNAKAR, R.; Cinética e caracterização físico-química do fermentado do pseudofruto do caju (*Anacardium occidentale* L.), **Química nova**, Vol. 29, No. 3, p.489-492, Fev. 2006.

SILVA, M. E.; TORRES, Neto, A. B.; SILVA, W. B.; SWARNAKAR, R.; Cashew Wine Vinegar Production: Alcoholic and Acetic Fermentation, **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, Campina Grande, v. 24, n. 02, p. 163-169, Ab.-Jun. 2007.

TESSARO, Dinéia; LARSDEN, Andrea C.; DALLAGO, Rose C; DAMASCENO, Simone. G., SENE, L., COELHO, S. R. M., Avaliação das fermentações alcoólica e acética para produção de vinagre a partir de suco de laranja, *Acta Scientiarum Technology*, v. 32, n. 2, p. 201-205, Maringá, 2010.

TODA FRUTA,2010.**Compostos bioativos presentes em amora-preta.** Disponível em:<http://www.todafruta.com.br/noticia/22852/COMPOSTOS+BIOATIVOS+PRESENTE+EM+AMORA-PRETA>. Acesso em 01 de setembro de 2013.

TORIJA, M.J.; HIDALGO,C.; MAS,A.; MATEO,E. Effect of inoculation on strawberry fermentation and acetification processes using native strains of yeast and acetic acid bacteria, **Food Microbiology**,V.34,p.88-94,2013.

VIZZOTO, M.; PEREIRA, M.C.. Blackberry (*Rubus sp.*): Extraction Process Optimization and Determination of Phenolic Compounds Antioxidants, **Revista brasileira de fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 4, p. 1209-1214, 2011.

XAVIER, Daniella; IVANOV, Raphael C.; CUNHA, Mário, A. A.; PEREIRA, Edimir, A.; Produção e Caracterização de Vinagre de *Fisalis*, **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, Campo Mourão, v. 2, n. 1, p. 27-32, jan. jun. 2011.

YAN, H.; ZHANG, W.; CHEN,J.; DING, Z.; **Optimization of the alcoholic fermentation of blueberry juice by AS 2.316 *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast.** African Journal of Biotechnology., v.11, p. 3623-3630, 2012.